EFEITO DA TEMPERATURA DE ATIVAÇÃO, PH E TEMPO DE
INCUBAÇÃO NA GERMINAÇÃO DE ESPÓROS DE BACTÉRIAS
ISOLADAS DE PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

CÉLIA REGINA BERTECHINI GOMES DUQUE

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. ANTÔNIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Es-
cola Superior de Agricultura
"Luiz de Queiroz", da Univer-
sidade de São Paulo, para ob-
tenção do título de Mestre em
Agronomia: Microbiologia Agri-
cola.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Maio - 1991

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

D946e Duque, Célia Regina Bertechini Gomes
Efeito da temperatura de ativação, pH e tempo de in-
cubação na germinação de esporos de bactérias isoladas
de processos de fermentação alcoólica. Piracicaba,
1991.

71p, ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Fermentação alcoólica - Contaminação bacteriana
2. Fermentação alcoólica - Efeito da temperatura 3. Fer-
mentação alcoólica - Efeito do pH 4. Fermentação alcoó-
lica - Esporo - Germinação 5. Fermentação alcoólica - In-
cubação I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Quei-
roz. Piracicaba

CDD 663.13

EFEITO DA TEMPERATURA DE ATIVAÇÃO, PH E TEMPO DE
INCUBAÇÃO NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS DE BACTÉRIAS
ISOLADAS DE PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

CÉLIA REGINA BERTECHINI GOMES DUQUE

Aprovada em: 05.08.1991

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira

ESALQ/USP

Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Djanira R. de Angelis

IBRC/UNESP

Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira
Orientador

Ao meu esposo ALVARO

e aos meus pais: GUILHERME E

FLORINDA com muito amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e, em especial:

Ao Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira, pela orientação, amizade e confiança constantes.

Ao Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo, pela amizade e sugestões oferecidas.

Aos amigos Cleomar, Vera, Tais, Roseli, Roque, Walmir, Luciene, José Carlos, Maria Fernanda, Luís Roberto e Carlos pela preciosa convivência e colaboração constantes.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Rural, em especial a Cleomar Maria de Carvalho e Regina Lúcia M. Lourenço pela prestação de serviços.

Ao Luís Roberto Martin e Tadeu Alcides Marques pela confecção das análises estatísticas e eficiente trabalho de datilografia.

Ao meu marido Álvaro, pelo seu apoio, incentivo, compreensão e Amor.

Aos meus pais pelo amor e incentivo.

v.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de estudos.

À FERMENTEC S/C Ltda. Assistência Técnica em Fermentação Alcoólica, Piracicaba, SP, pelo apoio financeiro às pesquisas.

À Deus, por ser o meu guia constante em todas as etapas da vida.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1. Ativação	03
2.2. Processo de Germinação	09
2.3. Fatores que Afetam a Germinação	14
2.3.1. pH	14
2.3.2. Temperatura	16
2.3.3. Tensão de Oxigênio	17
2.3.4. Atividade de Água (aw)	18
2.3.5. Composição do Meio de Cultivo	19
2.3.6. Inibidores Químicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Materiais	26
3.1.1. Matéria-Prima	26
3.1.2. Culturas	26
3.2. Métodos	27
3.2.1. Esporulação	27
3.2.2. Coleta dos Esporos	27
3.2.3. Ativação dos Esporos	29
3.2.4. Germinação dos Esporos	30
3.3. Delineamento Experimental e Análise Estatística dos Dados	30

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Efeito da temperatura de Ativação na Germinação dos Esporos	33
4.2. Efeito do pH na Germinação dos Esporos	35
4.3. Efeito da Interação entre Temperaturas de Ativação e pH na Determinação de Esporos ..	38
4.4. Comportamento da Germinação dos Esporos em Relação ao Tempo de Incubação	39
4.4.1. Efeito da Interação entre Temperatura de Ativação e Tempo de Incubação na Germinação dos Esporos	42
4.4.2. Efeito das Interações entre pH e Tempo de Incubação na Germinação de Esporos	44
5. CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
APÊNDICE	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA N°		Página
01	Esquema de esporulação	28
02	Esquema da ativação dos esporos	31
03	Esquema da germinação dos esporos	32

LISTA DE TABELAS

TABELA N°

01	Teste de Tukey para as interações Temperatura x Microrganismos	33
02	Teste de Tukey para as interações pH x Microrganismo	36
03	Teste de Tukey para as interações pH x Temperatura	39
04	Teste de Tukey para as interações Microrganismos x Tempo	40
05	Teste de Tukey para as interações Temperatura x Tempo	43
06	Teste de Tukey para as interações pH x Tempo	44
07	Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de <i>Bacillus brevis</i> (UFC x 10^5 /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação à 60 °C por 10 minutos ...	63
08	Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de <i>Bacillus brevis</i> (UFC x 10^5 /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação à 80 °C por 10 minutos ...	63

- 09 Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus brevis* (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação à 90 °C por 10 minutos ... 66
- 10 Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus subtilis* (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação à 60 °C por 10 minutos ... 66
- 11 Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus subtilis* (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação à 80 °C por 10 minutos ... 67
- 12 Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus subtilis* (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação à 90 °C por 10 minutos ... 67
- 13 Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus coagulans* (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação à 60 °C por 10 minutos ... 68
- 14 Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus coagulans* (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação à 80 °C por 10 minutos ... 68

15	Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de <i>Bacillus coagulans</i> (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação à 90 °C por 10 minutos ...	69
16	Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de <i>Bacillus megaterium</i> (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação à 60 °C por 10 minutos ...	69
17	Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de <i>Bacillus megaterium</i> (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação à 80 °C por 10 minutos ...	70
18	Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de <i>Bacillus megaterium</i> (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação à 90 °C por 10 minutos ...	70
19	Análise de variância	71

EFEITO DA TEMPERATURA DE ATIVAÇÃO, PH E TEMPO DE INCUBAÇÃO NA GERMINAÇÃO DE ESPÓROS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA.

AUTORA: CÉLIA REGINA BERTECHINI GOMES DUQUE

ORIENTADOR: ANTÔNIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

Resumo

O presente trabalho, visou basicamente estudar a influência dos fatores pH, temperatura de ativação e tempo de incubação na germinação dos esporos de bactérias isoladas da fermentação alcoólica.

Para ativação, os esporos de *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus brevis* e *Bacillus megaterium* foram submetidos aos aquecimentos a 60, 80 e 90 °C, em caldo de cana-de-açúcar a pH 4,5, 5,5 e 6,5. Depois do tratamento de ativação, as suspensões de esporos foram resfriadas a aproximadamente 35 °C, e em seguida, pré-incubadas a $35,0 \pm 1,0$ °C por 6 horas. Amostras foram coletadas a 0, 2, 4 e 6 horas, diluídas serialmente, plaqueadas e incubadas a $35,0 \pm 1,0$ °C por 24 horas.

O número de colônias desenvolvidas foi tomado como sendo o número de esporos ativados e germinados.

A análise estatística dos dados permitem concluir que houve uma diminuição no número de esporos germinados, para todas as espécies de *Bacillus* empregadas, com o aumento da temperatura e tempo de incubação, sendo que a ativação a 90 °C provocou uma certa inativação dos mesmos.

Houve também redução no número de esporos germinados para todos os níveis de pH, com o aumento do tempo de incubação, e o pH 4,5 mostrou um efeito inibitório

mais acentuado na germinação dos esporos, exceto para *Bacillus brevis*.

De uma maneira geral, verificou-se que o melhor tratamento para a ativação e germinação dos esporos das quatro espécies investigadas, em meio de caldo de cana-de-açúcar, foi 80 °C e pH 5,5.

EFFECT OF pH, ACTIVATION TEMPERATURE AND INCUBATION TIME ON GERMINATION OF BACTERIA SPORES ISOLATED FROM ALCOHOLIC FERMENTATION PROCESS

AUTHOR: CÉLIA REGINA BERTECHINI GOMES DUQUE

ADVISER: ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

Summary

This study was undertaken to investigate the influence of pH, activation temperature and incubation time on germination of bacteria spores isolated from alcohol fermentation process.

The spores of *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus brevis* and *Bacillus megaterium* were activated by heating them at 60, 80 and 90 °C in sugar-cane-juice at pH 4.5, 5.5 and 6.5.

After the activation treatments the spores suspensions were cooled to 35,0 °C and then pre-incubated at 35,0 ± 1,0 °C for 6 hours. Samples were withdrawn at 0, 2, 4 and 6 hours, serial diluted plated and incubated at 35,0 ± 1,0 °C for 24 hours.

The number of colonies developed was taken as the number of spores activated and germinated.

The statistical analysis of data showed that there was a reduction of the number of spores germinated for all of four species of *Bacillus*, as the temperature of activation and time of incubation increased.

The higher activation temperature (90 °C) showed an inactivation effect on the spores.

There was also a reduction of the spores germinated for all pH levels with the increase of the

incubation time, and pH 4.5 showed a higher inhibitory effect on the spore germination, with exception for *B. brevis* spores.

In the overall, the best treatment for the spores activation and germination in sugar-cane-juice, was 80 °C and pH 5.5, what means that they may germinated if present, in the sugar-cane-juice, at the heat treatment conditions, for a sugar and alcohol production.

1. INTRODUÇÃO

Uma vez que a fermentação alcoólica industrial é realizada sem esterilização do mosto e dos equipamentos, é inevitável a presença de microrganismos contaminantes, que representam um dos problemas tecnológicos mais sérios encontrados na maioria das destilarias de álcool.

Em geral, os microrganismos contaminantes que na maior parte são bactérias, provém do solo, que acompanha a cana-de-açúcar até a indústria. Estes contaminantes provocam uma diminuição no rendimento industrial não só pelo consumo de açúcar, mas também pelo efeito de seus metabólitos como, acetaldeído, glicerol, ácido fórmico, ácido láctico, ácido acético, etc..., sobre a atividade fermentativa da levedura, bem como na viabilidade celular (STARKE et alii, 1952; CARRUTHERS & OLDFIELD, 1965; BEVAN & BOND, 1971; BUCHAN & GIBBONS, 1974; MAIORELLA et alii, 1983). Além disso, a formação de gomas provocada pela infecção aumenta a viscosidade do caldo causando problemas na operação da fábrica sendo esta uma situação de grande comprometimento do rendimento fermentativo (FOSTER,

1969; TILBURY, 1971).

Um dos grandes problemas que vem ocorrendo no processo de produção de álcool é a recontaminação do mosto após passar pelo trocador de calor, onde há um aumento da população bacteriana que chega a atingir centenas e até milhares de vezes. Uma das hipóteses, é que esse aumento seja causado pela germinação de esporos bacterianos que foram ativados pelo tratamento térmico do caldo. Além disso, grande parte das bactérias até agora isoladas da fermentação alcoólica são produtoras de esporos como *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus coagulans* (GALLO, 1989). Desta forma o presente trabalho se propôs a estudar o efeito do pH, da temperatura de ativação e tempo de incubação, na germinação dos esporos dessas bactérias isoladas da fermentação alcoólica, uma vez que esses são fatores fundamentais envolvidos no processo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ativação

Há muito tempo se tem a informação de que suspensões frescas de endosporos bacterianos não germinam, ou germinam pouco, a menos que sejam aquecidos por um determinado tempo. CURRAN & EVANS (1944); CURRAN & EVANS (1945), fizeram os primeiros trabalhos demonstrando sistematicamente que o calor subletal induzia a germinação de esporos dormentes. Mais tarde, outros trabalhos mostraram que esporos também foram ativados através de pH alto ou baixo (KEYNAN et alii, 1964; ISSAHARY et alii, 1970); agentes redutores e pH baixo (KEYNAN et alii, 1964); exposição à soluções de dipicolinato de cálcio (LEE & ORDAL, 1963; KIRK & HAMBLETON, 1982); por dimetil formamida e dimetilsulfoxido (WIDDOWSON, 1967); por aquecimento em vapor d'água (HYATT et alii, 1966) e por radiação ionizante (LEVINSON & HYATT, 1960; GOULD & ORDAL, 1968).

Segundo FINLEY & FIELDS (1962), as condições requeridas para a ativação podem ser muito diferentes para esporos de diferentes espécies, e também entre as diferentes preparações de esporos para uma mesma linhagem, pois algumas linhagens de *Bacillus megaterium* requerem somente poucos minutos a 60 °C para uma ótima taxa de germinação, enquanto microrganismos termofílicos como *Bacillus stearothermophilus* podem requerer até 115 °C ou mais para uma ótima ativação.

MORAN et alii (1990), estudando o efeito de várias temperaturas de ativação na germinação de esporos de *Bacillus* spp., constataram que a 80 °C/10 min. a porcentagem de germinação foi maior que a 90 °C/10 min., 100 °C/10 min. e 100 °C/1,0 min.. Em contraste, RAJARATHINAM et alii (1987), determinaram que os tratamentos de ativação a 90 °C/10 min. e 100 °C/1 min. resultaram em um acentuado aumento na porcentagem de germinação, para esporos de *B. subtilis* e *B. megaterium*, quando comparados com o tratamento a 80 °C/10 min.

Ativação não ocorre em todos os esporos e é dependente do meio de esporulação, composição química do esporo, tempo de estocagem e natureza do agente germinante. Fatores ambientais são também importantes no processo de ativação pelo calor como, por exemplo, a presença de água que é um requerimento que parece ser comum a todos os métodos de ativação. (CURRAN & EVANS, 1945; HYATT &

LEVINSON, 1962; BUSTA & ORDAL, 1964; MORAN et alii, 1990).

KEYNAN et alii (1964), mostraram que a ativação pode ser evitada através do tratamento com pH baixo. Esporos de *Bacillus cereus*, expostos a pH abaixo de 2,0 a 65 °C por 30 minutos ou uma hora, não germinaram na presença de L-alanina e adenosina, os quais são potentes agentes indutores da germinação. Foi encontrado, contudo, que esporos submetidos a 65 °C por poucos minutos em pH 1,0, foram ativados atingindo um máximo de ativação em dez minutos. Quando a incubação foi prolongada, entretanto, a capacidade de germinação em meio rico com L-alanina e adenosina, decresceu em função do tempo.

LEE & ORDALL (1963), relataram que a exposição de esporos ativados a pH baixo revertia o processo e que pouco tempo de exposição a pH baixo induzia ativação, enquanto que uma longa exposição bloqueava a capacidade dos esporos ativados de responderem a germinação na presença de L-alanina e adenosina.

KEYNAN et alii (1964), também demonstraram que esporos de *Bacillus cereus* não foram ativados em valores de pH acima de 8,5 quando aquecidos por uma hora. No entanto, alguns esporos comportaram-se como esporos ativados quando lavados e ressuspensos em pH neutro, e aquecidos por uma hora a 60 °C, indicando que a ativação era inibida em pH alto sem causar injúrias nos esporos. Há contudo, uma considerável variação entre as diferentes

espécies de bactérias. GIBBS (1967), relatou que a ativação de esporos de *Clostridium bifermentans* foi ótima em pH alto e foi inibida em pH baixo.

As propriedades dos esporos ativados dependem do grau de ativação, isto é, esporos ativados a altas temperaturas ou por longos períodos de tempo, germinam mais rapidamente do que aqueles que recebem um tratamento de ativação diminuído (LEE & ORDALL, 1963).

Ativações pelo calor foram geralmente estudadas por exposição dos esporos por um curto período de tempo a temperaturas relativamente altas (65 °C a 70 °C), geralmente acima da temperatura fisiológica ótima para esses microrganismos. Por outro lado, tempos de exposição mais longos são necessários quando se diminui a temperatura (KEYNAN et alii, 1964).

POWELL & HUNTER (1955), constataram que um longo período de aquecimento é necessário para temperaturas inferiores a 55 °C, e que esta poderia ser uma temperatura crítica de ativação. Assim, por exemplo, germinação quase total de esporos de *Bacillus megaterium* ocorreu após 18 horas a 45 °C, e praticamente não houve germinação após 18 horas a 44 °C. Em outros experimentos, suspensões de esporos de *B. megaterium* apresentaram 90% de germinação depois de receberem tratamento de ativação a 60 °C por 30 minutos (POWELL, 1951).

CURRAN & EVANS (1944), relataram que ativação por calor subletal acelerava a germinação de esporos mesofílicos termotolerantes, bem como de esporos aeróbios termofílicos, e que na ausência de tal tratamento, esporos potencialmente viáveis não germinaram. A proporção de esporos que responderam ao estímulo da ativação, mostrou ser dependente da quantidade de calor, da natureza do meio de aquecimento, da temperatura em que os esporos foram formados, e da temperatura em que foram subcultivados. Assim, quando esporos foram plaqueados imediatamente após vários períodos de aquecimento a 95 °C, a contagem de colônias aumentou com o tempo de aquecimento, mais rapidamente durante os primeiros minutos, sendo que em 10 minutos, o processo de ativação foi praticamente completo, enquanto que, um período maior de aquecimento reduziu o número de colônias.

FINLEY & FIELDS (1962), constataram a ocorrência de um fenômeno interessante em duas linhagens de esporos de *B. stearothermophilus*, onde a ativação máxima foi frequentemente alcançada nas temperaturas entre 110 a 115 °C. Entretanto, quando esporos foram aquecidos a 80, 90 e 100 °C, a dormência foi aumentada.

Certos cátions podem interferir na ativação quando presentes durante o aquecimento. SPLITTSTOESSER & FARKAS (1966), demonstraram uma inibição na ativação térmica dos esporos de *Bacillus pomilliae*, na presença de íons

potássio. Metais pesados como ferro e cobre inibiram a ativação de esporos de *Bacillus cereus* T (MURTY & HALVORSON, 1957), e *Bacillus megaterium* (LEVINSON & HYATT, 1955).

HALMANN & KEYNAM (1962), determinaram que as reações de desencadeamento principal para a germinação de esporos de *Bacillus licheniformis* foram inibidas por Ca^{++} e Mg^{++} . Por outro lado, LEVINSON & SEVAG (1953), constataram que a ativação, de esporos de *Bacillus megaterium*, foi estimulada na presença de Ca^{++} , Sr^{++} e Ba^{++} , e que esporos de *Bacillus stearothermophilus* foram ativados na presença de íons hidrogênio.

Ativação térmica pode ser perdida durante o período de armazenagem dos esporos, portanto, é um processo reversível, onde esporos podem ser ativados por um segundo tratamento (POWELL & HUNTER, 1955; CHURCH & HALVORSON, 1957; KEYNAM et alii, 1964; GIBBS, 1967). Segundo KEYNAM et alii (1964), esta reversão pode ser afetada pelas condições ambientais. Assim, por exemplo, a desativação de esporos de *Bacillus cereus* ocorreu lentamente a $4,0^{\circ}\text{C}$ e foi ausente a $20,0^{\circ}\text{C}$, indicando que a reação é dependente da temperatura.

Em alguns casos, desativação também foi induzida quimicamente. HYATT et alii (1966), mostraram que esporos ativados de *Bacillus megaterium* foram desativados pelo álcool absoluto, e puderam ser subsequentemente

reativados por aquecimento.

Já foi determinado que o grau de ativação pelo calor é dependente do pH. Em adição, somente o pH baixo pode também ativar esporos para a germinação. KEYNAM et alii (1964), relataram que incubação prolongada de esporos de *Bacillus cereus* T em tampão de pH baixo, induziu germinação espontânea, e sugeriram que este pode ser um método significativo de quebra da dormência "in nature".

ISSAHARY et alii (1970), mostraram que *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*, que requerem 30 minutos e 3 horas respectivamente para ativação em água destilada, foram completamente ativados durante 12 minutos em pH 1,0 nas mesmas condições de temperatura.

2.2. Processo de Germinação

A germinação foi descrita por alguns autores como uma conversão irreversível de endosporos dormentes em uma célula metabolicamente ativa. Germinação rápida e completa ocorre somente após a ativação e é desencadeada por agentes indutores da germinação, como a L-alanina. (LEVINSON & HYATT, 1955; O'CONNOR & HALVORSON, 1961; KEYNAM et alii, 1964).

A definição clássica de germinação de esporos bacterianos inclui todas as mudanças que os esporos sofrem, no desenvolvimento da forma dormente para a típica

forma vegetativa (POWELL & HUNTER, 1955). Entretanto, outros trabalhos definiram germinação como compreendendo somente as mudanças iniciais dos esporos, envolvendo baixa resistência aos agentes químicos, baixa refratividade, exudação de ácido dipicolínico, aumento na capacidade de coloração, decréscimo na densidade óptica, marcado aumento na atividade metabólica e excreção de peptideoglicano. As mudanças dos esporos subsequentes à germinação (alongamento celular e divisão celular), constituem a fase de desenvolvimento pos-germinativo. (O'BRIEN & CAMPBELL, 1957; LEVINSON & HYATT, 1956; GOULD, 1970; SMOOT & PIERSON, 1982). Estas mudanças já foram bastante demonstradas na germinação de esporos de *Bacillus* e *Clostridium* (LEVINSON & HYATT, 1966; VEHARA & FRANK, 1967; HASHIMOTO et alii, 1969; DRING & GOULD, 1971).

Segundo alguns autores, é provável que certas reações envolvidas com a rápida despolimerização e excreção dos constituintes dos esporos, como ácido dipicolínico, cálcio, manganês e peptidioglicano, ocupem sítios específicos nos esporos durante a germinação. Muitas mudanças observadas na germinação de esporos, como decréscimo na densidade óptica e fase de escurecimento são provavelmente um resultado dessa despolimerização (GOULD, 1970; SMOOT & PIERSON, 1982).

Alguns autores observaram que esporos inicialmente refractíveis perdem rapidamente sua

refratividade, iniciando-se assim a "fase Dark", a microlag e a microgerminação, e após a ocorrência dessas mudanças, iniciam-se então as atividades metabólicas e os esporos germinados entram no estágio de crescimento pos-germinativo e multiplicação (VARY & HALVORSON, 1965; HASHIMOTO et alii, 1969).

Tem recebido grande atenção os estudos a respeito do evento da iniciação da germinação de esporos bacterianos. Algumas referências foram consideradas totalmente discordantes da comunidade científica, com relação à natureza do processo de iniciação, bem como o desencadeamento das reações. DRING & GOULD (1975), levantaram a hipótese de que o desencadeamento das reações seria naturalmente metabólico, baseados na inibição da germinação por agentes inibidores das vias metabólicas. O estudo feito por esses autores, com *Bacillus cereus* indicou que uma grande variedade de inibidores da cadeia de transporte de elétrons e da formação de trifosfato de adenosina, inibiram a germinação.

Outros estudos mostraram que a germinação pode ocorrer na ausência de metabolismo, sugerindo então, que esses inibidores provavelmente estariam afetando alguns estágios tardios na germinação ou no processo de crescimento pos-germinativo (SMOOT & PIERSON, 1982).

Com relação às reações iniciais de desencadeamento da germinação, a hipótese mais aceita,

indica que esse evento é um processo alostérico, ao invés de metabólico. VARY (1978), em seus estudos utilizou agentes germinantes não metabolizáveis, como análogos da glicose, para induzir germinação em esporos de *Bacillus megaterium*. Foi determinado, contudo, que agentes não metabolizáveis foram capazes de induzir germinação sem a necessidade de agentes metabolizáveis.

Outros trabalhos mostraram que sais inorgânicos e agentes quelantes, os quais não são metabolizáveis, agiram como iniciadores da germinação, sugerindo, assim, que o processo de desencadeamento da germinação é um evento físico-químico (LEVINSON & HYATT, 1962; LEVINSON & HYATT, 1966). Alguns autores levantaram a hipótese de que este evento poderia ocorrer em alguns sítios específicos na membrana citoplasmática (FITZ-JAMES, 1971; CHENG & ARONSON, 1978).

Há indícios de que uma grande variedade de estímulos físicos e químicos sejam capazes de induzir a germinação de esporos de diferentes espécies e linhagens de bactérias e, atualmente, tem sido possível a classificação dos iniciadores para os diferentes grupos.

No primeiro grupo estão os nutrientes iniciadores metabolizáveis, os quais incluem, aminoácidos, purina, ribosídeos, bases e açúcares. Dentre estes, o nutriente germinante mais estudado tem sido a L-alanina, que sozinha, ou na presença de determinados íons, pode

causar iniciação da germinação de grande parte dos esporos das espécies de *Bacillus* e *Clostridium*. Iniciadores como a L-alanina são relativamente específicos para certas linhagens ou espécies de bactérias (GOULD, 1970).

O mecanismo, através do qual os aminoácidos iniciam a germinação, não é ainda bem conhecido. Foi sugerido por alguns autores, que a L-alanina desidrogenase, é importante na germinação de esporos, pois cataliza a produção de piruvato e amônia, e a transformação de NADH, para NAD (HALVORSON & CHURCH, 1957; CONNOR & HALVORSON, 1959; CONNOR & HALVORSON, 1960). Estudos realizados com mutantes alanina desidrogenase negativa, mostraram que estes germinaram mais lentamente, na presença de L-alanina do que o tipo selvagem (FREESE et alii, 1964).

Alguns trabalhos sugeriram que L-alanina inicia germinação, ativando alostericamente as enzimas dos esporos, cujo substrato não está relacionado com a L-alanina (WOESE et alii, 1968). Segundo FREESE et alii (1964), a identidade das enzimas alostéricas não está bem estabelecida, mas os possíveis candidatos são as proteases dos esporos, as proteínas iniciadoras e enzimas líticas dos esporos.

Outros nutrientes germinantes, como os ribosídeos (adenosina, inosina, etc...), e açúcares (glicose, frutose, etc...) parecem ter uma forte influência sobre os aminoácidos, induzindo germinação, possivelmente

aumentando a permeabilidade dos esporos para os aminoácidos (WOLF & THORLEY, 1957; HYATT & LEVINSON, 1962; SMOOT & PIERSON, 1982).

Estão incluídos em outro grupo de iniciadores de germinação de esporos, os não nutrientes germinantes (íons metálicos, bicarbonato, surfactantes, dipicolinato de cálcio); os germinantes enzimáticos (subtilisina, lisozima, enzimas líticas dos esporos); e finalmente os germinantes físicos (abrasão e deformação por pressão hidrostática) (RODE & FOSTER, 1960; GOULD et alii, 1966; GOULD, 1970; GOULD & SALE, 1970).

2.3. Fatores que Afetam a Germinação

Uma das características fundamentais dos esporos ativados, é que sua taxa de germinação pode ser controlada ou bloqueada totalmente através da variação de pH, temperatura, potencial de oxidação e redução, tensão de oxigênio, umidade disponível, composição do meio, bem como da concentração de esporos ativados (SMOOT & PIRSON, 1982; MORAN et alii, 1990).

2.3.1. pH

Os valores de pH ótimos para a germinação de esporos variam amplamente e são dependentes da espécie e

linhagem, bem como do germinante utilizado. CHURCH et alii (1954), encontraram que esporos de *Bacillus cereus* T germinaram otimamente na presença de L-alanina em pH 8,0, e mais lentamente em pH 10,0. Esses autores também determinaram que linhagens alcali resistentes de *Bacillus cereus* e *Bacillus circulans* germinaram lentamente a pH 10,3 e pH 11,0 respectivamente. No estudo de WARREN & GOULD (1968), foi determinado taxas ótimas de germinação para *B. cereus* na presença de L-alanina mais O-carbonil-D-serina, na faixa de pH entre 8,0 e 9,0.

WOLF & THORLEY (1957), estudaram o efeito do pH na germinação na presença de glicose e L-alanina, após choque térmico, em linhagens de *Bacillus subtilis* 6281 e 2588. Os resultados mostraram que em presença de glicose, as linhagens 6281 e 2588, germinaram melhor em pH ácido do que em pH neutro e responderam lentamente a pH 8,5, no período de 3 a 5 horas de incubação. Em contraste, nos experimentos com *B. subtilis* 2588, na presença de L-alanina, foi determinado que o pH ótimo era o alcalino, mais próximo de 7,5 do que 8,5. Desta forma, as porcentagens de germinação após 50 horas nos pH 5,5, 7,5 e 8,5, foram 51%, 82% e 46% respectivamente. Segundo esses autores, essa diferença, provavelmente, deve estar relacionada com a distribuição das enzimas necessárias para as várias vias de germinação, uma vez que são diferentes os pH ótimos para as germinações em glicose e em L-alanina.

No estudo feito com *Bacillus megaterium* QMB 551, foi observado uma taxa ótima de germinação, na presença de L-alanina a pH 6,0, mas na presença de glucosamina ou L-prolina, o pH ótimo passou a ser maior que 8,0 (HYATT & LEVINSON, 1962).

O efeito do pH na germinação de esporos de formas anaeróbias, como *Clostridium botulinum* tem atraído muita atenção. Muitos estudos usando vários meios, demonstraram que o pH ótimo para a germinação era em torno de 7,0 (HITZMAN et alii, 1957; ANDO & LIDA, 1970; ROWLEY & FEEHERRY, 1970; ANDO, 1973).

Os menores níveis de pH encontrados como limites para germinação de esporos de *Clostridium botulinum* tipos A e B foram 4,6 e para o tipo E 4,8 (GOULD, 1969). Para outras espécies como *C. sporogenes* e *C. tetani* o pH ótimo para germinação foi de 8,0, em meio quimicamente definido (UEHARA & FRANK, 1967).

2.3.2. Temperatura

Temperatura é um outro fator que afeta a germinação de esporos bacterianos. Em geral, estudos têm mostrado que germinação pode ocorrer a temperaturas fora dos limites ideais para o crescimento de células vegetativas. KNAYSI (1964), determinou que as temperaturas máxima, ótima e mínima para a germinação de esporos de

Bacillus cereus foram 59,0; 30,0 e -1,0 °C, respectivamente. Outros autores encontraram que para algumas espécies de *Bacillus* mesofílicos a temperatura ótima para a germinação foi 50 °C (WOLF & MAHMOUD, 1957).

Uma revisão na literatura indicou que para a maioria de esporos do gênero *Bacillus*, a temperatura de germinação ideal se encontra na faixa entre 30 a 37 °C com pH na faixa de 6,8 a 7,3; variando conforme a espécie (EVANS & CURRAN, 1943; LEE & ORDAL, 1963; LEVINSON & HYATT, 1970; MORAN et alii, 1990).

Esporos de clostridia podem germinar sob uma larga faixa de temperatura. Alguns estudos demonstraram a habilidade dos esporos de *Clostridium botulinum* tipo A germinar a 4 °C (ROWLEY & FEEHERRY, 1970; ANDO, 1973). Para *C. botulinum* tipo E foram encontradas temperaturas abaixo de 4 °C permitindo a germinação de esporos (SCHIMIDT et alii, 1961).

ROWLEY & FEEHERRY (1970), determinaram que a germinação de esporos de *C. botulinum* 62 A, em meio químico definido ocorreu à temperatura acima de 70 °C com um ótimo a 37 °C.

2.3.3. Tensão de Oxigênio

Há alguns estudos relacionados ao efeito do oxigênio e ou potencial de oxirredução (Eh) na germinação

dos esporos bacterianos. Muitos desses estudos afirmam que a germinação de esporos anaeróbios pode, algumas vezes, ser interrompida pelo oxigênio. Há, entretanto, uma grande variabilidade entre espécies do gênero *Clostridium*, com relação a sua habilidade de germinar na presença de oxigênio. ANDO & LIDA (1974), propuseram que o processo de germinação é menos sujeito à inibição pelo oxigênio, do que o subsequente crescimento de células vegetativas. Vários trabalhos mostraram que esporos de clostridia germinaram sob condições de aerobiose (FIELDES, 1930; WYNNE et alii, 1954; GIBBS, 1964). Em contraste, esporos de *C. botulinum*, *C. butyricum* e *C. acetobutylicum* somente germinaram sob condições totalmente anaeróbias (WINNE et alii, 1954; HITZMAN et alii, 1957).

ROTH & LIVELY (1956), demonstraram que a germinação de esporos aeróbicos não é inibida pelo oxigênio, mas pode ser afetada sob condições de anaerobióse.

2.3.4. Atividade de Água (aw)

HAGEN et alii (1967), no estudo do efeito da umidade disponível ou atividade de água (aw) na germinação de esporos, determinaram que com uma baixa aw, nenhuma germinação de esporos bacterianos pode ocorrer. Com uma aw média, somente a germinação acontece, mas não ocorrem as

fases de crescimento pos-germinativo e multiplicação de células vegetativas, e na presença de a_w alta, germinação e suas fases subseqüentes podem ocorrer. Os eventos descritos acima podem variar, dependendo do organismo, mas, em geral, a germinação de esporos, ocorre em valores mais baixos do que aqueles requeridos para crescimento de células vegetativas. Esses autores relataram que esporos de *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* germinaram em valores de a_w abaixo de 0,80, mas somente puderam se multiplicar a níveis de a_w de 0,90 ou maiores.

Esporos de *Clostridium botulinum*, quando plaqueados em condições ótimas para crescimento germinaram a níveis de a_w de 0,85. Foi observado também, que a germinação de esporos de *C. botulinum* tipos A e E, foram mais sensíveis a níveis mais baixos de a_w em valores baixos de pH, do que em valores próximos do ótimo (BAIRD-PARKER & FREAME, 1967).

2.3.5. Composição do Meio de Cultivo

Outro fator que exerce influência na germinação de esporos bacterianos é a composição do meio de cultivo. Os meios favoráveis à germinação de esporos, não são, necessariamente, favoráveis ao crescimento de esporos germinados (HILLS, 1949; SCHIMIT, 1955; STEDMAN, 1956; O'BRIEN & CAMPBELL, 1957; LEVINSON & HYATT, 1960; BAYLISS

et alii, 1981).

Esporos de *Bacillus megaterium* germinaram em glicose, mas não sofreram desenvolvimento pos-germinativo, a menos que uma fonte de enxofre e fosfato fossem adicionadas (HYATT & LEVINSON, 1957).

No estudo com *Bacillus anthracis*, a adenosina estimulou a germinação, mas não estimulou as fases subseqüentes de crescimento (HILLS, 1949).

Outros estudos sobre o efeito da adenosina na germinação de esporos de *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*, mostraram que esporos recentemente germinados foram mais exigentes nutricionalmente do que as células vegetativas (PULVERTAFT & HAYNES, 1951).

AMAH & SAKAGUCHI (1952), estudaram as exigências nutricionais de células vegetativas de esporos de *Bacillus natto*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* I e II, *Bacillus mycoides* e *Bacillus cereus*. Verificaram que as células vegetativas de todas as linhagens de esporos de *B. subtilis* e *B. mycoides* não requereram nenhum dos dezoito aminoácidos testados, entretanto, esporos de *B. natto* requerem isoleucina, esporos de *B. cereus* valina, esporos de *B. megaterium* I alanina e treonina e esporos de *B. megaterium* II requerem fenilalanina.

O'BRIEN & CAMPBELL (1957), estudaram as exigências nutricionais para crescimento pós-germinativo e

crescimento de células vegetativas de *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus cereus* var. *terminalis*. Os resultados mostraram que os requerimentos para germinação e crescimento pós-germinativo de esporos de *B. stearothermophilus* a 55 °C foram leucina, metionina, histidina, arginina, tiamina, ácido nicotínico e biotina. As exigências para células vegetativas foram idênticas, exceto para leucina e ácido nicotínico que não foram requeridos. As exigências para germinação e crescimento pos-germinativo de esporos de *B. coagulans* também diferiram daquelas para células vegetativas, as quais requerem metionina, tiamina, biotina e ácido fólico a 35 e 55 °C. Em adição a esses componentes os esporos requerem ainda, a 55 °C, ácido glutâmico, histidina, isoleucina, leucina, valina. Entretanto leucina não foi essencial para os esporos a 35 °C.

LEVINSON & HYATT (1955), constataram que a germinação de esporos do gênero *Bacillus* pode ser estimulada por calor, L-alanina e manganês. Ambos, L-alanina e manganês estimulam a germinação de esporos de *Bacillus megaterium* sendo que a L-alanina atua rapidamente, realizando o máximo de germinação, enquanto que o manganês realiza germinação apenas após a longa fase lag, alcançando a partir daí alto nível de germinação. Esses autores propuseram que para esporos ativados em presença de manganês, as enzimas proteolíticas promoveram a liberação

de aminoácidos, incluindo a L-alanina, que por sua vez estimula a germinação.

2.3.6. Inibidores Químicos

A procura de substâncias capazes de inibir o desenvolvimento dos esporos para a multiplicação tem sido bastante estudada, entretanto, ainda não se sabe em que estágio da germinação ou do desenvolvimento pos-germinativo, um inibidor particular é efetivo.

Já foi determinado que o processo de desenvolvimento pos-germinativo proporciona numerosas possibilidades para a inibição através dos conhecidos inibidores metabólicos. Por outro lado, SMOOT & PIERSON (1982), determinaram que a germinação somente poderá ser inibida ou retardada através de substâncias ou fatores capazes de interferirem nas reações iniciais de desencadeamento ou no processo degradativo.

Os primeiros esforços para a elucidação do mecanismo de inibição da germinação de esporos envolveu o estudo de agentes germinantes simples, seus derivados e a ação da inibição desses derivativos. WOESE et alii (1958), examinaram a habilidade dos análogos da L-alanina induzir germinação de esporos de *Bacillus subtilis*. Eles determinaram que a germinação foi bem sucedida quando iniciada por L-alanina e seus análogos, e que esta

germinação pode ser inibida por D-alanina e seus análogos. Outros pesquisadores também encontraram resultados semelhantes com D-aminoácidos (HARREL & HALVORSON, 1955; SCHIMIDT et alii, 1961, FEY et alii, 1964; WAX V& FREESE, 1968).

No estudo com esporos de *Clostridium*, alguns autores determinaram inibição da germinação por L-alanina, e indução por D-alanina (UEHARA & FRANK, 1967; ANDO, 1973). Esses resultados estão em desacordo com os de HITZMAN et alii, (1957), onde foi constatado que D-alanina não produziu efeito na germinação de esporos de *Clostridia*, os quais foram inibidos por vários aminoácidos, incluindo L-alanina.

Devido à suposição de que a iniciação da germinação poderia ser um evento metabólico, vários inibidores metabólicos e enzimas inibitórias específicas foram estudados. STEWERT & HALVORSON (1953), relataram que a germinação de esporos de *Bacillus cereus* T, não foi inibida por arsenato, arsenito, borato, cianida ou monoiodo acetato, quando adicionados ao meio de germinação.

MURTY & HALVORSON (1957), não detectaram inibição da germinação de esporos de *Bacillus cereus* T por enzimas semelhantes às inibitórias. Em outro trabalho, determinou-se que a germinação de esporos de *Bacillus thermoacidurans* foi inibida por 2,4 dinitrofenol, arsenato, azida de sódio e iodoacetato (HEILIGMAN et alii, 1956).

Além das enzimas inibitórias, os antibióticos como subtilina, estreptomicina e penicilina foram relatados como inibitórios ineficientes da germinação de esporos de *Clostridium botulinum* (TREADWELL et alii, 1958).

A germinação espontânea de esporos de *Bacillus* sp foi inibida por sais de cobre, ferro, mercúrio, prata, o-fenantrolina saturada ou soluções com pH baixo (LEVINSON & HYATT, 1966; ANDO, 1973).

CURRAN & KNAYSI (1962), em um estudo com inibidores metabólicos constataram que o etanol é um antagonista eficiente na germinação de esporos de *Bacillus subtilis*.

Segundo TRUJILLO & LAIBLE (1970), a atividade do álcool, na germinação de esporos aumenta com o aumento do comprimento da cadeia. Esses autores demonstraram que a inibição da germinação de esporos pelo álcool pode ser revertida através da remoção do álcool do ambiente dos esporos. Foi sugerido então que o álcool age inibindo enzimas requeridas para a germinação.

Várias misturas de agentes químicos inibiram o processo de germinação. PARKER & BRADLEY (1968) e PARKER (1969), determinaram que clorocresol inibiu o início da germinação de esporos de *Bacillus subtilis* em meio nutriente. Entretanto, esta inibição foi completamente revertida quando os esporos foram lavados com água, ou

quando adicionou-se polisorbato (Tween 80) ao meio. Esses autores acreditam que esta reversibilidade é uma evidência de que os inibidores interferem em algumas enzimas requeridas para a germinação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Matéria-Prima

Como matéria-prima foi utilizado mosto, a 10% de ART (g/100 ml), preparado a partir de xarope concentrado de caldo de cana-de-açúcar e esterilizado em autoclave a 1,0 atmosfera de pressão, a 121 °C durante 20 minutos.

3.1.2. Culturas

As bactérias utilizadas nos experimentos foram: *Bacillus subtilis*, *Bacillus brevis*, *Bacillus coagulans* e *Bacillus megaterium*. Estas bactérias foram isoladas de processos fermentativos para a produção de álcool de cana-de-açúcar. Encontram-se conservadas em estado liofilizado, e fazem parte da coleção de bactérias do Departamento de Ciência e Tecnologia Agro-Industrial da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, S.P.

3.2. Métodos

3.2.1. Esporulação

As culturas liofilizadas foram reativadas em tubos de cultura, contendo 10 ml de caldo GLT. Depois de incubadas a 35,0 °C por 24 horas, as culturas foram repicadas e incubadas novamente nas mesmas condições, por mais 24 horas. A partir daí, os esporos foram obtidos através do espalhamento de suspensões das culturas com uma espátula de Drigalsky, em frascos de Roux, contendo meio de cultivo completo para a esporulação (DIFCO 0582). A incubação foi feita em estufa a 35 °C $\pm$ 1,0 °C por um período de 28 dias, ou até que se obtivesse esporulação completa com liberação dos mesmos (Figura 1). A esporulação foi determinada através do método de coloração de WIRTZ (1908), que usa o verde de malaquita e a safranina como corante e contra-corante respectivamente.

3.2.2. Coleta dos Esporos

Inicialmente, os esporos foram suspensos em água destilada esterilizada, a $\pm$ 5,0 °C. Em seguida, as suspensões de esporos foram centrifugadas a 3622,32 G (m/s^2) por 20 minutos. Depois de eliminado o sobrenadante, a massa de esporos foi novamente ressuspensa e centrifugada com

Figura 1— Esquema da esporulação

água, nas mesmas condições acima citadas de forma que a temperatura das suspensões não ultrapassasse $\pm 15,0^{\circ}\text{C}$ após a centrifugação. Esta operação foi repetida por mais 5 vezes com a finalidade de eliminar o máximo possível de "debris" celulares.

Os esporos foram então armazenados em água a 3°C , até o momento de serem utilizados.

3.2.3. Ativação dos Esporos

Para o tratamento de ativação, 1 ml das suspensões de esporos consideradas, foi inoculado em 50 ml de mosto em erlenmeyers de 250 ml, cujos pH foram corrigidos para 4,5, com ácido clorídrico e 5,5 e 6,5 com hidróxido de sódio. Em seguida, foram submetidas ao aquecimento em banho-maria regulado termostaticamente às temperaturas de 60, 80 e 90°C por 10 minutos. Após o aquecimento, as suspensões foram rapidamente resfriadas em água corrente até atingirem a temperatura ambiente. Das suspensões coletou-se amostras (1,0 ml), as quais foram serialmente diluídas e plaqueadas em meio de cultivo PCA (Plate Count Agar-DIFCO 0479), cujos pH eram ajustados previamente com ácido clorídrico e hidróxido de sódio de acordo com o pH das amostras, ou seja, 4,5, 5,5 e 6,5.

As placas foram incubadas a $35,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ e a contagem das mesmas foram feitas após 24 horas de

incubação, em contador de colônias com lupa tipo QUEBEC (Figura 2).

3.2.4. Germinação dos Esporos

Depois do plaqueamento realizado imediatamente após o tratamento de ativação, os erlenmeyers contendo as suspensões foram pré-incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ por 6 horas, sendo que novos plaqueamentos foram realizados de 2 em 2 horas até completar 6 horas de pré-incubação. O meio de cultivo e as condições de incubação foram as mesmas citadas anteriormente (Figura 3).

Cada tratamento foi realizado independentemente e em triplicata.

3.3. Delineamento Experimental e Análise Estatística dos Dados

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial $4 \times 3 \times 3 \times 4$, para a análise da capacidade de germinação dos esporos. Para se constatar diferenças entre as médias foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade (GOMES, 1985).

O esquema de análise de variância é apresentado na tabela 19 do apêndice.

Figura 2 – Esquema da ativação dos esporos

Pré-incubação das suspensões de esporos ativados, por 6 horas a 35°C

Plaqueamentos realizados de 2 em 2 horas até completar 6 horas de pré-incubação

Incubação das placas

35°C/24 horas

Contagem do número de colônias

Figura 3 – Esquema da germinação dos esporos

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das contagens do número de esporos germinados das espécies de *Bacillus* estudadas, submetidos aos diferentes tratamentos de pH, temperaturas de ativação e tempos de incubação, encontram-se nas Tabelas 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18 do apêndice.

Na Tabela 19 do apêndice, é apresentada a análise de variância com seus respectivos níveis de significância.

4.1. Efeito da Temperatura de Ativação na Germinação dos Esporos

Os valores médios obtidos no estudo da influência da temperatura de ativação na germinação dos esporos são apresentados na Tabela 1.

De uma forma geral, os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que para a maioria das espécies estudadas, a temperatura de ativação é um fator que exerce marcada influência na capacidade germinativa dos esporos, pois houve uma queda significativa no número de

Tabela 1 - Teste de Tukey para as Interações
Temperatura X Microrganismos

MICRORGANISMO	TEMPERATURA			MÉDIAS
	60 °C	80 °C	90 °C	
<i>B. subtilis</i>	154,25 ^{Ba}	138,72 ^{Ab}	87,64 ^{Ac}	126,87 ^B
<i>B. megaterium</i>	186,97 ^{Aa}	146,78 ^{Ab}	85,97 ^{Ac}	139,91 ^A
<i>B. brevis</i>	82,81 ^{Ca}	75,31 ^{Ba}	48,94 ^{Cb}	69,02 ^C
<i>B. coagulans</i>	88,72 ^{Ca}	72,28 ^{Bb}	60,61 ^{Bc}	73,87 ^C
MÉDIAS	128,19 ^a	108,27 ^b	70,79 ^c	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

esporos germinados à medida que se aumentou a temperatura de ativação de 60 para 80 e 90 °C, exceto para *Bacillus brevis* que não diferiu entre 60 °C e 80 °C, mas que também apresentou um decréscimo significativo a 90 °C.

Estes resultados diferem daqueles encontrados por RAJARATHIMAN et alli (1987), que constataram que 90 °C por 10 minutos e 100 °C por 1,0 minuto foram temperaturas de ativação ideais para *B. subtilis* e *B. megaterium*. Em contraste, MORAN et alli (1990), determinaram uma maior porcentagem de germinação a 80 °C por 10 minutos para *Bacillus* spp. Segundo esses autores, essas discrepâncias podem estar relacionadas às condições de esporulação

empregadas, às linhagens diferentes, e à natureza do agente indutor de germinação utilizado.

Um fator importante que poderia justificar o fato da maior taxa de germinação ter ocorrido com o tratamento de ativação a 60 °C por 10 minutos, deve estar ligado à presença de eventuais células vegetativas presentes no inóculo inicial, que não foram destruídas durante o tratamento térmico de ativação a essa temperatura, o que certamente ocorre, quando se utiliza 80 ou 90 °C por 10 minutos, pois segundo KELLY & KROLL (1987), 90 °C por 10 minutos foi suficiente para a destruição das células vegetativas de *Bacillus* spp, e ANDRADE & SERRANA (1990), utilizaram 10 minutos a 80 °C para destruição de células vegetativas de *Bacillus subtilis*.

No presente caso, 80 °C por 10 minutos poderia ser considerado o melhor tratamento de ativação para os esporos das espécies de *Bacillus* estudadas, nas condições empregadas, uma vez que o tratamento a 90 °C por 10 minutos causou uma diminuição estatisticamente significativa, no número de esporos germinados em relação ao tratamento a 80 °C por 10 minutos.

4.2. Efeito do pH na Germinação dos Esporos

Os valores médios obtidos no estudo da influência do pH na germinação dos esporos são apresentados

na Tabela 2.

Tabela 2 - Teste de Tukey para as Interações pH x Microorganismos

MICROORGANISMO	pH			MÉDIAS
	4,5	5,5	6,5	
<i>B. subtilis</i>	94,00 ^{Bb}	145,75 ^{Ba}	140,86 ^{Aa}	126,87 ^B
<i>B. megaterium</i>	117,33 ^{Ac}	164,75 ^{Aa}	137,64 ^{Ab}	139,91 ^A
<i>B. brevis</i>	63,83 ^{Ca}	69,67 ^{Da}	73,56 ^{Ba}	69,02 ^C
<i>B. coagulans</i>	55,14 ^{Cb}	82,53 ^{Ca}	83,94 ^{Ba}	73,87 ^C
MÉDIAS	82,58 ^C	115,67 ^a	109,00 ^b	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados apresentados na Tabela 2, mostram que para os esporos da maioria das espécies estudadas, o pH 4,5 exerceu efeito inibitório na capacidade germinativa, exceto para *B. brevis* cuja diferença entre os três níveis de pH não foi significativa.

Analisando cada espécie isoladamente, não se constatam diferenças estatisticamente significativas entre o efeito dos níveis de pH 5,5 e 6,5 na germinação dos esporos de *B. subtilis*, *B. brevis* e *B. coagulans*, no entanto, para *B. megaterium* estas diferenças foram

significativas nos três níveis de pH estudados.

Os resultados médios do comportamento dos esporos das espécies em estudo, indicam que o pH 5,5 é o mais favorável, para as condições de germinação empregadas, uma vez que se observa uma certa inibição da germinação, tanto no pH 4,5 como no pH 6,5, sendo que no pH 4,5 a inibição foi mais acentuada.

Estes resultados não concordam com aqueles encontrados por alguns autores, que determinaram que a faixa de pH ideal para a germinação, da maioria das espécies de *Bacillus*, encontra-se entre 6,8 a 7,3, variando conforme a espécie (EVANS & CURRAN, 1943; LEE & ORDAL, 1963; LEVINSON & HYATT, 1970; MORAN et alli, 1990).

LEVINSON & HYATT (1956); WOLF & THORLEY (1957); HYATT & LEVINSON (1962); MORAN et alli (1990) determinaram que o comportamento dos esporos de bactérias, com relação aos pH, pode ser bastante variável, dependendo da composição do meio de germinação. Segundo esses autores essas diferenças devem estar relacionadas com a distribuição das enzimas necessárias para as várias vias de germinação, uma vez que são diferentes os pH ótimos para a germinação das mesmas linhagens de *Bacillus*, dependendo da composição do meio. Assim, por exemplo, WOLF & THORLEY (1957), comparando o efeito do pH na germinação na presença de glicose e L-alanina, em duas linhagens de *B. subtilis*, constataram que na presença de glicose, as linhagens

germinaram melhor em pH ácido, enquanto que na presença de L-alanina o pH ótimo foi o alcalino.

No presente caso, as diferenças encontradas refletem o efeito exclusivamente dos níveis de pH estudados, uma vez que o meio de germinação foi o mesmo para todos os microrganismos empregados.

4.3. Efeito da Interação entre Temperatura de Ativação e pH na Germinação dos Esporos

Os valores médios obtidos no estudo da influência da interação, temperatura de ativação x pH na germinação de esporos, são apresentados na Tabela 3.

Os resultados apresentados na Tabela 3 indicam que de uma maneira geral houve um decréscimo estatisticamente significativo ($P = 0,05$) na germinação dos esporos com o aumento da temperatura de ativação para os três níveis de pH estudados.

Analisando-se o efeito dos pH com relação as diferentes temperaturas, verifica-se que não houve diferença significativa entre os níveis de pH 5,5 e 6,5, para os tratamentos de ativação a 60 e 80 °C. Entretanto, para o pH 4,5, verifica-se um decréscimo estatisticamente significativo na germinação dos esporos, para as três temperaturas estudadas, sendo que a 90 °C este efeito foi mais acentuado.

Tabela 3 - Teste de Tukey para as Interações pH x Temperatura

TEMPERAT.	pH			MÉDIAS
	4,5	5,5	6,5	
60 °C	102,17 ^{Ab}	143,17 ^{Aa}	139,23 ^{Aa}	128,19 ^A
80 °C	86,25 ^{Bb}	118,90 ^{Ba}	119,67 ^{Ba}	108,27 ^B
90 °C	59,31 ^{Cc}	84,96 ^{Ca}	68,10 ^{Cb}	70,79 ^C
MÉDIAS	82,58 ^c	115,67 ^a	109,00 ^b	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Estes resultados estão de acordo com aqueles de LEE & ORDALL (1962), que constataram que a inibição da germinação de esporos através de pH baixo é dependente do tratamento de ativação. Assim, por exemplo, esporos de *B. megaterium* ativados a temperaturas altas germinaram a pH 5,0 mas não germinaram a pH 4,0.

4.4. Comportamento da Germinação dos Esporos em Relação ao Tempo de Incubação

Os valores médios resultantes do estudo da

influência do tempo de incubação na germinação dos esporos. são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Teste de Tukey para as Interações
Microorganismo x Tempo

MICROORGANISMO	TEMPO				MÉDIAS
	0	2	4	6	
<i>B. subtilis</i>	136,41 ^{Aa}	128,81 ^{Aab}	124,81 ^{Bab}	117,44 ^{Ab}	126,87 ^B
<i>B. megaterium</i>	148,37 ^{Aa}	136,81 ^{Aab}	148,22 ^{Aa}	126,22 ^{Ab}	139,91 ^A
<i>B. brevis</i>	82,70 ^{Ba}	71,26 ^{Bab}	64,63 ^{Cbc}	57,48 ^{Bc}	69,02 ^C
<i>B. coagulans</i>	92,52 ^{Ba}	77,67 ^{Bb}	66,26 ^{Cbc}	59,04 ^{Bc}	73,87 ^C
MÉDIAS	115,00 ^a	103,64 ^b	100,98 ^b	90,05 ^c	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados apresentados na Tabela 4 mostram que houve uma diminuição significativa no número de esporos germinados, para todas as espécies estudadas, à medida que se aumentou o tempo de pré-incubação de zero para 6 horas.

Analisando-se as médias relacionadas com os tempos, observa-se que não houve diferença significativa ($P = 0,05$), na germinação dos esporos para os tempos 2 e 4

horas de pré-incubação, mas para 6 horas, o decréscimo da capacidade germinativa foi estatisticamente significativo em relação aos demais tempos.

Numa análise comparativa das médias, com relação ao comportamento das espécies, observa-se que *B. brevis* e *B. coagulans*, tiveram um comportamento semelhante, ou seja, não apresentaram diferenças significativas a 5% de probabilidade. Entretanto, essas espécies diferiram de *B. subtilis* e *B. megaterium* que, por sua vez, também apresentaram diferença significativa entre si para o tempo de 4 horas de incubação.

Os resultados indicam, portanto, que a maior taxa de germinação ocorreu imediatamente após o tratamento de ativação, ou seja, no tempo zero hora, sendo que nos tempos entre 2, 4 e 6 horas, alguns fatores devem ter interferido no processo. Estes dados são concordantes com aqueles de WOLF & THORLEY (1957), que estudando o efeito de vários agentes indutores de germinação para vinte linhagens de *B. subtilis* constataram que o tempo de germinação é bastante variável, dependendo do agente indutor de germinação e da linhagem empregada e concluíram que para cada linhagem e espécie podem existir diferentes padrões de tempo de germinação, como resultado da diferente distribuição de enzimas necessárias às várias vias de germinação. Por outro lado, MORAN et alli (1990), encontraram que o tempo de incubação posterior à ativação

não apresentou diferença significativa entre 30 e 60 minutos de incubação para *Bacillus* sp, empregando-se L-alanina como agente indutor de germinação.

Desta forma, o fato verificado de que houve uma queda na taxa de germinação com o tempo de pré-incubação pode estar relacionado com a falta de agentes indutores da germinação, no caldo de cana-de-açúcar usado nos experimentos.

4.4.1. Efeito da interação entre Temperatura de Ativação de Tempo de pré-incubação na Germinação dos Esporos

Os valores médios obtidos no estudo da interação da temperatura de ativação e tempo de pré-incubação na germinação são apresentados na Tabela 5.

Os resultados apresentados na Tabela 5, mostram que de um modo geral, houve uma diminuição significativa na germinação dos esporos com o tempo de pré-incubação para as três temperaturas experimentadas, sendo que entre 2 e 4 horas de pré-incubação, a diferença foi significativa.

Tabela 5 - Teste de Tukey para as Interações
Temperatura x Tempo

TEMPERAT.	TEMPO				MÉDIAS
	0	2	4	6	
60 °C	156,14 ^{Aa}	129,17 ^{Ab}	118,03 ^{Ac}	109,42 ^{Ac}	128,19 ^A
80 °C	113,75 ^{Ba}	112,75 ^{Ba}	108,94 ^{Aa}	97,64 ^{Bb}	108,27 ^B
90 °C	75,11 ^{Ca}	69,00 ^{Cab}	75,97 ^{Ba}	63,08 ^{Cb}	70,79 ^C
MÉDIAS	115,00 ^a	103,64 ^b	100,98 ^b	90,05 ^c	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Pode ser observado também que para a temperatura de 60 °C, após 6 horas de pré-incubação a inibição da germinação foi maior do que para as demais temperaturas (80 e 90 °C), sendo que a menor inibição da germinação em relação ao tempo de pré-incubação ocorreu para a temperatura 90 °C.

4.4.2. Efeito das Interações entre pH e Tempo de pré-incubação na Germinação dos Esporos

Os valores médios obtidos no estudo da relação entre pH e tempo de incubação na germinação dos esporos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Teste de Tukey para as Interações pH x Tempo

pH	TEMPO				MÉDIAS
	0	2	4	6	
4,5	95,14 ^{Ca}	81,17 ^{Cb}	85,33 ^{Bab}	68,67 ^{Bc}	82,58 ^C
5,5	131,86 ^{Aa}	122,11 ^{Aab}	112,47 ^{Ab}	96,25 ^{Ac}	115,67 ^A
6,5	118,00 ^{Ba}	107,64 ^{Bab}	105,14 ^{Ab}	105,22 ^{Ab}	109,00 ^B
MÉDIAS	115,00 ^a	103,64 ^b	100,98 ^b	90,05 ^c	

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna e letras minúsculas iguais na mesma linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Analisando os dados da Tabela 6, observa-se que para todos os níveis de pH experimentados houve uma diminuição do número de esporos germinados com o tempo de pré-incubação, sendo que a maior taxa germinação ocorreu para o pH 5,5, enquanto que para o pH 4,5, este número foi

menor para todos os tempos de pré-incubação, indicando assim, que este nível de pH exerceu um efeito inibitório, estatisticamente significativo. Já para o nível de pH 6,5, a diminuição do número de esporos germinados só foi significativa a partir de 4 horas de pré-incubação.

Estes dados são concordantes com aqueles de LEE & ORDALL (1963) e de KEYNAN et alli (1967), que relataram que esporos a pH baixo, revertiam o processo, e que, uma exposição prolongada provocava o bloqueio da capacidade destes responderem à germinação, mesmo na presença de L-alanina e adenosina.

5. CONCLUSÕES

A análise dos dados leva às conclusões que se seguem:

1. De um modo geral, o aumento da temperatura de ativação provocou uma diminuição significativa no número de esporos germinados, para todas as espécies de *Bacillus* empregadas.

2. O tratamento de ativação a 90 °C, foi o que apresentou o menor número de esporos germinados, para as quatro espécies, indicando que esta temperatura provocou uma certa inativação dos mesmos.

3. Para *B. subtilis*, *B. coagulans* e *B. megaterium*, o nível de pH 4,5, mostrou um efeito inibitório na germinação dos esporos, entretanto para *B. brevis*, não houve diferença significativa entre o número de esporos germinados para os três níveis de pH.

4. Somente para a espécie *B. megaterium*, o número de esporos germinados no pH 5,5, foi estatisticamente superior ao do pH 6,5.

5. O efeito conjunto do pH e temperatura, foi mais acentuado para o pH mais baixo (pH 4,5) e para temperaturas mais elevadas (90 °C).

6. As espécies, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. brevis* e *B. coagulans* tiveram uma redução no número de esporos germinados com o tempo de pré-incubação.

7. Houve uma redução do número de esporos germinados para todos os níveis de pH, com o aumento do tempo de incubação para as quatro espécies de bacilos.

8. Os dados do presente trabalho, mostram que o melhor tratamento para a ativação e germinação dos esporos das espécies investigadas, foi 80 °C e pH 5,5, o que demonstra a possibilidade de germinação desses esporos nas condições de tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar para a produção de álcool e de açúcar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDO, Y. & LIDA, H. Factors affecting the germination of spores of *Clostridium botulinum* type E. *Japan J. Microbiol.* 14 : 361 - 370, 1970.

ANDO, Y. Studies on germination of spores of Clostridial species capable of causing food poisoning. I. Factores affecting the germination of spores of *Clostridium botulinum* type A in a chemically defined medium. *J. Food Hyg. Soc. Japan.* 14 : 457 - 461, 1973.

ANDRADE, N.J. & SERRANO, A.M. O uso de esporos de *Bacillus subtilis* ATCC 19659 para avaliar a eficiência do hipoclorito de sódio. 1 - Ação do hipoclorito sobre esporos armazenados a diferentes condições. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 10 : 174 - 184, 1990.

BAIRD - PARKER, A.C. & FREAME, B. Combined effect of water activity, pH, and temperature on the growth of *Clostridium botulinum* from spore and vegetative cell inocula. *J. Appl. Bacteriol.* 30 : 420, 1967.

BAYLISS, C.E.; WAITES, W.M.; KING, N.R. Resistance and structure of spore of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* 50 : 379 - 390, 1981.

BEVAN, D. & BOND, J. Microorganisms in the field and mill - a preliminary survey *Queensland. Soc. sugar Cane Tech. Proc.* 38 : 137 - 143, 1971.

BUCHAN, R.E. & GIBBONS, N.E. *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*. 8 ed.; Williams and Wilkins Co. Baltimore. p. 1246, 1974.

CARRUTHERS, A. & OLDFIELD, J.F.T. The activity of thermophilic in sugar beet diffusion systems *British sugar. corporation. S. Proc.* 1965.

CHENG, Y.E.; FITZ - JAMES, P.; ARONSON, A.I. Characterization of a *Bacillus cereus* protease mutant defective in a early stage of spore germination. *J. Bacteriol.* 133 : 336 - 344, 1978.

CHURCH, B.D.; HALVORSON, H.; HALVORSON, H.O. Studies on spore germination : Its independence from alanine racenase activity. *J. Bacteriol.* 68 : 393 - 399, 1954.

CHURCH, B.D. & HALVORSON, H. Intermediate metabolism of aerobic spores. I. Activation of glucose oxidation in spores of *Bacillus cereus* var. *terminalis*. *J. Bacteriol.* 73 : 470 - 476, 1957.

CURRAN, H.R. & EVANS, F.R. Heat activation inducing germination in the spores of thermophilic aerobic bacteria. *J. Bacteriol.* 47 : 437, 1944.

CURRAN, H.R. & EVANS, F.R. Heat activation inducing germination in the spores of thermotolerant and thermophilic aerobic bacteria. *J. Bacteriol.* 49 : 335 - 346, 1945.

CURRAN, H.R. & KANAYSI, G. Survey of fourteen metabolic inhibitors for their effect on endospore germination in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 92 : 793 - 797, 1962.

DRINK, G.J. & GOULD, G.W. Electron transport-linked metabolism during germination of *Bacillus cereus* spores. *J. Gen. Microbiol.* 98 : 488 - 494, 1975.

DRING, G.J. & GOULD, G.W. Sequence of events during rapid germination of spores of *Bacillus cereus*. *J. Gen. Microbiol.* 65: 101 - 104, 1971.

FEY, G.; GOULD, G.W.; HITCHENS, A.D. Identification of D-alanine as the auto-inhibitor of germination of *Bacillus globigii* spores. *J. Gen. Microbiol.* 35: 229, 1964.

FINLEY, N. & FIELDS, M.L. Heat activation and heat-induced dormancy in *Bacillus stearothermophilus* spores. *Appl. Microbiol.* 10 : 231 - 236, 1962.

FITZ-JAMES, P.C. Formation of protoplasts from resting spores. *J. Bacteriol.* 105 : 1119 - 1136, 1971.

FOSTER, D.H. Sugar processing difficulties. *Aust. Sugar J.* 60: 529 - 531, 1969.

FREESE, E.; PARK, S.W.; CASHEL, M. The developmental significance of alanine dehydrogenase in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 51: 1164 - 1172, 1964.

GALLO, C.R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. Campinas, 1989. 388p. (Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP).

GIBBS, P.A. Factores affecting germination of spores of *Clostridium bifermentans*. *J. Gen. Microbiol.* 37 : 41 - 48, 1964.

GIBBS, P.A. The activation of spores of *Clostridium bifermentans*. *J. Gen. microbiol.* 46: 285-291, 1967.

GOULD, G.W. Germination and the problems of dormancy. *J. Appl. Bacteriol.* 33 : 34 - 39, 1970.

GOMES, F.P. Curso de estatística experimental. 11 ed. Piracicaba, Nobel 466 p., 1985.

GOULD, G.W.; HITCHENS, A.D.; KING, W.L. Function and location of a "germination enzyme" in spores of *Bacillus cereus*. *J. Gen. Microbiol.* 44 : 293 -302, 1966.

GOULD, G.W. & ORDAL, Z.J. Activation of spores of *Bacillus cereus* by γ -radiation. *J. Gen. Microbiol.* 50: 77 - 84, 1968.

GOULD, G.W. & SALE, J.H. Initiation of germination of bacterial spores by hidrostatic pressure. *J. Gen. Microbiol.* 60 : 335 - 346, 1970.

GODDART, D.R. The reversible heat activation inducing germination and increased respiration in the ascospores of *Neurospora tetrasperma*. *J. Gen. Phiscol.* 19 : 45 - 60, 1935.

HALMANN, M. & KEYNAN, A. stages in germination of spores of *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 84: 1187 - 1193, 1962.

HALVORSON, H. & CHURCH. Intermediat metabolism of aerobic spores. II. The relation ship between oxidative metabolism and germination. *J. appl. Bacteriol.* 20: 359 - 372, 1957.

HANGEN, C.A.; HAWRYLEWICZ, E.J.; EHRLICH, R. Survival of microorganisms in a simulated martian environment. II moisture and oxigen requeriments of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* var. *niger* spores. *Appl. Microbiol.* 15 : 285 - 291, 1967.

HARRELL, W.K. & HALVORSON, H.O. Studies on the role of L-alanine in the germination of spores of *Bacillus terminalis*. *J. Bacteriol.* 69 : 275 - 279, 1955.

HASHIMOTO, T.; FRIEBEN, W.R.; CONTI, S.F. Microgermination of *Bacillus cereus* spores. *J. Bacteriol.* 100 : 1385 - 1392, 1969.

HEILIGMAN, F.; DESROSIER, N.W.; BROUMAND, H. spore germination. II inhibitors. *Foods Res.* 21 : 70 - 74, 1956.

HILLS, G.M. Chemical factors in the germination of spore-bearing aerobes. The effects of amino-acids on the germination of *Bacillus anthracis*, with some observations on the relation of optical form to biological activity. *Biochem. J.* 45 : 363 - 379, 1949.

HITZMAN, D.O.; HALVORSON, H.O.; UKITA, T. Requirements for production and germination of spores of anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.* 74 : 1 - 7, 1957.

HYATT, M.T.; HOLMES, P.K.; LEVINSON, H.S. Activation of *Bacillus megaterium* spore germination by water in the vapor phase. *Biochem. Res. Commun.* 24 : 701 - 704, 1966.

HYATT, M.T. & LEVINSON, H.S. Conditions affecting *Bacillus megaterium* spore germination in glucose or various nitrogenous compounds. *J. Bacteriol.* 83 : 1231 - 1237, 1962.

HYATT, M.T. & LEVINSON, H.S. Sulfur requirements for post-germinative development of *Bacillus megaterium* spores. *J. Bacteriol.* 74 : 87 - 93, 1957.

ISSAHARY, G.; EVENCHIK, Z.; KEYNAN, A. Low-pH activation of *Bacillus cereus* spores. *J. Bacteriol.* 101 : 418 - 422, 1970.

KELLY, A.F. & KROLL, R.G. Use of the direct epifluorescent filter technique for the enumeration of bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriol.* 63 : 545 - 550, 1987.

KEYNAN, A.; EVENCHIK, Z.; HALVORSON, H.O.; HASTINGS, J.W. Activation of bacterial endospores. *J. Bacteriol.* 88 : 313 - 318, 1964.

KIRK, B. & HAMBLETON, R. Optimized dipicolinate activation for viable counting of *Bacillus stearothermophilus* spores. *The society for Applied Bacteriol.* 53 : 147 - 154, 1982.

- KNAYSI, G. Effect of temperature on the rate of germination in *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 87 : 619 - 622, 1964.
- KNIGHT, B.C.G. & FILDES, P. Oxidation-reduction studies in relation to bacterial growth. III. The positive limit of oxidation-reduction potential required for the germination of *B. tetani* spores "in vitro". *Biochem. J.* 24 : 1496, 1930.
- LEE, W.H. & ORDAL, Z.J. Reversible activation for germination and subsequent changes in bacterial spores. *J. Bacteriol.* 85 : 207 - 271, 1963.
- LEVINSON, H.S. & HYATT, M.T. The stimulation of germination and respiration of *Bacillus megaterium* spores by manganese, L-alanine and heat. *J. Bacteriol.* 70 : 368 - 374, 1955.
- LEVINSON, H.S. & HYATT, M.T. Correlation of respiratory activity with phases of spore germination and growth in *Bacillus megaterium*, as influenced by manganese and L-alanine. *J. Bacteriol.* 72 : 176 - 183, 1956.
- LEVINSON, H.S. & HYATT, M.T. Some effects of heat and ionizing radiation on spores of *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 80 : 441 - 451, 1960.

LEVINSON, H.S. & HYATT, M.T. Nitrogenous compounds in germination and post-germination development of *Bacillus megaterium* spores. *J. Bacteriol.* 83 : 1224 - 1230, 1962.

LEVINSON, H.S. & HYATT, M.T. Sequence of events during *Bacillus megaterium* spore germination. *J. Bacteriol.* 91 : 1811 - 1818, 1966.

LEVINSON, H.S. & HYATT, M.T. Effects of temperature on activation, germination and outgrowth of *Bacillus megaterium* spores. *J. Bacteriol.* 101 : 58 - 64, 1970.

LEVINSON, H.S. & SEVAG, M.G. Stimulation of germination and respiration of the spores of *Bacillus megaterium* by manganese and monovalent ions. *J. Gen. Physiol.* 36 : 617 - 629, 1953.

MAIDORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Byproduct inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and bioengineering.* 25 : 103 - 121, 1983.

MORAN, L.; ROWE, M.T.; HAGAN, J.A. The effects of various heat activation treatments on fast intermediate and slow germinating spores of *Bacillus* spp. *Letters in Appl. Microbiol.* 10 : 43 - 46, 1990.

MURTY, G.G. & HALVORSON, H.O. Effects of duration of heating, L-alanine and spore concentration on the oxidation of glucose by spores of *Bacillus cereus* var. *terminalis*. *J. Bacteriol.* 73 : 235 - 240, 1957.

O'BRIEN, R.T. & CAMPBELL, JR.L.L. The nutritional requirements for germination and outgrowth of spores and vegetative cell growth of some aerobic spore forming bacteria. *J. Bacteriol.* 73 : 522 - 525, 1957.

O'CONNOR, R.J. & HALVORSON, H.O. Intermediate metabolism of aerobic spores. IV. Alanine deamination during germination of spores of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* 78 : 844 - 851, 1959.

O'CONNOR, R.J. & HALVORSON, H.O. Intermediate metabolism of aerobic spores. V. the purification and properties of L-alanine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 91 : 200 - 209, 1960.

O'CONNOR, R.J. & HALVORSON, H.O. L-alanine dehydrogenase : A mechanism controlling the specificity of amino acid-induced germination of *Bacillus cereus* spores. *J. Bacteriol.* 82 : 706 - 713, 1961.

PARKER, M.S. & BRADLEY, T.J. A reversible inhibition of the germination of bacterial spores. *Can. J. Microbiol.* 14 : 745 - 746, 1968.

PARKER, M.S. Some effects of preservatives on the development of bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.* 32 : 322 - 328, 1969.

POWELL, J.F. The sporulation and germination of a strain of *Bacillus megaterium*. *J. Gen. Microbiol.* 13 : 59 - 67, 1951.

POWELL, J.F. & HUNTER, J.R. Spore germination in genus *Bacillus* : The modification of germination requirements as a result of pre heating. *J. Gen. Microbiol.* 13 : 59 - 67, 1955.

PULVERTAFT, R.J.V. & HAYNES, J.A. Adenosine spore germination : Phases contrast studies. *J. Gen. Microbiol.* 13 : 474 - 480, 1951.

RODE, L.J. & FOSTER, J.W. Mechanical germination of bacterial spores. *Proc. Natl. Acad. U.S.* 46 : 118 - 128, 1960.

ROTH, N.G. & LIVELY, D.H. Germination of spores of certain aerobic bacilli under aerobic conditions. *J. Bacteriol.* 71 : 162, 1956.

ROWLEY, D.B. & FEEHERRY, F. Conditions affecting germination of *Clostridium botulinum* 62 A spores in a chemical defined medium. *J. Bacteriol.* 104 : 1151 - 1157, 1970.

SCHIMIDT, C.F. The resistance of bacterial spores with reference to spore germination and its inhibition. *Ann. Rev. Microbiol.* 387 - 400, 1955.

SCHIMIDT, C.F.; LECHOWICH, R.V.; FOLINAZZO, J.F. Growth and toxin production by type E *Clostridium botulinum* below 40 °F. *J. FOOD SCI.* 26 : 626, 1961.

SMOOT, L.A. & PIERSON, M.D. Inhibition and control of bacterial spore germination. *J. of Food Protection* 45 (1): 84 - 92, 1982.

SPLITTSTOESSER, D.F. & FARKAS, D.F. Effect of cations on activation of *Bacillus popilliae* spores. *J. Bacteriol.* 92 : 995 - 1001, 1966.

STARKE, J.B.; GOODBAN, A.E.; OWENS, H.S. Composition of certain diffusion juices from the 1952 campaign. *Proc. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* 688 - 691, 1952.

STEDMAN, R.L. Biochemical aspects the bacterial endospore formation and germination. *Am J. Pharm.* 128 : 84 - 97, 1956.

STEWERT, B.T. & HALVORSON, H.O. Studies on the spores of aerobic bacteria : I. The occurrence of alanine racemase. *J. Bacteriol.* 65 : 160, 1953.

TILBURY, R.H. Dextrans and dextranase. *Proc. I.S.S.C.T. XIV Congress*, P. 1444 - 1459, 1971.

TREADWELL, P.E.; JANN, G.A.; SALLE, A. Studies on factors affecting the rapid germination of spores of *Clostridium botulinum*. *J. Bacteriol.* 76 : 549 - 556, 1958.

TRUJILLO, R. & LAIBLE. Reversible inhibition of spore germination by alcohols. *Appl. Microbiol.* 20 : 620 - 623, 1970.

UEHARA, M. & FRANK, H.A. Sequence of events during germination of putrefractive anaerobe 3679 spore. *J. Bacteriol.* 94 : 506 - 511, 1967.

VARY, J.C. & HALVORSON, H.O. Kinetics of germination of *Bacillus* spores. *J. Bacteriol.* 89 : 1340 - 1347, 1965.

WARREN, S.C. & GOULD, G.W. *Bacillus cereus* spore germination absolute requirement for an amino acid. *Biochem. Biophys. Acta.* 170 : 341 - 350, 1968.

WAX, R & FREESE, E. Initiation of the germination of *Bacillus subtilis* spores by a combination of compounds in place of L-alanine. *J. Bacteriol.* 95: 433 - 438, 1968.

WIDDOWSON, J.P. *Bacillus pantothenicus* spores activated by dimethylformamide and dimethylsulfoxide. *Nature* 214 : 812 - 813, 1967.

WIRTZ, R. Ein Einfache Art der Sporenfarbung. *Centbl. Bakt., J Abt., Orig.* 46: 8-727, 1980.

WOESE, C.R.; MOROWITZ, H.Z.; HUTCHISON, C.A. Analysis of action of L-alanine analogues in spore germination. *J. Bacteriol.* 76 : 578 - 588, 1958.

WOESE, C.R.; VARY, J.C.; HALVORSON, H.O. A kinetic model for bacterial spore germination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 59 : 869, 1968.

WOLF, J. & MAHMOUD, S.A.Z. The effects of L- and D-alanine on the germination of some *Bacillus* spores. *J. Appl. Bacteriol.* 20 : 373, 1957.

WYNNE, E.S.; MEHL, D.A.; SCHMIEDING, W.R. Germination of *Clostridium* spores in buffered glucose. *J. Bacteriol.* 67 : 435, 1954.

APÊNDICE

Tabela 7 - Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus brevis* (UFC $\times 10^5$ / ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação de 60°C por 10 minutos.

Tempo	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	97	102	109	122	124	128	92	104	100
2	77	68	79	93	97	95	81	84	88
4	54	61	69	85	80	86	76	78	74
6	45	52	56	66	71	69	71	76	72

Tabela 8 - Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus brevis* (UFC $\times 10^5$ / ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação de 80°C por 10 minutos.

Tempo	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	79	84	86	74	75	85	76	70	74
2	74	76	62	70	72	87	81	85	87
4	66	68	78	53	58	62	93	95	91
6	55	56	64	66	60	64	96	98	91

Tabela 9 - Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus brevis* (UFC x 10^5 / ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação de 90°C por 10 minutos.

Tempo	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	72	60	68	55	59	52	58	68	60
2	54	50	54	53	47	50	51	56	53
4	40	44	46	51	44	49	50	48	46
6	31	30	32	37	31	38	40	43	42

Tabela 10 - Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus subtilis* (UFC x 10^5 / ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação de 60°C por 10 minutos.

Tempo	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	144	145	140	203	195	200	196	191	193
2	130	141	131	177	172	169	174	171	165
4	122	127	123	150	145	154	159	157	163
6	94	98	92	112	103	122	199	195	201

Tabela 11 - Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus subtilis* (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação de 80°C por 10 minutos.

Tempo	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	132	141	135	153	142	156	112	121	119
2	116	120	108	154	155	161	142	144	148
4	107	104	102	169	159	164	158	161	157
6	176	75	70	140	136	155	169	171	162

Tabela 12 - Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus subtilis* (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação de 90°C por 10 minutos.

Tempo	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	58	67	57	150	143	143	76	78	93
2	39	47	40	165	127	122	86	79	95
4	34	37	36	145	114	110	104	103	106
6	31	32	33	102	90	90	106	107	110

Tabela 13 - Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus coagulans* (UFC x 10^5 /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação de 60°C por 10 minutos.

Tempo	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	75	68	66	138	160	152	145	150	153
2	70	63	64	82	85	101	99	114	107
4	68	59	50	63	60	64	108	102	99
6	38	42	32	71	85	76	95	97	93

Tabela 14 - Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus coagulans* (UFC x 10^5 /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação de 80°C por 10 minutos.

Tempo	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	70	76	70	89	92	88	94	93	92
2	62	64	68	81	84	87	68	96	84
4	49	51	56	85	76	84	64	73	69
6	43	45	49	73	68	62	75	60	62

Tabela 15 - Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus coagulans* (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação de 90°C por 10 minutos.

Tempo	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	70	69	59	81	73	63	75	67	70
2	60	46	51	91	89	86	69	61	65
4	51	42	40	81	60	63	58	54	60
6	32	30	37	57	55	66	51	47	53

Tabela 16 - Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus megaterium* (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação de 60°C por 10 minutos.

Tempo	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	167	173	187	250	262	248	212	218	212
2	155	140	183	223	226	228	171	185	162
4	169	157	159	215	221	210	167	157	158
6	121	118	124	212	216	206	170	188	161

Tabela 17 - Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus megaterium* (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação de 80°C por 10 minutos.

Tempo	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	110	115	95	181	178	182	176	192	188
2	108	112	109	194	192	190	167	182	169
4	101	99	102	190	189	182	165	178	164
6	88	86	78	130	133	127	145	147	140

Tabela 18 - Contagem Microbiológica do número de esporos germinados de *Bacillus megaterium* (UFC $\times 10^5$ /ml), submetidos ao tratamento térmico de ativação de 90°C por 10 minutos.

Tempo	pH 4,5			pH 5,5			pH 6,5		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	62	63	54	87	80	84	79	68	83
2	30	37	34	97	99	95	71	63	72
4	170	168	163	106	107	115	63	58	69
6	126	128	133	92	94	90	53	47	55

Tabela 19 - Análise de Variância

CAUSAS DE VARIACÃO	GRAUS DE LIBERDADE	ANÁLISE MICROBIOL.
Microorg. (M)	3	424,08**
Temperaturas (T)	2	366,22**
pH	2	132,11**
Tempo (Tp)	3	33,95**
M x T	6	33,02**
M x pH	6	15,97**
M x Tp	9	2,25*
T x pH	4	9,08**
T x Tp	6	10,15**
pH x Tp	6	3,94**
M x T x pH x Tp	36	1,69**
Resíduo	348	
Total	431	
Coeficiente de Variação (%)		17,84

* - significativo a 1%

** - significativo a 5%