

"UTILIZAÇÃO DA NISINA NA DESTRUÇÃO TÉRMICA
DE *Bacillus stearothermophilus* EM
HOMOGENEIZADO DE COGUMELOS pH 6,2"

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

UTILIZAÇÃO DA NISINA NA DESTRUÇÃO TÉRMICA DE
Bacillus stearothermophilus EM HOMOGENEIZADO DE COGUMELOS pH 6,2

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Maria de Lourdes Mohallem
e aprovada pela Comissão Maria de Lourdes Mohallem 8/125
Julgadora em 11-04-94 Farmacêutica Bioquímica


Prof. Dra. Pilar R. de Massaguer,
Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos para a
obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos

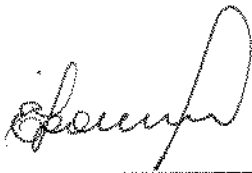
BANCA EXAMINADORA



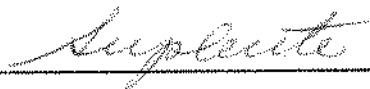
Profa. Pilar Rodrigues de Massaguer
(Orientadora)



Profa. Mirtha Nelly Uboldi Eiroa
(Membro)



Prof. Edir Nepomuceno da Silva
(Membro)



Prof. José Luiz Pereira
(Membro)

Campinas, 11 de 04 de 1994

SUSSUSU

A terra gerou a flor
e a flor prà se gerar não podia.

As flores olhavam umas pràs outras,
não se sentiam e nem se comunicavam.

Nasceu um pássaro com um bico tão fino e delicado
que morria por não conseguir comer

Tudo era cinza e as cores não se chamavam
Veio a luz e as flores se adoravam,
chamaram os colibris que as beijavam e as sorviam

As cores pintaram as penas dos colibris
de vermelho, azul, de todas as cores
e em tudo se coloriam

Os colibris se tornaram os mensageiros das flores
levando notícias e fazendo casamentos

A terra é dona da terra

A flor precisa do colibri que precisa da cor
que precisa do colibri que precisa da flor
que precisa da vida

(Cantiga - Tribo Nhaboquara)

Dedico este trabalho

ao Sérgio e Helena, pelo amor e
alegria que me proporcionam;
aos meus pais, que me incutiram
valores como dignidade e honestidade,
fundamentais para chegar nesta etapa
da vida;
a mim, pelo esforço e perseverança.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, PILAR RODRIGUES DE MASSAGUER, pela amizade, confiança, conhecimento e incentivo;

A CAPES, pela Bolsa de Estudo concedida;

A Rosinha, pelos ensinamentos técnicos e de vida;

Ao Sr. Arlindo e Sr. Fontana, pela perfeição na confecção e fechamento dos tubos TDT.

Aos colegas do laboratório, em especial à Margarida Magalhães, Claudio Cardelli, Flávio Schmidt e Lourdes Quaresma, pelo companheirismo, apoio e espírito cooperativo;

As Dona Afla e Dona Benedita, pela minha "adoção" como filha, e da Helena como neta;

A Andréia, sempre amiga, independente se os momentos eram de alegria ou tristeza;

A Profa. Lieselotte Jokl (Faculdade de Farmácia - UFMG) por permitir inúmeras vezes o meu afastamento para a realização deste trabalho e pelos ensinamentos oportunos de técnicas de redação científica;

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a execução desta tese.

SUMARIO

	Página
LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA	4
3.1 - CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ESPOROS BACTERIANOS COM ENFASE ESPECIAL AO <i>B. stearothermophilus</i>	4
3.1.1 - Esporo bacteriano	4
3.1.2 - Ativação de esporos	7
3.1.3 - Germinação de esporos	9
3.1.4 - Crescimento pós-germinativo	14
3.2 - METABOLISMO E BIOQUÍMICA DE CÉLULAS DE <i>B. stearothermophilus</i>	15
3.3 - DETERIORAÇÃO POR <i>B. stearothermophilus</i>	19
3.4 - RESISTENCIA TÉRMICA DE ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i>	22
3.5 - ASPECTOS GERAIS SOBRE A NISINA	27
3.5.1 - Características e composição química	27
3.5.2 - Propriedades físico-químicas da nisina	30
3.5.3 - Definição das unidades internacionais	31
3.5.4 - Espectro antimicrobiano	31
3.5.5 - Modo de ação da nisina	33
3.5.5.1 - Em células vegetativas	33
3.5.5.2 - Em esporos bacterianos	34
3.6 - FATORES QUE INTERFEREM NA EFICIENCIA DA NISINA	37
3.7 - TOXICIDADE E COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DA NISINA	39
3.8 - EMPREGO DA NISINA EM ALIMENTOS	39
3.8.1 - Alimentos crus	42
3.8.2 - Alimentos pasteurizados	42
3.8.3 - Alimentos esterilizados	44

4. MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1 - MATERIAL	46
4.1.1 - Cultura de teste	46
4.1.2 - Meios de cultura	46
4.1.2.1 - Meios para esporulação de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518	46
4.1.2.2 - Meio para quantificação dos esporos de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 - Agar Dextrose Triptona (ADT)	46
4.1.2.3 - Meios de subcultura utilizados nos ensaios de otimização do binômio tempo/temperatura de ativação dos esporos de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518	47
4.1.2.4 - Meios utilizados para o estudo dos fenômenos de germinação e crescimento pós- germinativos dos esporos de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 por espectrofotometria	47
4.1.2.5 - Meio utilizado para determinação da Menor Concentração Inibitória (MCI) no crescimento vegetativo dos esporos de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 - AN	47
4.1.2.6 - Meio de aquecimento e subcultura utilizados nos ensaios de resistência térmica	48
4.1.3 - Nisina	48
4.1.4 - Equipamentos	49
4.2 - MÉTODOS	50
4.2.1 - Definição das condições experimentais	50
4.2.1.1 - Definição do meio de esporulação de células de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518	50
4.2.1.1.1 - Coleta, limpeza e estocagem dos esporos de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 produzidos	51
4.2.1.1.2 - Quantificação dos esporos de <i>B. stearothermophilus</i>	52
4.2.1.1.3 - Comparação das metodologias utilizadas na produção dos esporos de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518	53

4.2.1.2 - Otimização do binômio tempo/temperatura de ativação (choque térmico) em diferentes meios de subcultura, para os esporos de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518	53
4.2.1.3 - Seleção do meio de subcultura mais eficaz para se observar a germinação e o crescimento pós-germinativo de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 e sua adaptabilidade ao método espectrofotométrico de redução da absorbância	56
4.2.1.4 - Definição do efeito inibitório da nisina sobre as etapas germinativa e de crescimento pós-germinativo de esporos de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518	57
4.2.1.5 - Determinação da MCI da nisina para <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 no crescimento vegetativo	58
4.2.2 - Determinação da resistência térmica de esporos de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 no homogeneizado de cogumelos (hc) com e sem a adição de nisina	60
4.2.2.1 - Seleção do meio de aquecimento	60
4.2.2.2 - Confirmação do crescimento de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 no meio	61
4.2.2.3 - Determinação da resistência térmica dos esporos de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 no meio HC, com e sem nisina	61
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 - AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518	64
5.2 - OTIMIZAÇÃO DO BINÔMIO TEMPO/TEMPERATURA, EM DIFERENTES MEIOS DE SUBCULTURA, PARA ATIVAR OS ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518	65
5.3 - GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO DE ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 NOS MEIOS DE SUBCULTURA SELECIONADOS PARA TAIS FINALIDADES	69

5.4 - INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO E DO CRESCIMENTO POS-GERMINATIVO DOS ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 PELA NISINA	76
5.5 - MCI DA NISINA SOBRE O CRESCIMENTO VEGETATIVO DE ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518	78
5.6 - DETERMINAÇÃO DA RESISTENCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 COM E SEM NISINA NO MEIO DE AQUECIMENTO	80
5.6.1 - Quantificação de microorganismos termofílicos totais produtores de acidez plana no cogumelo "in natura"	80
5.6.2 - Confirmação do crescimento dos esporos de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 no meio HC	82
5.6.3 - Determinação dos "atrasos" térmicos para as ampolas TDT contendo meio HC e inóculo	82
5.6.4 - Determinação da resistência térmica dos esporos de <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 no meio HC com e sem a adição de nisina	83
6. CONCLUSOES	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
8. APENDICE	112

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	- CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DIFERENCIAIS PARA AS CÉLULAS E ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i>	15
TABELA 2	- EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE AS NECESSIDADES NUTRITIVAS DE <i>B. stearothermophilus</i>	18
TABELA 3	- CONTAGENS MÉDIAS DE ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> NA SUPERFÍCIE DE MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS	21
TABELA 4	- COMPOSIÇÃO EM AMINOÁCIDO DA MOLECULA DE NISINA "A"	28
TABELA 5	- COMPOSIÇÃO DO NISAPLIN	30
TABELA 6	- BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E ESPOROS SENSÍVEIS A NISINA	32
TABELA 7	- UTILIZAÇÃO DA NISINA NO PROCESSAMENTO TERMOQUÍMICO DE ALIMENTOS ALMEJANDO A INIBIÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i>	41
TABELA 8	- TEMPOS E TEMPERATURAS UTILIZADOS NA OTIMIZAÇÃO DA ATIVAÇÃO TÉRMICA DOS ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 INOCULADOS NO MEIO AN E ADT	54
TABELA 9	- COMBINAÇÕES DE TEMPO/TEMPERATURA UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 NO MEIO HC COM E SEM NISINA	62
TABELA 10	- COMPARAÇÃO DAS METODOLOGIAS USADAS PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518	64
TABELA 11	- DETERMINAÇÃO DO CHOQUE TÉRMICO ÓTIMO PARA OS ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 NO MEIO ADT	66

TABELA 12 - DETERMINAÇÃO DO CHOQUE TÉRMICO ÓTIMO PARA OS ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 NO MEIO AN	67
TABELA 13 - DETERMINAÇÃO DO CHOQUE ÓTIMO PARA OS ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 NO MMGCp-M E MO MMGCp-M + 0,1% DE AMIDO	68
TABELA 14 - CONTAGEM DE CÉLULAS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 NO MEIO AN CONTENDO VARIAS CONCENTRAÇÕES DE NISINA	79
TABELA 15 - QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS TERMÓFILOS CAUSADORES DE ACIDEZ PLANA EM COGUMELoS TRITURADOS E NÃO TRITURADOS	81
TABELA 16 - DETERMINAÇÃO DOS "ATRASOS" TÉRMICOS DAS AMPOLAS TDT	82
TABELA 17 - RESISTENCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 NO MEIO HC A 125°, 121° E 118°C	84
TABELA 18 - RESISTENCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 NO MEIO HC ADICIONADO DE NISINA A 125°, 121 E 118°C	85
TABELA 19 - COMPARAÇÃO DOS INDICES DE REDUÇÃO DECIMAL (D) PARA OS ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 NO MEIO HC COM E SEM A ADIÇÃO DE NISINA	89
TABELA 20 - VALORES DO INDICE DE TEMPERATURA (Z) PARA OS ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 NO MEIO HC COM E SEM DE 25 UI/ml DE NISINA	90
TABELA 21 - DADOS SOBRE A CINÉTICA DE DESTRUÇÃO TÉRMICA DOS ESPOROS DE <i>B. stearothermophilus</i> FS 1518 COM E SEM NISINA	93

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - ESTRUTURA MOLECULAR DA NISINA	29
FIGURA 2 - SENSIBILIDADE DOS ESPOROS DE B. stearothermophilus A AÇÃO DA NISINA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO TÉRMICO	35
FIGURA 3 - INIBIÇÃO DA FASE DE ENTUMESCIMENTO DOS ESPOROS DE B. stearothermophilus PELA NISINA	36
FIGURA 4 - GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO DOS ESPOROS DE B. stearothermophilus FS 1518, NO MEIO CDT DILUÍDO EM ÁGUA (1:15,5) pH 6,7	69
FIGURA 5 - GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO DOS ESPOROS DE B. stearothermophilus FS 1518 NO MEIO CDT-M pH 6,6	70
FIGURA 6 - GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO DE ESPOROS DOS B. stearothermophilus FS 1518 NO MEIO CDT DILUÍDO EM ÁGUA (1:15,5) pH 8,1	72
FIGURA 7 - GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO DE ESPOROS DOS B. stearothermophilus FS 1518 NO MMGCP-M pH 7,0	73
FIGURA 8 - GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO DOS ESPOROS DE B. stearothermophilus FS 1518 NO MEIO CN pH 6,9	74
FIGURA 9 - EFEITO DA NISINA, NA CONCENTRAÇÃO DE 1000 UI/ml (A), 500 UI/ml (B) e 250 UI/ml (C) SOBRE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO PÓS- GERMINATIVO DE ESPOROS DE B. stearothermophilus FS 1518	77
FIGURA 10 - CURVA DE SOBREVIVENTES DOS ESPOROS DE B. stearothermophilus FS 1518 NO MEIO HC COM E SEM ADIÇÃO DE 25 UI/ml DE NISINA A 125°C	86
FIGURA 11 - CURVA DE SOBREVIVENTES DOS ESPOROS DE B. stearothermophilus FS 1518 NO MEIO HC COM E SEM A ADIÇÃO DE 25UI/ml DE NISINA A 121°C	87

- FIGURA 12 - CURVA DE SOBREVIVENTES DOS ESPOROS DE
B. stearothermophilus FS 1518 NO MEIO HC COM
E SEM A ADIÇÃO DE 25UI/ml DE NISINA A 118°C 88
- FIGURA 13 - CURVA DE RESISTENCIA TÉRMICA" DOS ESPOROS DE
B. stearothermophilus FS 1518 NO MEIO HC COM
E SEM 25UI/ml DE NISINA 92

LISTA DE ABREVIATURAS

Aa	= atividade de água
ADT	= Agar dextrose triptona
AGA	= acetilglicosamina
AMA	= ácido acetilmurâmico
AN	= Agar nutriente
CDT-M	= Caldo dextrose triptona modificado pela retirada do indicador púrpura de bromocresol
CDT	= Caldo dextrose triptona
CN	= Caldo nutriente
DHA	= dehidroalanina
DHB	= dehidrobutireno
DNA	= ácido desoxiribonucléico
DPA	= ácido dipicolínico
D	= Tempo de redução decimal
EDTA	= etilenodiaminotetracético
Eo	= potencial de oxi-redução
HC	= Homogeneizado de cogumelos em salmoura 1,5% (p/v) pH 6.2
MCI	= Menor Concentração Inibitória
MMGCP	= Meio mínimo para germinação e crescimento pós-germinativo de esporos de <i>B. stearothermophilus</i> de CAMPBELL <i>et alii</i> (1965)
MMGCP-M	= MMGCP modificado pela adição de triptona (1%); ácido L-glutâmico (0,144 mg/ml) e L-lisina (0,162 mg/ml)
OMS	= Organização Mundial de Saúde
pH	= potencial hidrogeniônico
RNA	= ácido ribonucléico
UFC	= Unidades Formadoras de Colônias
UI	= Unidades Internacionais
Z	= Índice de temperatura

RESUMO

O presente trabalho propôs estabelecer os parâmetros do processamento térmico utilizando-se a nisina como coadjuvante térmico no homogeneizado de cogumelos em salmoura 1,5% (p/v) pH 6,2 (HC). O meio HC simula uma conserva comercial não acidificada. O microrganismo alvo da destruição termoquímica foi o *Bacillus stearothermophilus* FS 1518. Seus esporos foram obtidos à partir de uma solução estoque e produzidos no meio Agar Nutriente (AN) contendo 5 ppm de sulfato de manganês (PFLUG, 1982). Esta metodologia mostrou-se mais eficaz que aquela preconizada por KIM & NAYLOR (1966). A ativação ótima para a germinação foi determinada e ficou estabelecida como 5 minutos à temperatura de ebulição nos meios de subcultura estudados. O meio Caldo Nutriente (CN) foi eleito para estudar o efeito da nisina na germinação e no crescimento pós-germinativo porque melhor se adequou ao método espectrofotométrico de redução de absorbância. Constatou-se que a nisina não inibe a germinação destes esporos. Sua inibição é posterior à germinação. Concentrações de nisina maior ou igual a 50 UI/ml inibiram o crescimento pós-germinativo. A Menor Concentração Inibitória (MCI) de nisina para as células de *B. stearothermophilus* FS 1518, em uma população de 10^6 UFC/ml, foi de 50 UI/ml. A metade da MCI foi adicionada no meio HC inoculado com os esporos para a determinação da sua resistência térmica. A redução da resistência térmica, empregando-se o meio AN para a subcultura, foi de 19, 36 e 44% nas temperaturas de 125°, 121° e 118°C respectivamente. O índice de temperatura encontrado foi 11,66 e 9,15 com e sem nisina, respectivamente. O valor de esterilização requerido para causar 5 reduções decimais a partir de uma população de 7000 esporos/250g produto decresceu, aproximadamente, em 36% à temperatura de 121°C com a nisina. Estes dados comprovam a sua eficiência na redução da resistência térmica destes esporos, quando inoculados no meio HC e nos fornece o valor de esterilização requerido para o processamento desta conserva nestas condições.

SUMMARY

The present work intended to establish the microbiological parameters for process using nisin as a thermal adjuvant in a homogenate of mushrooms in brine 1.5 per cent (p/v) pH 6.2 (HM). The HM simulates a low-acid processed product. The target microorganism for the thermo-chemical destruction was *Bacillus stearothermophilus* FS 1518. The spore suspension was obtained from a stock suspension and produced in Nutrient Agar (NA) supplemented with 5 ppm of Manganese Sulfate (PFLUG, 1982). This methodology showed to be more efficient than the one standardized by KIM & NAYLOR (1966). It was determined the optimum conditions of activation for germination on the subculture medium studied. It was found that the optimum activation time was 5 minutes at boiling temperature. Nutrient Broth was chosen as the culture medium to study the effect of nisin on the germination and post-germinative growth, because it showed to be the most adequate to the spectrophotometric method of absorbance reduction. It was observed that nisin does not inhibit germination of such spores. Its inhibiting action occurs after the germination phase. Nisin Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for *B. stearothermophilus* FS 1518 in a population of 10^6 CFU/ml was 50 UI/ml. Half of this MIC was added to the HM medium previously inoculated with the spores to determine its thermo-chemical resistance. The thermo-chemical resistance reduction using NA medium for subculturing was 19, 36 and 44 per cent for temperatures of 125, 121 and 118°C, respectively. The Z-value found was 11.66 and 9.15°C with and without nisin, respectively. The sterilization value required (F) to cause 5 decimal reduction on the initial population of 7000 spores per 250 g of product decreased approximately 36 per cent at 121°C with nisin. These data prove the efficiency of nisin in reducing the thermal resistance of such spores when inoculated in HM medium, and it also provides the F-value for processing the product in the studied conditions.

1. INTRODUÇÃO

A utilização do tratamento térmico, geralmente sob a forma de calor úmido, constitui-se em uma técnica amplamente difundida para assegurar a estabilidade microbiológica dos alimentos pasteurizados, ou mesmo a esterilidade comercial dos alimentos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,6$ e $\text{Aa} > 0,85$).

Em alimentos pasteurizados é imprescindível a associação ao tratamento térmico de, pelo menos, mais um método de conservação, como o uso de conservantes e bacteriocinas; estocagem à temperaturas baixas; uso de sais de cura; modificação do pH e/ou atividade de água (Aa) ótimos para crescimento microbiano, etc. Estes métodos adicionais têm a finalidade de assegurar a inibição da germinação e/ou crescimento pós-germinativo de esporos de microrganismos termorresistentes, envolvidos na deterioração pós-processamento e, também, de esporos de microrganismos produtores de infecções e intoxicações de origem alimentar.

Já em alimentos de baixa acidez, vários pesquisadores têm estudado o efeito sinergista dos conservantes e bacteriocinas com o calor úmido sob pressão (tratamento termoquímico) sobre os microrganismos termorresistentes de importância na deterioração e produção de toxinfecção de origem alimentar (CAMPBELL Jr. *et alii*, 1959, DENNY *et alii* 1961, WHEATON & HAYS, 1964, etc). Estes estudos visavam reduzir o tempo de processamento térmico a que estes produtos eram submetidos. O uso de coadjuvante ao tratamento térmico se justifica especialmente pela manutenção das propriedades nutricionais e organolépticas do produto, sem afetar a qualidade microbiológica do alimento envolvido, e, em segundo plano, pela redução da energia requerida no seu processamento - aspecto relevante no plano econômico.

Atualmente, entre as bacteriocinas utilizadas em alimentos, mais eficazes e potencialmente seguras, situa-se a nisina. Em 1969, a Organização Mundial de Saúde (OMS) concedeu parecer favorável a sua utilização em alimentos.

Esta bacteriocina vem sendo utilizada há alguns anos, em vários países, nos mais diversos alimentos. Atualmente seu uso é permitido em 47 países, dentre os quais os Estados Unidos da América (EUA) (FDA, 1981) e Brasil. No Brasil seu uso é restrito à alguns tipos de queijos pasteurizados (Brasil, 1990). Entretanto, é de interesse dos processadores de alimentos que esta Portaria tenha a sua aplicação estendida a outros alimentos processados termicamente, já que seu emprego pode resultar em vantagens econômicas para o processador de alimentos, por requerer menor tempo de processamento, e, conseqüentemente, para o consumidor, que além de um produto mais barato, terá um produto de melhor qualidade nutricional e microbiológica, com reflexos protetivos na saúde do consumidor.

O cogumelo foi o substrato escolhido para a avaliação da eficiência da nisina porque, durante o seu processamento, há necessidade de um tratamento térmico severo. Este tratamento justifica-se pois eles possuem uma biocarga de esporos elevada, devido ao contato com o solo, e por não serem submetidos à lavagens drásticas, em função de sua delicada estrutura tissular. Além desses problemas, esta conserva pode permitir a germinação e o crescimento pós-germinativo de esporos remanescentes, se permanecem estocadas em temperaturas elevadas após o processamento, o que é comum em países de clima tropical. Vale salientar que sua industrialização encontra-se em franca expansão no Brasil, face à crescente demanda do mercado consumidor.

2. OBJETIVOS

Os aspectos mencionados na introdução foram fundamentais na justificativa para a consecução desta pesquisa, que foi desenvolvida com os seguintes objetivos:

- 1 - Determinar o efeito da nisina sobre as etapas de germinação e de crescimento pós-germinativo dos esporos de *B. stearothermophilus*.
- 2 - Verificar e quantificar a redução causada pela nisina na resistência térmica dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518, quando inoculados em um meio proposto e formulado à base de cogumelos em salmoura 1,5% pH 6,2, sendo este último preparado no laboratório, simulando a formulação comercial não acidificada do cogumelo em salmoura (conserva de cogumelos).

3. REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 - CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ESPOROS BACTERIANOS COM ÊNFASE ESPECIAL AO *B. stearothermophilus*

A dormência das células vegetativas (ou esporos bacterianos) é um termo usado para descrever o estado aparente de inativação metabólica, comparado com o metabolismo normal destas células. A dormência é uma decorrência da estrutura físico-química do esporo, e não pode ser vista como falha dos sistemas enzimáticos, pois há enzimas com plena atividade metabólica, como catalase, racemase, deaminase, pirofosfatase (KEYNAN & HALVORSON, 1965).

3.1.1 - Esporo bacteriano

O processo de esporulação é o inverso da germinação. As células metabolicamente ativas perdem suas características próprias no final do crescimento exponencial, por depleção de algum nutriente essencial, ou por acúmulo de catabólitos, ou seja, a esporulação certamente está relacionada com o fenômeno de repressão catabólica. (KANCKO, 1975)

De acordo com MANDESLTAM & McQUILLEM (1973), a forma bacteriana esporulada ou de dormência apresenta como principal característica uma resistência extrema ao calor; à luz ultra-violeta; aos raios X; aos solventes orgânicos, à dessecação, ao vácuo e ao congelamento. A base biomolecular desta resistência parece estar fundamentada na presença de um agente quelante encontrado na córtex dos esporos bacterianos: o ácido dipicolínico (DPA). Este encontra-se em proporções variáveis, de 5 a 15% do peso seco total do esporo. A rota metabólica para

produção do DPA é a mesma utilizada para a dos aminoácidos da família do ácido aspártico. Este ácido encontra-se associado a ions cálcio (Ca^{++}) na proporção de 1:1.

A atividade de água (Aa) reduzida no core dos esporos também é outro fator associado à alta resistência dos mesmos. De acordo com LEWIS *et alii* (1965), a Aa baixa é explicada pela pressão contráctil exercida pelas várias camadas da córtex sobre o core. As camadas da córtex também são responsáveis, em grande parte, pelo volume e peso dos esporos, exercendo função de barreira física aos tratamentos físico-químicos, e, conseqüentemente, conferindo maior resistência aos mesmos.

Segundo KANCKO (1975), as etapas que ocorrem num processo de esporulação bacteriana são:

- 0: corresponde ao estágio da célula vegetativa, após o término da divisão celular;
- 1: o material nuclear da célula vegetativa condensa-se e estende-se, formando um filamento axial;
- 2: o material nuclear é segregado e há formação assimétrica de um septo, o qual divide a célula em célula-mãe e pré-esporo;
- 3: é caracterizada pelo processo de "engolfamento", onde o protoplasto da célula-mãe cresce sobre o protoplasto do pré-esporo, resultando numa membrana dupla;
- 4: o polímero de peptidoglicano e os ions de cálcio são incorporados ao espaço entre as membranas, completando a formação da córtex do esporo;
- 5: há formação da cobertura do esporo, que se estrutura ao redor da córtex;

- 6: ocorre maturação do esporo, com desidratação do protoplasto, originando estruturas que se apresentam refráteis, quando observadas ao microscópio;
- 7: nesta fase ocorre a desprendimento do esporo maduro da célula-mãe, sob a ação de enzimas líticas.

A camada da córtex é, então, composta de DPA, íons de cálcio e pelo polímero de peptidoglicano. Este último, por sua vez, é formado por três unidades moleculares distintas: acetilglicosamina (AGA), ácido acetilmurâmico (AMA) e por um peptídeo composto por 4 ou 5 dos seguintes aminoácidos, todos na configuração D: glicina, ácido aspártico, ácido alfa-aminopimélico, ácido-glutâmico. Concluindo, os esporos bacterianos apresentam-se como uma estrutura complexa, em camadas e medem 1,0-1,2 μm por 1,5-2,0 μm . São ovais e situam-se na célula vegetativa em posição terminal para sub-terminal (FIELDS, 1970).

Vários fatores como temperatura, pH, tensão de oxigênio, fonte de carbono e nitrogênio, nutrientes e presença de cátions inorgânicos influenciam no rendimento da produção de esporos de *B. stearothermophilus*. LONG & WILLIAMS (1960) observaram que a produção de esporos deste microrganismo a 37°C com aeração é mais eficaz que a 55°C. KIM & NAYLOR (1966) propuseram um meio rico em nutrientes, formulado com caldo nutriente, extrato de levedura, cloreto de manganês e ágar, e inoculação em temperaturas variando de 52°-55°C. THOMPSON & THAMES (1967) obtiveram excelente rendimento quando a incubação procedeu-se sob aeração, com borbulhamento de oxigênio a 60°C, em meio líquido contendo triptona, glicose e extrato de carne. YAO & WALKER (1967) também propuseram a incubação com aeração a 55°C, para o máximo rendimento, em meio formulado com caldo nutriente, tampão fosfato, nitrito e 2 $\mu\text{g/ml}$ de Mn^{++} e Ca^{++} . A adição de cátions inorgânicos, principalmente sob a forma de sal de manganês, em concentrações variáveis de 1-30 ppm tem a função de aumentar a resistência térmica destes esporos (GOULD, 1971). A maioria dos

meios propostos para a esporulação deste microrganismo (FINLEY & FIELDS, 1962; CAMPBELL Jr. *et alii*, 1965; PFLUG, 1982 e ABRAHAM *et alii*, 1990) contém este íon. O meio para produção de esporos deve ser padronizado durante um experimento, pois as condições para produção discutidas acima influenciam na subsequente resposta à resistência térmica, à ativação e à germinação (YOKOYA & YORK, 1965; GOULD, 1970). Entretanto, concentrações de manganês superior a 30 ppm reduzem o rendimento da produção de esporos (ITO, 1981).

3.1.2 Ativação de esporos

A ativação dos esporos é um processo reversível no qual o estado de dormência é rompido (FIELDS, 1970; MANDELSTAN & McQUILLEM, 1973). Entretanto, segundo KEYNAN *et alii* (1965), a reversibilidade deste fenômeno só ocorre quando o meio de aquecimento apresentar valores de pH variando entre 2,0 e 8,5. A ativação é uma etapa importante, mas não imprescindível para ocorrer a germinação dos esporos. No entanto, a maioria dos métodos utilizados para contagem de esporos bacterianos utilizam-na, em especial, a ativação térmica, com a finalidade de eliminar células vegetativas, que porventura estejam presentes na suspensão, e também para quebrar o estado de dormência dos mesmos. Detalhes moleculares sobre o mecanismo de ativação são ainda obscuros. Acredita-se que ocorram mudanças conformacionais em macromoléculas situadas na capa ou membrana dos esporos, que podem desobstruir os sítios para atividade enzimática, ou facilitar o acesso de agentes germinantes (KIM & FOEGEDING, 1990).

Durante a ativação há aumento da atividade enzimática e, conseqüentemente, redução da fase de latência para a germinação. A ativação também modifica os nutrientes requeridos para a germinação, ou seja, os esporos que não são submetidos à ativação têm necessidades nutricionais diferentes dos esporos ativados

(CHURCH *et alii*, 1954; POWELL & HUNTER, 1953).

A ativação pode ser efetuada pela exposição dos esporos a agentes físico e/ou químicos, como por exemplo ao calor subletal; a agentes redutores; a condições extremas de pH; a abrasão; a radiação ionizante; ou pela exposição a compostos químicos como cloreto de cálcio e etanol (COOK & PIERSON, 1983; KIM & FOEGEDING, 1990). Os primeiros pesquisadores a observarem a ativação pelo calor subletal, comumente denominada "choque térmico" ou "ativação pelo calor" foram CURRAM & EVANS (1945) apud KEYNAN *et alii* (1965). Todos os tratamentos para a ativação afetam a estrutura terciária das proteínas presentes no core dos esporos, com desestabilização das ligações dissulfídricas (GOULD, 1970). Segundo KEYNAN & HALVORSON (1965), esta desnaturação é reversível, consequentemente, o processo de ativação dos esporos também é reversível.

A porcentagem de esporos germinados, para um determinado microrganismo, varia com o binômio tempo/temperatura de exposição ao calor subletal, ou seja, com a otimização da ativação. Outros fatores também influem na otimização da ativação, como a linhagem microbiana; a composição e o valor de pH do meio para esporulação; o meio de subcultura, etc (MORRAN *et alii*, 1990).

Os métodos para se estabelecer a ativação ótima são baseados na velocidade de germinação em um meio de cultura, inoculados sob condições físico-químicas adequadas e, também, na proporção de células germinadas que crescem e formam colônias detectáveis em um meio de cultura, também sob condições ideais de incubação. Este último é o mais utilizado para se verificar a ativação de esporos extremamente dormentes, como é o caso de *B. stearothermophilus* (KEYNAN *et alii*, 1965).

Para a ativação dos esporos de *B. stearothermophilus*, vários binômios tempo/temperatura de exposição ao calor subletal foram propostos. Entre eles citam-se:

- FINLEY & FIELDS (1962) estudaram os fenômenos de ativação e indução de dormência destes esporos. Eles observaram que há indução da dormência quando os mesmos são expostos a temperaturas inferiores a 100°C, e que a ativação máxima ocorre em temperaturas variando entre 100°-115°C, sendo ainda específica para cada suspensão. Este fenômeno foi também observado por KEYNAN *et alii* (1965) e FIELDS (1970);
- CAMPBELL Jr. *et alii* (1965) utilizaram 2 minutos a 110°C, para a ativação de *B. stearothermophilus* ATCC 1518, tanto para as linhagens do tipo rugosa, quanto para as linhagens lisas;
- em seu método para produção de esporos de *B. stearothermophilus*, PFLUG (1982) preconiza a ativação com o aquecimento durante 15 minutos, à temperatura de 100°C;
- EIROA *et alii* (1985) empregaram 30 minutos a 100°C, para a ativação de microrganismos termófilos produtores de "flat sour", entre os quais está incluído o *B. stearothermophilus*.

3.1.3 Germinação de esporos

A germinação é um processo irreversível, onde há quebra do estado de dormência, ou cribiótico. No processo germinativo, os esporos perdem suas características próprias, resultando em estruturas que poderão, ou não, originar células vegetativas (HITCHINS *et alii*, 1963). Durante o processo germinativo ocorre excreção de macromoléculas como DPA, mucopeptídeos e de íons cálcio. Consequentemente, há perda da refratibilidade dos esporos, quando observados a um microscópio de contraste de fase e redução do peso seco dos mesmos (FIELDS, 1970). As células resultantes do processo de germinação são metabolicamente ativas, sensíveis ao calor e a outros agentes físico-químicos, tornando-se susceptíveis aos corantes comuns (KEYNAN & HALVORSON, 1965).

Ainda de acordo com KEYNAN & HALVORSON (1965), durante o processo germinativo ocorrem as seguintes mudanças estruturais, morfológicas e fisiológicas dos esporos:

- a) alterações das membranas periféricas do esporo, tornando-as permeáveis;
- b) hidratação e entumescimento da córtex. Há aumento de 100% no volume celular (HITCHINS *et alii*, 1963);
- c) ativação de enzimas líticas;
- d) excreção de íons cálcio, DPA e do polímero peptidoglicano;
- e) excreção de cerca de 30% do peso seco total do esporo;
- f) síntese de macromoléculas.

A germinação pode ser induzida por diferentes agentes. Com base nestas observações, GOULD (1970) classificou-a em três diferentes tipos, conforme o agente indutor envolvido.

- a) Germinação fisiológica: induzida por compostos orgânicos, de forma associada ou isolada, todos metabolizados pelas células como: L-alanina, glicose, adenosina, etc.
- b) Germinação química: induzida por compostos orgânicos e inorgânicos que não são nutrientes para as células, por exemplo: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); íons; complexos químicos como o de cálcio-DPA. O DPA, apesar de induzir a germinação, inibe o crescimento pós-germinativo e, conseqüentemente, o crescimento pós-germinativo dos esporos (FIELDS, 1973).
- c) Germinação mecânica: induzida por agentes físicos, como calor, fricção, abrasão, pressão hidrostática, etc.

Os nutrientes necessários para a germinação dos esporos (agentes germinantes) variam com o microrganismo e a linhagem em estudo; com a formulação e pH do meio para a produção dos esporos, e também com a ativação utilizada (CAMPBELL Jr. & WILLIAMS, 1953; CAMPBELL Jr. *et alii*, 1965; FIELDS, 1970; DIEP *et alii*, 1972). Vários aminoácidos (L-alanina; L-cistina; L-tirosina; L-histina) e alguns nucleosídeos (inosina, adenosina) podem formar sistemas germinantes para a maioria dos esporos (KEYNAN *et alii*, 1965).

Os compostos orgânicos e inorgânicos que podem comportar-se especificamente como agentes germinantes ou inibidores da germinação dos esporos de *B. stearothermophilus* são resumidamente descritos:

- O'BRIEN & CAMPBELL Jr. (1957) observaram que os requerimentos mínimos para a germinação e o crescimento pós-germinativo dos esporos de *B. stearothermophilus* são: L-arginina; L-histidina; DL-isoleucina; DL-metionina; DL-valina; glicose; acetato de sódio; Na_2HPO_4 ; NH_4Cl ; NaCl ; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; biotina e tiamina. Os autores não obtiveram resultados positivos para a germinação com L-alanina. O meio de cultura formulado com estes nutrientes, adicionado ainda de L-leucina e ácido nicotínico, foi intitulado como "Meio mínimo para germinação e crescimento pós-germinativo de esporos de *B. stearothermophilus*";
- FIELDS & FINLEY (1964) estudaram a influência de monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos e também de alguns extratos de plantas na germinação deste microrganismo. Os pesquisadores observaram uma redução na contagem da população microbiana produzida, concluindo que estes compostos não atuam como agentes germinantes;
- FIELDS & FRANK (1969) descreveram que o agente quelante dipicolinato de sódio (4nM) em pH 5,5 atua como um agente germinante para os esporos de *B. stearothermophilus*. Estes

autores também verificaram que a germinação é interrompida quando o quelante se associa a cátions como magnésio, cálcio, manganês e cobalto. Eles verificaram que o sistema germinante é específico para cada suspensão de esporos e é dependente, ainda, do meio de produção dos mesmos;

- DIEP *et alii* (1972) verificaram que L-alanina, numa concentração de 10 mM/l pH 6-7 eleva a taxa de germinação de esporos de *B. stearothermophilus* 8005 em 90%, em 30 minutos. Estes autores constataram, também, que extratos aquosos de ervilhas, feijões ou cenoura em salmoura foram efetivos na estimulação da germinação. Eles concluíram que a ação dos extratos vegetais se deve à presença de alanina livre.
- GOULD (1970) demonstrou que L-alanina, purina, n-dodecilalanina (laurilalanina), complexo cálcio - DPA e lisozima são alguns agentes germinantes específicos para os esporos de *B. stearothermophilus*;

Pelo exposto pode-se verificar que não existe um composto químico único capaz de facilitar a germinação de todas as linhagens ou suspensões de esporos de *B. stearothermophilus*.

O valor de pH ótimo para a germinação de esporos de *B. stearothermophilus* também varia com o sistema-agente germinante utilizado. DIEP *et alii* (1972) verificaram que a germinação máxima ocorre em valores de pH entre 6,0-7,0, e que há redução em 55% quando o pH decresce para 5,0-6,0. Foi citado anteriormente o sistema germinante utilizado por FIELDS & FRANK (1969), com dipicolinato de sódio. Os pesquisadores verificaram que este sistema só é eficaz em pH 5,5.

Existem vários métodos para quantificar o fenômeno de germinação dos esporos. De acordo com CAMPBELL Jr. (1957) & GOULD (1971) estes se baseiam em:

- 1) perda da resistência térmica - por este método, determinam-se os esporos germinados, como Unidades Formadoras de Colônia/ml (UFC/ml), que produzem células vegetativas, detectáveis em agar, ou por outro método de detecção de crescimento vegetativo, após um choque térmico específico. Este choque deve ser letal para os esporos germinados e subletal para os não germinados. Os esporos ativados, após um período de incubação, são novamente submetidos ao choque térmico;
- 2) método da redução da absorbância (densidade óptica) - baseia-se na perda da refratibilidade do esporo, relacionada com a liberação de ácido dipicolínico, íons cálcio e peptidoglicano, da córtex, quando ocorre a germinação. Normalmente utilizam-se medidas em comprimentos de onda variáveis de 600-420nm. A maior desvantagem deste método é não permitir separar o fenômeno de germinação do de crescimento pós-germinativo, por que estas etapas não ocorrem de maneira sincronizada para uma mesma suspensão de esporos;
- 3) método de determinação da perda da refratibilidade em microscópio de fase - consiste na observação, após coloração, em microscópios de contraste de fase, dos esporos presentes, em um campo óptico delimitado. Os esporos não germinados apresentam-se brilhantes e os esporos germinados, escuros;
- 4) mudança de massa e volume - neste método determina-se o peso seco dos produtos liberados do processo germinativo;
- 5) método colorimético para detecção do ácido dipicolínico liberado na germinação - é baseado na intensidade da cor produzida quando DPA se associa com íons de ferro. A coloração máxima do complexo ocorre em valores de pH entre 4,0-6,0;
- 6) método manométrico - é utilizado concomitantemente com um dos citados anteriormente a fim de medir o efeito de substâncias que estimulam a respiração basal dos esporos, visto que a atividade respiratória de esporos é incrementada.

Além dos métodos acima há, também, os de coloração com azul de metileno e o de contagem direta ao microscópio. O primeiro baseia-se na capacidade dos esporos germinados de aceitar corantes comuns. Estes métodos são extremamente enfadonhos e com pouca precisão, sendo, portanto, recomendados apenas para testes qualitativos (GOULD, 1971).

3.1.4 Crescimento pós-germinativo

O crescimento pós-germinativo dos esporos corresponde à fase de biossíntese ativa de macromoléculas, culminando com a divisão celular, ou com o aumento da população bacteriana (MANDELSTAM & McQUILLEM, 1973). Durante o crescimento pós-germinativo, a biossíntese de macromoléculas ocorre de maneira ordenada e sincronizada para uma mesma suspensão de esporos. De acordo com KOBAYASHI *et alii* (1965), "a priori" ocorre a síntese de RNA e proteínas; posteriormente há síntese de DNA, com progressivas mudanças na estrutura da parede celular e nas rotas metabólicas.

De acordo com HITCHINS *et alii*, (1963), as seguintes mudanças morfológicas ocorrem no crescimento pós-germinativo.

- entumescimento do esporo, pela absorção de nutrientes e água;
- emergência, a partir do esporo entumescido;
- alongamento do esporo;
- divisão celular, culminando com o aumento da população bacteriana.

Os métodos para se verificar o crescimento pós-germinativo dos esporos são baseados no aumento do valor da absorbância de uma suspensão, após a redução ocorrida durante a

germinação; na determinação do aumento de massa e volume, os quais ocorrem durante o crescimento pós-germinativo; no acompanhamento da taxa de respiração, utilizando-se o aparelho de Warburg e, finalmente, por métodos analíticos para detecção de macromoléculas como DNA, RNA, mureína (GOULD, 1971; KOBAYASHI et alii 1965)

3.2 - METABOLISMO E BIOQUÍMICA DE CÉLULAS DE *B. stearothermophilus*

Esta bactéria foi nomeada primeiramente em 1920, por P.J.Donk, (NCA Washington Research Laboratories), apesar de existirem indicações anteriores de sua existência em indústria de alimentos (ITO, 1981).

As principais características desta bactéria são apresentadas na tabela 1.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DIFERENCIAIS PARA AS CÉLULAS E ESPOROS DE *B. stearothermophilus*

CARACTERÍSTICA	DESCRIÇÃO
Dimensões do bastonete (µm)	0,6-1,0 por 2,0-3,5 µm
Esporângio	entumescido
Esporos maduros	ovais, situando-se em posição sub-terminal para terminal
Reação de Gram	variável, sendo G+ em culturas jovens

continua...

Temperatura de crescimento	mínima: 30 -45°C ótima: 55°C máxima: 65 -75°C
pH mínimo de crescimento	4,3
Crescimento em agar proteose peptona	negativo
Motilidade	positiva, por flagelos peritríqueos
Relação com o oxigênio	aeróbico/anaeróbico facultativo
Catalase	positiva, para a maioria
Metabolismo	aeróbico/fermentativo
Produtos do metabolismo fermentativo	-ácido láctico (principal) -ácido fórmico, ácido acético e etanol (2:1:1)
Produção de ácido a partir de:	
- glicose (condições anaeróbicas)	+
- lactose	+/-
- xilose	+/-
Produção de acetil-metil-carbinol (Teste de Voges-Proskauer)	negativa
Desaminação da fenilalanina	negativa
Redução de nitrito	positiva, para a maioria
Hidrólise de:	
- amido	positiva
- caseína (Teste de Litmus Milk)	positiva
- gelatina	positiva
Crescimento em:	
- glicose	positivo
- NaCl 5%	positivo, para a maioria
- lisozima 0,001%	negativo

Fonte: BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (1975)

A aparência macroscópica do crescimento vegetativo em agar é tão variável que não deve ser utilizada isoladamente para

o reconhecimento do microrganismo. As colônias podem apresentar-se rugosas, espalhadas e delgadas, bem como lisas, abundantes e compactas (GORDON & SMITH, 1949).

A principal característica das células vegetativas de *B. stearothermophilus* é sua capacidade de crescimento em temperaturas elevadas, como 65°-70°C (KRISTJANSSON, 1989). Eles são classificados como "termófilos estritos", com crescimento ótimo a 55°C, e com temperatura mínima de crescimento variando entre 30°-45°C, dependendo das condições de incubação (ITO, 1981). De acordo com GORDON & SMITH (1949) não se observa crescimento a 28°C. A temperatura mínima de crescimento em alimentos é de 43°C, diferindo bastante da temperatura mínima de crescimento em meios artificiais (MAUNDER, 1976). A capacidade de crescimento dos microrganismos termófilos em temperaturas elevadas tem sido amplamente estudada e associa-se à presença de enzimas, ribossomos e flagelos termoestáveis (FRAZIER, 1985).

A fermentação dos carboidratos no metabolismo anaeróbico de *B. stearothermophilus* dá-se pela produção de ácidos e etanol, como mostrado na tabela 1, e também de ácidos graxos de cadeia curta. Entretanto, não há formação de gases (EIROA *et alii*, 1985).

Os nutrientes necessários para o crescimento vegetativo variam com a linhagem, a temperatura de incubação, a tensão de oxigênio do meio de cultura, etc. Em geral, os requerimentos nutricionais são incrementados quando se eleva a temperatura de incubação (FRAZIER, 1985). Este efeito sobre células vegetativas de *B. stearothermophilus* foi estudado por CAMPBELL Jr. & WILLIAMS (1953). Seus resultados são apresentados na tabela 2. Estes pesquisadores sugerem ainda que a elevação da temperatura é responsável por mutações genéticas, às quais acarretam alterações nas necessidades nutricionais.

TABELA 2 - EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE AS NECESSIDADES NUTRITIVAS DE *B. stearothermophilus*

MICRORGANISMO	NECESSIDADES NUTRITIVAS ¹		
	36°C	45°C	55°C
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 3690	MET, LEU, TIA, NIC, BIO, FOL	MET, TIA, BIO FOL	MET, TIA, BIO, FOL
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 4259	BIO, FOL	MET, HIS, NIC BIO, FOL	MET, HIS NIC, BIO, FOL
<i>B. stearothermophilus</i> ATCC 1373	não cresce	GLU, HIS, MET LEU, BIO	GLU, HIS, MET, LEU, BIO, RIB

1 - MET: metionina; LEU: leucina; TIA: tiamina; NIC: ácido nicotínico; BIO: biotina; FOL: ácido fólico;
HIS: histidina; GLU: ácido glutâmico; RIB: riboflavina. Fonte: CAMPBELL Jr. & WILLIAMS, (1953)

ATKINSON *et alii* (1975) observaram que os nutrientes requeridos para células de *B. stearothermophilus* 1503 são dependentes da fonte de carbono disponível no meio. Em seus experimentos, eles formularam meios complexos com fontes de carbono diferentes. Quando utilizaram a sacarose, apenas os aminoácidos, serina, arginina e biotina foram requeridos; já quando utilizaram glicerol, além dos citados, foram necessários também glutamato, aspartato e treonina para o crescimento vegetativo.

Estudos conduzidos por HILL & FIELDS (1967) relataram que as linhagens rugosas de *B. stearothermophilus* 1518 apresentaram necessidades nutricionais inferiores às das linhagens lisas. Eles estudaram, também, a influência da tensão de oxigênio do meio e a temperatura de incubação no seu crescimento. Foi observado que a linhagem rugosa tem tempo de geração inferior à da linhagem lisa, quando incubados a 55°C sob anaerobiose. O crescimento das duas linhagens foi favorecido a 65°C, quando comparado com o de 45°C. Apesar de haver crescimento de *B. stearothermophilus* em condições

de anaerobiose, vários estudos têm demonstrado que o rendimento de crescimento é maior quando o suprimento de oxigênio no meio é adequado. LONG & WILLIAMS (1959) observaram que a aeração do meio de crescimento a 37°C foi mais favorável que a 55°C sem aeração, para o crescimento de sete linhagens diferentes de *B. stearothermophilus*. DONLEY (1966) também demonstrou que o crescimento deste microrganismo é maior a 37°C, se o suprimento de oxigênio for adequado.

3.3 - DETERIORAÇÃO POR *B. stearothermophilus*

De acordo com a Food and Drug Administration (FDA, 1984) os alimentos que oferecem mais riscos de deterioração são os de baixa acidez. Entende-se como de baixa acidez "quaisquer alimentos, exceto bebidas alcoólicas, que apresentam uma atividade de água superior a 0,85, e um pH de equilíbrio maior que 4,6" (FOOD PROCESSORS INSTITUTE, 1983). Os riscos potenciais oferecidos são de proliferação de bactérias patogênicas, inclusive o *Clostridium botulinum*. O tratamento térmico a que são submetidos esses alimentos, deve ser conduzido de forma a assegurar a esterilidade comercial do produto, visando a eliminação do microrganismo patógeno e/ou deteriorador mais resistente capaz de proliferar no alimento, sob condições normais de armazenamento (LEITÃO *et alii*, 1988). As bactérias termófilas de ocorrência mais frequente nos alimentos de baixa acidez estão distribuídas nos gêneros *Bacillus* e *Dessulfotomaculum* (STUMBO, 1973).

As bactérias do gênero *Bacillus* encontram-se amplamente distribuídas no ambiente e, particularmente, no solo, poeira, matérias orgânicas em decomposição, etc (FIELDS, 1972; STUMBO, 1973). Ainda de acordo com FIELDS (1972), essas bactérias podem ser encontradas em solos de diferentes áreas geográficas, como tropicais, sub-tropicais, desérticas e temperadas.

No gênero *Bacillus*, as espécies de maior importância são

B. stearothermophilus e *Bacillus coagulans*. De acordo com SPECK (1976) a deterioração por esses microrganismos é frequente e ocorre principalmente em alimentos enlatados, sendo genericamente denominada de "flat sour" ou "acidez plana". Este termo refere-se, à formação de ácido sem produção de gases, ficando a aparência das latas inalteradas. Segundo MAUNDER (1976), o *B. stearothermophilus* é deteriorador de alimentos de baixa acidez, particularmente aqueles com valor de pH superior a 5,3. *B. coagulans* é um microrganismo termófilo facultativo, com temperaturas mínimas e máximas de crescimento variando entre 15-60°C, e com capacidade de crescimento em alimentos mais ácidos, com valor de pH entre 4,0 e 4,6 (FIELDS, 1970). Em alimentos com pH final do equilíbrio abaixo de 4,0 não foram descritos casos de deterioração por *Bacillus* sp. (LEITÃO *et alii*, 1983). As condições de esterilização e o pH final de equilíbrio não favorecem o crescimento de *B. coagulans* em alimentos de baixa acidez (HERSON & HULLAND, 1964).

Os esporos de *B. stearothermophilus* podem atingir os alimentos, veiculados pelo solo, poeira, matérias-primas em geral e ingredientes tais como especiarias, amido e açúcar (MAUNDER, 1976; DENNY, 1981). São exemplos típicos desta forma de contaminação:

- a) leite em pó - estes esporos podem germinar e crescer nos equipamentos das plantas processadoras de leite. Tais equipamentos são de difícil sanitização e possuem temperatura interior favorável ao crescimento de termófilos (DENNY, 1981; ITO, 1981);
- b) açúcares e amido - é frequente a presença de esporos de *B. stearothermophilus* nestas matérias-primas. De acordo com MOROZ (1969) apud EIROA *et alii* (1985), o açúcar refinado, em particular, pela natureza da microflora acompanhante e do processamento onde são utilizadas temperaturas elevadas, pode apresentar elevadas populações de esporos termófilos, sendo de grande importância a sua quantificação;

c) matérias-primas e alimentos semiprocessados de origem vegetal - LEITAO *et alii* (1983) estudaram a ocorrência de esporos termófilos nestes alimentos. Os resultados obtidos para *B. stearothermophilus* (tabela 3), embora não evidenciem contaminações elevadas, comprovam a sua ocorrência. Levando-se em consideração a sua extrema resistência à ação do calor, compreende-se que mesmo níveis reduzidos de contaminação podem resultar em perdas severas de alimentos processados;

TABELA 3 - CONTAGENS MÉDIAS DE ESPOROS DE *B. stearothermophilus* NA SUPERFÍCIE DE MATÉRIAS-PRIMAS VEGETAIS

MATÉRIA-PRIMA	UFC/g
Cogumelos frescos	2,5
Ervilhas secas	0,9
Ervilhas frescas	5,0
Milho verde em grãos	2,0
Cenoura fresca	0,0
Batata fresca	0,0
Vagem fresca	0,2

Fonte: LEITAO *et alii* (1983)

d) farinhas, condimentos, melaço, leite condensado, cacau, etc. - utilizados como matérias-primas de alimentos formulados são considerados carreadores em potencial de esporos de microrganismos termófilos (NAT CANNERS ASSOCIATION RESEARCH LAB., apud LEITAO *et alii*, 1988).

A deterioração por "flat-sour" pode ser causada por subprocessamento térmico, por resfriamento inadequado após a esterilização comercial e, ainda, por estocagem após o processamento, em ambientes com temperaturas elevadas (STUMBO,

1973; LOPEZ, 1987). O controle de "flat-sour" em uma planta de processamento de alimentos faz-se estritamente necessário para assegurar a esterilidade comercial destes produtos, principalmente em locais de clima tropical. Para tanto, o binômio tempo/temperatura de processamento térmico deve ser rigorosamente calculado e convenientemente executado (LEITAO *et alii*, 1988). Além disso, faz-se necessária boa sanitização dos equipamentos, da planta e das matérias-primas cruas, utilizando-se de água clorada com 2.5 ppm de cloro residual livre (TROLLER, 1983). Resíduos de solo devem ser eliminados da matéria-prima "in natura". Finalmente, há necessidade de monitorar a temperatura da água de resfriamento das latas, após a esterilização comercial, para que a mesma se mantenha abaixo do limite mínimo de crescimento de bactérias termófilas (FIELDS, 1970; LOPEZ, 1987; LEITAO *et alii*, 1988). O fenômeno de não crescimento de termófilos após a esterilização comercial foi denominado de "auto-esterilização" por PEARSE (1952) apud ITO (1981), FIELDS (1970) e DENNY (1981). A auto-esterilização por "flat-sour" em alimentos de baixa acidez redonda na perda da viabilidade de bactérias, após a ativação e germinação ocorridas durante a esterilização comercial (ITO, 1981).

3.4 - RESISTÊNCIA TÉRMICA DE ESPOROS DE *B. stearothermophilus*

A avaliação da resistência térmica de células vegetativas e de esporos bacterianos é fundamentada na determinação de dois parâmetros, os valores "D" e "Z" (STUMBO, 1973; PFLUG, 1982).

O valor D, também denominado Coeficiente de Morte Térmica Razão Letal ou Índice de Redução Decimal, corresponde ao tempo, em minutos, em uma temperatura fixa, capaz de reduzir em 90% o número de células ou esporos presentes numa suspensão. Este valor pode ser obtido através de um gráfico do logaritmo de base 10 do número de sobreviventes (x) pelo tempo de exposição ao calor (y). Obtém-se, assim, uma curva denominada "Curva de Sobreviventes". O valor D corresponde, numericamente, ao número de minutos, para

que a "Curva de Sobreviventes" atravessasse um ciclo logarítmico e, matematicamente, é igual ao recíproco da inclinação da porção retilínea desta (STUMBO, 1973).

Os métodos comumente utilizados para se determinar a resistência térmica das bactérias e esporos são:

- 1 - Tempo de Morte Térmica (TDT) - método do tubo ou ampola selada (BIGELOW & ESTY, 1920);
- 2 - Tempo de Morte Térmica (TDT) - método da lata (AMERICAN CAN COMPANY, 1943);
- 3 - método do Tanque (WILLIAMS *et alii*, 1937);
- 4 - método do Frasco (LEVINE *et alii*, 1927);
- 5 - método do Termorresistômetro (STUMBO, 1948);
- 6 - método do Tubo TDT não selado (SCHMIDT, 1957);
- 7 - método do Tubo Capilar (STERN & PROCTOR, 1954).

Estes métodos baseiam-se na exposição da suspensão bacteriana ou de esporos a diferentes tempos de aquecimento, em uma temperatura fixa, com posterior contagem da população de sobreviventes. Esta última operação efetiva-se através dos métodos usuais de contagem microbiana, após a incubação sob condições ideais. A morte térmica é logarítmica e, portanto, linear em grande parte da "Curva de Sobreviventes" (TOMLINS & ORDAL, 1976). Entretanto a porção inicial da "Curva de Sobreviventes" pode apresentar-se não linear e deve ser desconsiderada para os cálculos do valor D. De acordo com ABRAHAM *et alii* (1990) esse fato pode ser atribuído a vários fatores como: presença de grumos de esporos; ativação de esporos, retardando o processo de destruição; ou presença de esporos com dormência variada, ou seja, alguns facilmente ativados, outros extremamente dormentes.

Os esporos de *B. stearothermophilus* apresentam um valor $D_{121}^{\circ}\text{C}$ de 4,0-5,0 minutos (STUMBO, 1973), mas vários fatores podem afetar este parâmetro, como o tempo e temperatura de incubação das células sobreviventes; a composição do meio de

subcultura; a composição do meio de aquecimento; etc. Influenciam também na resistência térmica de células e esporos os parâmetros relacionados com a produção dos mesmos, como meio de esporulação e condições de incubação (YOKOYA & YORK, 1965). Diversas pesquisas foram conduzidas com o objetivo de avaliar as variações do valor D em função dos fatores extrínsecos, pois é de suma importância o seu cálculo sob diferentes condições, a fim de se estabelecer, com rigor, o processo térmico requerido pelos alimentos de baixa acidez. De grande relevância foi a pesquisa desenvolvida por COOK & GILBERT (1968). Eles demonstraram que a contagem máxima de células sobreviventes de *B. stearothermophilus* aquecidos durante 10 minutos a 115°C, dá-se quando a incubação posterior é realizada numa faixa de temperatura variando entre 50°-65°C, em um período máximo de três dias, quando comparados com a incubação a 45°-50°C, durante sete dias. A composição do meio de subcultura também influenciou significativamente a contagem de sobreviventes e, conseqüentemente, o valor D. O meio de cultura Antibiotic Assay Medium Agar, modificado pela adição de amido a 0,1%, pH 7,3, mostrou-se superior ao Agar-dextrose-triplona (ADT) pH 6,9. Os pesquisadores discutiram a provável inibição do crescimento vegetativo causada pelo indicador de pH, púrpura de bromocresol, componente do meio de cultura ADT. Foram avaliados também vários veículos diluentes para se fazer a subcultura dos esporos ativados. Concluíram que utilizando água destilada esteril, obtém-se maior contagem de sobreviventes, influenciando na obtenção do valor D. O efeito da púrpura de bromocresol sobre o desenvolvimento de esporos ativados de *B. stearothermophilus* NCA 1518 também foi verificado por EIROA et alii (1985).

A atividade de água (Aa) e o potencial de oxi-redução (Eo) do meio de aquecimento são outros fatores que interferem na resistência térmica dos esporos. HARNULV et alii (1977) compararam o valor D_{120°C} de *B. stearothermophilus* em três tipos de alimentos com Aa de 0,98; 0,63 e 0,33. Para os três alimentos o valor D_{120°C} foi inversamente proporcional à Aa. Estes resultados não são condizentes com os obtidos anteriormente por

VILJOEN (1962). Este verificou que quanto maior a concentração salina da salmoura de vegetais - meio de aquecimento utilizado para determinação da resistência de microrganismos termófilos - menor o valor D e atribuiu este resultado ao efeito do sal, e não à Aa reduzida. RAJU & KUMAR (1989) encontraram que o valor $D_{120^{\circ}\text{C}}$ de *B. stearothermophilus*, quando aquecidos em meios com Eo baixo, é diminuído, quando comparado com outros valores de Eo. Este fato parece estar relacionado com falhas de crescimento ou destruição de enzimas sob estas condições.

O valor de pH do meio de aquecimento dos esporos ou células vegetativas é, igualmente, um parâmetro discutível na determinação do valor D. LEITAO *et alii* (1977) determinaram o valor $D_{113^{\circ}\text{C}}$ para esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 aquecidos em purê de banana com diferentes valores de pH. Os resultados evidenciaram uma acentuada elevação da resistência com o aumento do pH, com valores de 3,1; 7,6; 11,3 e 12,2 minutos quando o pH final de equilíbrio foi ajustado para 4,7; 5,3; 5,7 e 6,6 respectivamente. Estes resultados foram confirmados por SRIMANI & LONCIN (1980) e MALLIDIS & SCHOLEFIELD (1986). Os primeiros determinaram o valor $D_{100^{\circ}\text{C}}$ para esporos de *B. stearothermophilus* aquecidos em solução tampão com pH ajustados para 6,5; 5,85; 5,72 e 4,8. Os valores $D_{100^{\circ}\text{C}}$ obtidos foram 2,79 h; 1,63 h; 1,25 h e 19 minutos. Os resultados obtidos por MALLIDIS & SCHOLEFIELD (1986) sobre a redução do valor $D_{120^{\circ}\text{C}}$ para *B. stearothermophilus* 8923 foi avaliado no meio de subcultura Antibiotic Assay Medium em pH 6,5 e 7,3.

Tal como o valor D, o valor Z é determinado graficamente; matematicamente equivale ao recíproco da inclinação da "Curva de Resistência Térmica" ou "Curva Fantasma de Morte Térmica". Essa curva é obtida anotando-se no eixo das coordenadas o logaritmo dos valores D a cada temperatura e no eixo das abscissas as temperaturas correspondentes. O gráfico obtido reflete a resistência térmica das células vegetativas ou esporos bacterianos em diferentes temperaturas (STUMBO, 1973; PFLUG 1982; LEITAO *et alii*, 1988). Para esporos de *B. stearothermophilus*, o

valor Z varia de 14 a 22°C (STUMBO, 1973). Para um determinado microrganismo, o valor Z é relativante constante, não sofrendo grandes variações, quando se alteram as condições físicas e/ou químicas dos testes para a sua determinação, como por exemplo: pH, composição do meio de aquecimento e subcultura, meio de cultura e condições de incubação para produção de esporos, etc (TOMLINS & ORDAL, 1976).

O valor Fp ou Valor de Esterilização equivale ao tempo total do processo, numa temperatura fixa, para atingir o nível de destruição térmica pré-estabelecido da população de esporos eleita como indicador biológico. Na esterilização dos alimentos de baixa acidez, o indicador biológico empregado constitui-se da suspensão de esporos de *B. stearothermophilus* ou *C. botulinum* (STUMBO, 1973). O valor Fp entregue a um produto é obtido experimentalmente pela somatória dos efeitos letais ao longo do processo. Este valor pode ser representado pela equação abaixo (STUMBO, 1973):

$$F_p = \int_{t_o}^{t_b} L dt \quad (1)$$

tb = tempo final do processo;

to = tempo inicial;

L é a letalidade do processo e é calculada por:

$$L = 10^{[(T-Tr)/Z]} \quad (2)$$

T = temperatura do alimento

Tr = temperatura de referência

O cálculo do Valor de Esterilização, F, pode ser obtido também por outra equação (STUMBO, 1973):

$$F = \sum D \quad (3)$$

onde D corresponde à resistência térmica do microrganismo eleito como indicador biológico nas condições do experimento e corresponde ao número de reduções decimais da população de esporos previstas durante a esterilização. Quando o microrganismo alvo corresponder ao *B. stearothermophilus*, utilizam-se de 4 ou 5 reduções decimais (STUMBO, 1973).

3.5 - ASPECTOS GERAIS SOBRE A NISINA

3.5.1 - Características e composição química

HAWLEY (1957), em sua pesquisa bibliográfica sobre a nisina, a caracterizou como uma substância inibidora para os microrganismos, produzida por algumas linhagens de *Streptococcus lactis* Lancefield Grupo N. O *S. lactis* é um microrganismo encontrado em queijos, onde a nisina é naturalmente produzida, inibindo o crescimento de outros microrganismos. O nome nisina deriva de NIS (N -Group Inhibitory *Streptococcus*) e o sufixo INA. Atualmente, o microrganismo produtor da nisina foi corretamente classificado como *Lactobacillus lactis* subespécie *lactis* (DELVES-BROUGHTON, 1990b).

A nisina comercial é exclusivamente produzida por fermentação microbiana. Entretanto, existem informações escassas sobre os parâmetros nutricionais, o controle físico-químico, e ainda sobre a produção de metabólitos para a otimização da sua produção. VUYST & VANDAME (1992) estudaram a fermentação de *L. lactis* subespécie *lactis* NIZO 22186 em um meio complexo formulado com sacarose (10,0 g), peptona (10,0 g), extrato de levedura (10,0 g), KH_2PO_4 (10,0 g), NaCl (2,0 g) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g). Eles observaram que a nisina é produzida durante a fase de crescimento vegetativo exponencial e que a fonte de carbono disponível no meio é o fator que exerce maior controle sobre a sua produção.

A estrutura molecular da nisina foi elucidada em 1971 por Gross & Morrel. Ficou evidenciado que a molécula é um peptídeo formado por 34 aminoácidos, com cinco ligações sulfídricas circulares. Estas ligações originam os aminoácidos não protéicos: lantionina e beta-metil-lantionina, sendo que este último é responsável por 25% do peso molecular. A molécula possui ainda os aminoácidos alfa e beta insaturados: dehidroalanina (DHA) e dehidrobutireno (DHB), produtos da desidratação dos aminoácidos serina e treonina, respectivamente (JARVIS & MORISETTI, 1969). Todos os outros aminoácidos presentes encontram-se na configuração L (DELVES-BROUGHTON, 1990a; VAN DE VEN *et alii*, 1991;), nas proporções indicadas na tabela 4.

TABELA 4 - COMPOSIÇÃO EM AMINOACIDO DA MOLÉCULA DE NISINA "A"

AMINOACIDO	CONCENTRAÇÃO (g/100g)
Leucina + Isoleucina	16,85
Metionina	6,41
Valina	5,07
Prolina	3,86
Alanina	4,76
Glicina	6,62
Serina	1,53
Acido aspártico	5,46
Histidina	7,17
Lisina	18,95
beta-metilantionina	23,30
Lantionina	6,46

Fonte: HALL (1966)

A sua estrutura é apresentada na figura 1.

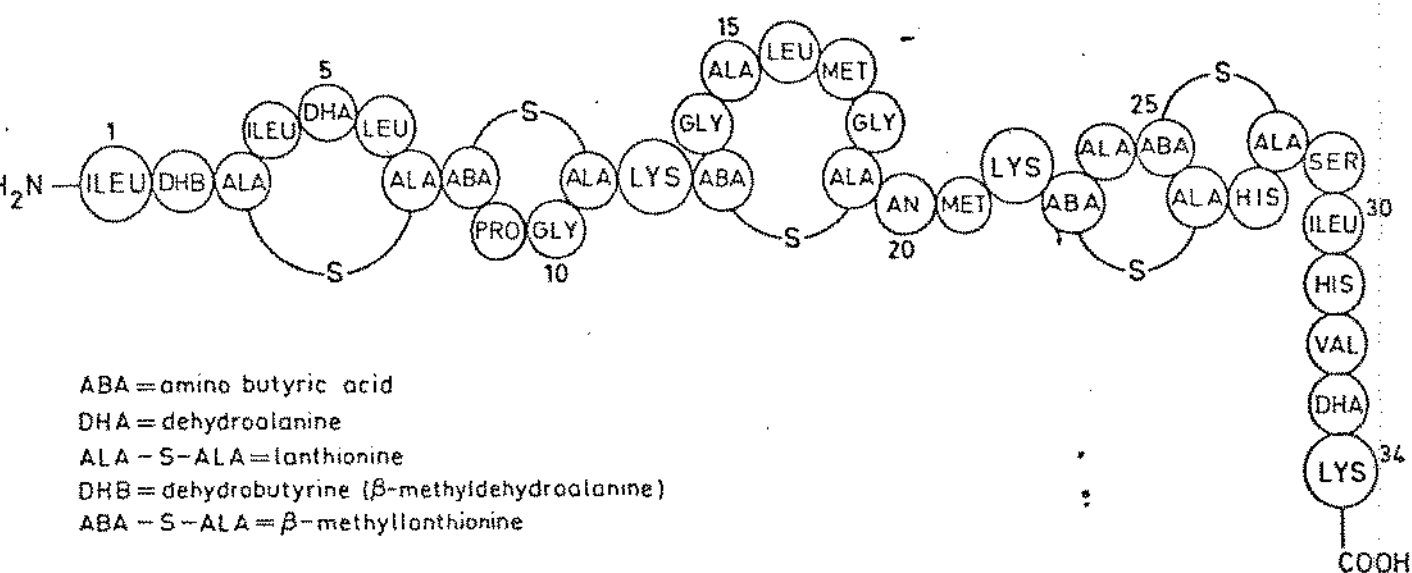


FIGURA 1 - ESTRUTURA MOLÉCULAR DA NISINA

Fonte: DELVES - BROUGHTON (1990b)

A estrutura molecular da nisina é muito semelhante à da bacteriocina subtilin. O subtilin apresenta também os aminoácidos lantionina e beta-metil-lantionina e, diferentemente da nisina, contém o aminoácido triptofano, confirmado pela absorção óptica a 275nm (HALL, 1966; HURST, 1983). Estas duas bacteriocinas, além da estrutura química, têm modo de ação, utilização em alimentos e espectro antimicrobiano muito semelhantes (JAY, 1983).

Nisina é um termo empregado para cinco polipeptídeos bioquimicamente afins, designados, respectivamente por Nisina-A, Nisina-B, Nisina-C, Nisina-D e Nisina-E. Todos estes polipeptídeos têm atividades antimicrobianas semelhantes (HALL, 1966; HOLLEY, 1981), notando-se que têm propriedades físicas e/ou químicas ligeiramente diferentes (HAWLEY, 1957). O produto comercial é do tipo "A" e compõem-se de duas subunidades de 3500 dáltons, conseqüentemente seu peso molecular é de 7000 dáltons (HURST, 1983).

As especificações dos componentes químicos da nisina comercial (Nisaplin) é indicada na tabela 5 (FOWLER, 1979)

TABELA 5 - COMPOSIÇÃO DO NISAPLIN

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO
Nisina	1026 UI/mg
NaCl	74,7%
Proteína	17,12%
Carboidratos	5,93%
Umidade	1,7%
Gordura	traços
Fibras	ausente
Elementos	
Zinco	9,2 ppm
Cobre	0,5 ppm
Chumbo	0,15 ppm
Arsênico	menos que 0,5 ppm

Fonte: FOWLER (1979)

3.5.2 - Propriedades físico-químicas da nisina

A solubilidade e a estabilidade da nisina são dependentes do valor de pH do meio onde será dissolvida. Apresenta-se pouco solúvel em soluções com pH próximo à neutralidade (JARVIS & MORISETTI, 1969), sendo em torno de 4% a sua solubilidade em soluções com pH 5,0 (HURST, 1983). Já em soluções com pH 2,5, sua solubilidade é de 12%, podendo ser autoclavadas a 121°C durante 15 minutos, sem haver perda de atividade (HALL, 1966 ; HURST, 1983 ; LIU & HANSEN, 1990). De acordo com HALL (1966) e LIU & HANSEN (1990) a solubilidade reduzida em soluções próximas à neutralidade explica-se pela polimerização da molécula, mascarando os agrupamentos polares que se ligam com às moléculas de água.

A destruição da nisina está relacionada com o pH do substrato de aquecimento. De acordo com DELVES-BROUGHTON (1990a) a porcentagem de retenção de atividade, quando aquecida a 121°C durante 15 minutos, é de 100; 71, 35, 14,5 e 0,5% em pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0, respectivamente. JARVIS & MORISETTI (1969) atribuíram essa estabilidade à presença de proteínas associadas ao Nisaplin. As proteínas contidas nos alimentos também parecem conferir proteção adicional à perda da atividade, durante o aquecimento (EAPEN *et alii*, 1983).

3.5.3 - Definição das unidades internacionais

Até 1964, definia-se como Unidade Internacional de nisina o equivalente ao recíproco da menor concentração requerida para inibir o crescimento de *S. agalactiae*, quando estes eram inoculados sob condições padronizadas (HURST, 1983).

Em 1964, TRAMER & FOWLER redefiniram as Unidades Internacionais de nisina, e esta definição é a aceita até os dias atuais. Os autores padronizaram que um grama de nisina comercial, quando diluída em 1 ml HCl 0,02N, contém 10^6 Unidades Internacionais /ml.

3.5.4 - Espectro antimicrobiano

A nisina, isoladamente, possui um espectro antimicrobiano restrito, praticamente sem efeito em bactérias Gram negativas, fungos e leveduras, com exceção de *Neisseria* (HURST, 1983).

Estudos recentes, entretanto, demonstraram que a nisina, quando associada a agentes quelantes, exibe efeitos bactericidas também em bactérias Gram negativas. STEVENS *et alii* (1991) avaliaram o efeito da nisina junto com o EDTA em várias espécies de *Salmonella* e outras bactérias Gram negativas como *Enterobacter aerogens*, *Shigella flexneri*, *Citrobacter freundii* e *Escherichia*

coli. Os autores observaram que a exposição das bactérias à soluções de nisina ou EDTA isoladamente não produziu inibição significativa, com redução nas populações inferiores a um ciclo logarítmico. Entretanto, o efeito sinergista acarretou reduções populacionais de 3,2 a 6,9 ciclos logarítmicos.

Em células bacterianas Gram positivas e esporos a nisina apresenta-se como uma bacteriocina eficiente, com amplo espectro de ação, como apresentado na tabela 6.

TABELA 6 - BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E ESPOROS SENSÍVEIS A NISINA

MICROORGANISMO	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA
<i>Bacillus</i>	O'BRIEN <i>et alii</i> (1956); WHEATON & HAYS (1964)
<i>Clostridium</i>	SCOTT & TAYLOR (1981a,b) SOMERS & TAYLOR (1987);
<i>Corynebacterium</i>	MATTICK & HIRSCH (1947)
<i>M. tuberculosis</i>	MATTICK & HIRSCH (1947)
<i>Neisseria</i>	MATTICK & HIRSCH (1947)
<i>Pneumococcus</i> tipo 1	MATTICK & HIRSCH (1947)
<i>Pneumococcus</i> tipo 2	MATTICK & HIRSCH (1947)
<i>S. aureus</i>	MATTICK & HIRSCH (1947); GOWANS <i>et alii</i> (1952, apud HURST, 1981)
<i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> .	OGDEN & TUBB (1985); RADLER (1990b)
<i>Listeria monocytogenes</i>	BENKERROUN & SANDINE (1988) HARRIS <i>et alii</i> (1991)

Concentrações mínimas de nisina, como 10µg/ml, têm excelente ação inibitória sobre *L. monocytogenes*. Este é um

importante patógeno associado a toxinfecções de origem alimentar, com ampla distribuição no ambiente, capacidade de multiplicação à temperatura de refrigeração, tolerância a valores de pH baixos e altos níveis de NaCl. Nisina, na concentração indicada, é capaz de reduzir, populações de *L. monocytogenes* em 6-7 ciclos logarítmicos (HARRIS *et alii*, 1991).

A nisina inibe a maioria dos esporos pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*, ressaltando-se ainda, que a forma esporulada destes microrganismos é mais sensível à sua ação, que as células vegetativas (CAMPBELL Jr. & O'BRIEN, 1955; O'BRIEN *et alii*, 1956).

3.5.5 - Modo de ação da nisina

3.5.5.1 - Em células vegetativas

HIRSCH (1954) demonstrou que a primeira etapa necessária para ocorrer a inibição pela nisina é a sua absorção pelo microrganismo alvo da destruição, com formação de um complexo entre eles. Seus resultados evidenciaram que substâncias presentes que interferem na formação deste complexo, como o carvão vegetal, tornam os microrganismos resistentes à sua ação.

RAMSEIER (1960) demonstrou que células sensíveis à sua inibição sofrem ruptura, com liberação do material citoplasmático. RAMSEIER (1960) concluiu, ainda, que a nisina age como detergente catiônico, em membranas citoplasmáticas.

De acordo com JAY (1983), o alvo da inibição é a síntese do ácido muréico, componente da parede celular bacteriana.

HENNING *et alii* (1986a) observaram que o efeito antimicrobiano é causado pela interação com os fosfolípídeos componentes da membrana citoplasmática, e que os microrganismos Gram positivos são ainda mais sensíveis à sua ação. O ácido muréico é também inibido, ocasionando um efeito sinergista no

distúrbio das funções da membrana.

Estudos sobre a ação da nisina em células vegetativas foram conduzidos por MORRIS *et alii* (1984). Estes pesquisadores indicaram que a sua ação ocorre por inativação de grupos sulfidrílicos presentes na membrana citoplasmática.

RUHR & SAHL (1985) estudaram o modo de ação da nisina em bactérias Gram positivas, como *S. cohnii* 22, *B. subtilis* W 23, *Micrococcus luteus* ATCC 4698, *Streptococcus zymogenes* 24 e também em vesículas artificiais. Os dados obtidos foram conclusivos sobre os distúrbios ocasionados nas membranas citoplasmáticas. Estes resultados são concordantes com os obtidos recentemente por GAO *et alii* (1991) e GARCERA *et alii* (1993), os quais evidenciaram alterações no potencial de membrana e de gradiente de pH, com indução do efluxo de componentes celulares de baixo peso molecular.

Pelo exposto acima, pode-se deduzir que não há uniformidade de entendimento sobre o modo de ação da nisina em células vegetativas, apesar de todos os estudos sugerirem que a sua ação se dá na membrana citoplasmática.

3.5.5.2 - Em esporos bacterianos

Há concordância na literatura sobre o fato da nisina reduzir a resistência térmica dos esporos, ou seja, aumentar a sensibilidade dos mesmos ao calor.

Em 1955, CAMPBELL Jr. & O'BRIEN estudaram a ação da nisina sobre esporos de bacilos e clostrídeos. Segundo estes pesquisadores, a nisina reduz o valor D dos esporos estudados porque é transportada do meio de aquecimento para o de subcultura. Eles demonstraram que concentrações de 0,03 ppm de nisina no meio de subcultura são suficientes para reduzir a contagem de sobreviventes e, conseqüentemente, influir no valor D.

O'BRIEN *et alii* (1956) estudaram os efeitos de algumas bacteriocinas sobre a resistência térmica dos microrganismos

termófilos. Eles verificaram uma redução de 30% no valor $D_{121}^{\circ}\text{C}$, para esporos de *B. stearothermophilus*, com 140 UI/g de nisina, utilizando-se como meio de aquecimento, o purê de ervilhas.

LIPINSKA (1977) apud DELVES-BROUGHTON (1990b) verificou que a sensibilidade dos esporos de *B. stearothermophilus* à nisina é incrementada quando é exposta a temperatura maior (figura 2):

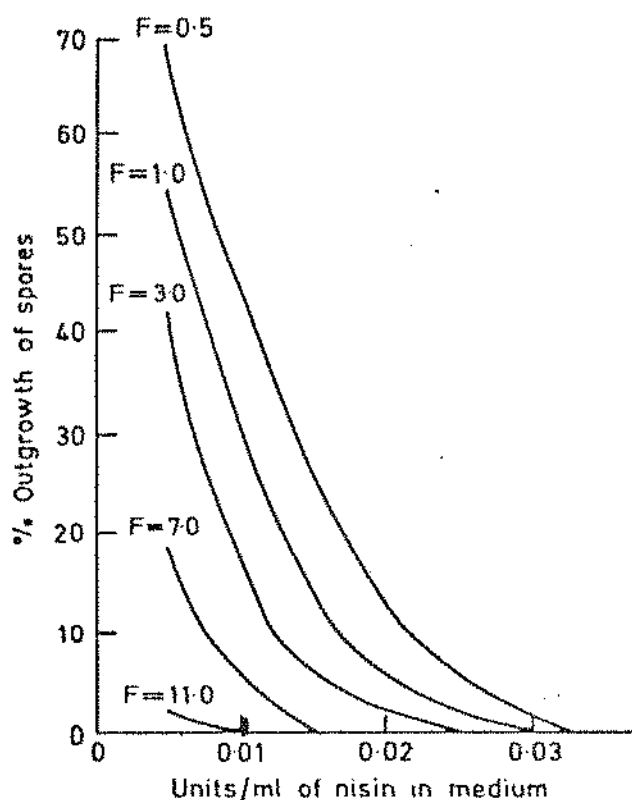


FIGURA 2 - SENSIBILIDADE DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* A AÇÃO DA NISINA SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO TÉRMICO

Ponte: LIPINSKA (1977) apud DELVES - BROUGHTON (1990b)

SCOTT & TAYLOR (1981b) também demonstraram que concentrações menores de nisina são necessárias para impedir o crescimento pós-germinativo do *C. botulinum* tipo A, B e E, quando

se aumentam o binômio tempo/temperatura de ativação ao calor.

CAMPBELL Jr. & SNIFF (1959) e THORPE (1960) evidenciaram o efeito da tripsina no meio de subcultura utilizado para contagem de células sobreviventes de *B. coagulans* e *B. stearothermophilus*, após a exposição ao calor e nisina. Eles verificaram que este meio, quando adicionado de tripsina, permitiu o crescimento bacteriano normal, semelhante ao de esporos sobreviventes, submetidos somente à ação do calor. Para TRAMER & FOWLER (1964) a tripsina é uma enzima com capacidade de destruir a nisina. THORPE (1960) sugeriu ainda que a redução no valor D, quando se utilizam a nisina, se deve à adsorção da mesma pelos esporos, e que sua ação é esporostática.

THORPE (1960) levantou dúvidas se a nisina previne a etapa de germinação dos esporos ou se os esporos germinam, mas não ocorre o crescimento pós-germinativo. CAMPBELL Jr. (1957) e CAMPBELL Jr. & SNIFF (1959) demonstraram que a nisina inibe o crescimento pós-germinativo dos esporos de *B. coagulans*. Para HITCHINS *et alii* (1963) e DELVES-BROUGHTON (1990a), a inibição dos esporos de *B. stearothermophilus* pela nisina se dá na fase de entumescimento, conforme mostrado na figura 3.

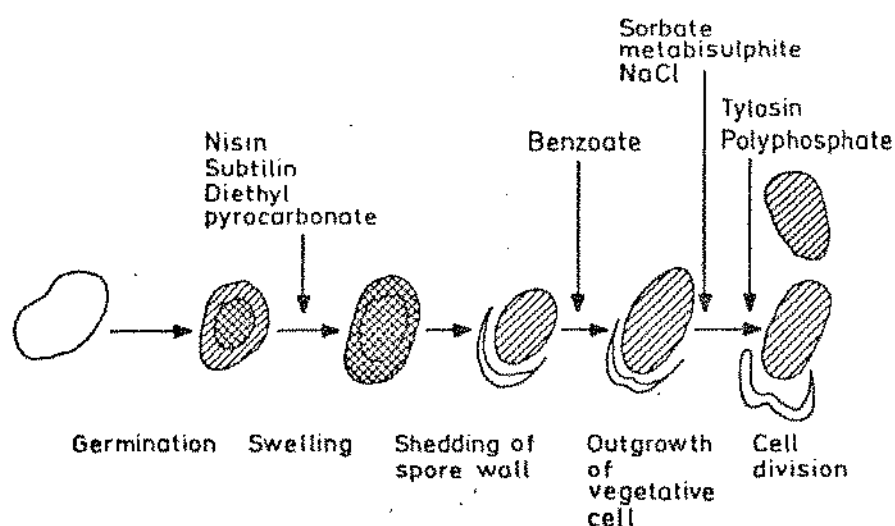


FIGURA 3 - INIBIÇÃO DA FASE DE ENTUMESCIMENTO DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* PELA NISINA

Fonte: DELVES - BROUGHTON (1990a)

GUPTA *et alii* (1971), quando estudaram o efeito sinergista de íons monovalentes e divalentes com a nisina em várias espécies do gênero *Bacillus*, concluíram, também, que a inibição ocorre ao nível do crescimento pós-germinativo. Por sua vez, os experimentos conduzidos por TRAMER (1964) apud HALL (1966) e JARVIS & MORISETTI (1969) demonstraram que a nisina inibe a etapa de germinação dos esporos.

Estudos sobre a ação da nisina em esporos a nível molecular foram conduzidos por REISENGER *et alii* (1980) e recentemente por LIU & HANSEN (1990). Os primeiros pesquisadores obtiveram resultados evidenciando que a nisina se complexa com pentapeptídeos intermediários da síntese do ácido muréico, resultando na sua própria inibição. LIU & HANSEN (1990) demonstraram que os resíduos de dehidroalanina e dehidrobutireno da molécula de nisina causam modificações nos grupos sulfidrílicos presentes na capa dos esporos germinados.

Como discutido para células vegetativas, também a ação da nisina sobre esporos a nível molecular não é conclusiva, necessitando de estudos complementares.

3.6 - FATORES QUE INTERFEREM NA EFICIÊNCIA DA NISINA

RAYMAN *et alii* (1981) demonstraram que o poder inibidor da nisina depende do valor de pH do alimento onde será empregada e da biocarga de esporos contida no mesmo. Esses pesquisadores estudaram o efeito inibidor no crescimento pós-germinativo de esporos de *C. sporogenes* PA 3679, inoculados em salsichas. Foi verificado que a eficiência da nisina foi reduzida no produto com valores de pH acima de 6,5 e, também, com o aumento da concentração do inóculo. A nisina não inibiu populações deste microrganismo de 10^6 UFC/ml. No mesmo experimento, foi observado que a sensibilidade do *C. sporogenes* PA 3679 à nisina é dependente do binômio tempo/temperatura de ativação ao calor subletal. Estes resultados foram coincidentes com os obtidos por

SCOTT & TAYLOR (1981b) e RAYMAN *et alii* (1981).

GUPTA *et alii* (1971, 1972) demonstraram que a ação da nisina sobre esporos termorresistentes é dependente ainda do tipo e da natureza dos metabólitos contidos nos alimentos. Os pesquisadores averiguaram que ions divalentes como: cobre, ferro e manganês, adicionados no meio Caldo Nutriente (CN), utilizado para averiguar a germinação, aumentam a sua efetividade. Foi estudado também o efeito sinergistas de açúcares com a nisina, na inibição da germinação de *B. stearothermophilus*. Concluíram que a ribose, numa concentração de 0,1 M é o açúcar que mostra ter a maior eficácia de inibição, quando adicionado à nisina.

HENNING *et alii* (1986b) demonstraram que a adição de agentes emulsificantes no alimento diminui a eficiência da nisina, para inibir esporos de *B. coagulans*.

Células vegetativas de *B. cereus*, sintetizam durante o crescimento vegetativo uma enzima capaz de inativar a nisina. Há evidências que esta enzima é uma redutase, mais especificamente, uma dehidropeptídeo redutase (JARVIS & MORISETTI, 1969). As células vegetativas de *B. cereus* são insensíveis a 25 ppm de nisina. HAWLEY (1961), apud BOONE (1966) demonstrou que o tempo de morte térmica (TDT) desses esporos é reduzido de 45 minutos para 6, quando em presença de apenas 2,5 ppm dessa bacteriocina, a 107°C. Estes resultados confirmam a síntese da nisinase durante o crescimento vegetativo da referida bactéria. Esta nisinase é capaz de inativar apenas as nisinas do tipo A, B, C e E (JARVIS & FARR, 1971).

Resumidamente os fatores que afetam a melhor atuação da nisina são:

- tipo e biocarga do inóculo;
- o pH final de equilíbrio do alimento ou solução onde será empregada;
- o binômio tempo/temperatura a que o microrganismo alvo é submetido.

3.7 - TOXICIDADE E COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DA NISINA

EAPEN *et alii* (1983) citam os primeiros testes sobre a toxicidade aguda da nisina realizados por Hara *et alii* (1962), no Japão. Segundo eles, estes últimos pesquisadores estabeleceram a Dose Letal Mínima (DL₅₀) da nisina para gatos e ratos, por via oral. O valor DL₅₀ para a nisina é similar ao valor da DL₅₀ para o sal comum, isto é, 6950 mg/K de peso corpóreo. Esses resultados confirmam o pressuposto de que a nisina é uma substância atóxica, ou de baixa toxicidade, tanto que é consumida, em queijos e leite, há milênios sem nenhum efeito tóxico aparente (HURST, 1983; DELVES-BROUGHTON, 1990b).

SHTENBERG & IGNAT'EV (1970) estudaram exaustivamente a toxicidade da nisina isolada e quando combinada com outros preservativos, como o ácido sórbico. Confirmaram a atoxidade da nisina isoladamente; entretanto, quando associada ao ácido sórbico tornou-se tóxica. Entretanto, foi constatado que estes dois aditivos são incompatíveis, pois o ácido sórbico anula a atividade da nisina (HURST, 1983).

A nisina é rapidamente inativada por enzimas digestivas, como a pancreatina e a L-quimiotripsina e não é detectada na saliva humana após 10 minutos da ingestão. Este tempo não é suficiente para permitir o desenvolvimento de microrganismos resistentes. Além disso, as condições enzimáticas do trato digestivo humano desestabiliza a sua molécula (CLAYPOLL *et alii*, 1966).

3.8 - EMPREGO DA NISINA EM ALIMENTOS

A nisina tem sido utilizada, com muito sucesso, como auxiliar no tratamento térmico. Segundo HEINEMANN *et alii* (1965), uma substância auxiliar no tratamento térmico é aquela que, em concentrações baixas, se mostra capaz de prevenir o crescimento

pós-germinativo de esporos remanescentes do tratamento térmico mínimo. Entende-se por tratamento térmico mínimo o binômio tempo/temperatura requerido para destruir a flora patôgenica de um alimento. No caso de alimentos de baixa acidez, o microrganismo alvo da destruição são os esporos de *C. botulinum* (STUMBO, 1973). Ainda de acordo com HEINEMANN *et alii* (1965), uma substância para ser aceita como auxiliar no tratamento térmico deve atender aos seguintes requisitos:

- sua toxicologia deve ser conhecida e aceita pelos órgãos oficiais de fiscalização de saúde;
- não deve ter efeito deletério em nenhuma das características organolépticas do alimento;
- deve ser suficientemente estável ao calor, para resistir às condições de processamento;
- deve ser efetiva contra todos os esporos sobreviventes do processo térmico mínimo;
- não deve alterar substancialmente o custo final do produto;
- deve ser suficientemente estável na estocagem, principalmente se sua ação depender de um efeito residual no alimento;
- deve ser efetiva em baixas concentrações (partes por milhões ou menos);
- não deve ter aplicação medicinal;
- deve ser de fácil manuseio;
- deve permitir uma redução substancial no valor de esterilização requerido pelo alimento.

A nisina é aceita na indústria de alimentos por atender,

em grande parte, os requisitos supra citados. Exemplos da sua utilização em tratamentos termoquímicos, com o objetivo específico de inibir os esporos de *B. stearotherophilus* são mostrados na tabela 7.

TABELA 7 - UTILIZAÇÃO DA NISINA NO PROCESSAMENTO TERMOQUÍMICO DE ALIMENTOS ALMEJANDO A INIBIÇÃO DE ESPOROS DE *B. stearotherophilus*

ALIMENTO	TRATAMENTO TERMO QUÍMICO	RESULTADOS OBTIDOS	REFERÊNCIAS
Conserva de milho em salmoura	15 ppm + 15 min/121°C	Redução de 20% no valor D	CAMPBELL Jr <i>et alii</i> , (1959)
Cogumelos em salmoura	25 UI/g + 5 min/121°C	Não permitiu o crescimento de esporos inoculados	DENNY <i>et alii</i> , (1961)
Creme de milho e "Chow mein"	1ppm + Fo = 3 min	Não ocorreu deterioração após incubação por 60 dias/55°C	WHEATON & HAYS (1964)
Purê de Cogumelos	40 UI/ml + Fo = 3 min	Não ocorreu deterioração nas latas inoculadas	HEINEMANN <i>et alii</i> (1965)
"Upma" pH 5,0-5,2 (trigo + vegetais + gengibre + mostarda)	25 UI/g + Fo = 2 min	Aumentou a vida útil destes alimentos em	SINGH <i>et alii</i>
"Kheer" pH 6,2-6,4 (tipo de arroz doce)	200 UI/g + Fo = 3,0 min	6 meses	(1987)

Note-se que a nisina pode ser também utilizada em outros tipos de alimentos.

3.8.1 - Alimentos crus

Frutas: o emprego da nisina em frutas só é aplicável naquelas sujeitas à fermentação butírica, já que fungos e leveduras são praticamente insensíveis à sua ação (HAWLEY, 1957; EAPEN *et alii*, 1983).

3.8.2 - Alimentos pasteurizados

a) Queijos: esporos de clostrídeos não são aptos a crescer em queijos, devido à acidez, à alta concentração salina e pela flora microbiana presente. Entretanto, no interior destes alimentos pode haver alterações destas condições, criando ambiente físico-químicos favoráveis para o crescimento de microrganismos como *C. butyricum*, *C. tyrobutiricum*, *C. sporogenes* e até de *C. botulinum*. Quando presentes, estes esporos são oriundos da matéria-prima e podem sobreviver ao processo de pasteurização (FOWLER & McCANN, 1971).

A deterioração por clostrídeos resulta na produção de gases no aparecimento de odores indesejáveis na liqüefação do produto, e até mesmo na produção de toxinas (HAWLEY, 1957).

Processados com a nisina, em concentração de 250 a 500 UI/g, os queijos pasteurizados podem ser armazenados sem refrigeração e sem produção de efeitos indesejáveis, mesmo em produtos com Aa mais alta e concentração salina mais baixa, tais como os queijos pastosos (TANAKA *et alii*, 1986; SOMERS & TAYLOR, 1987). Entretanto com DELVES-BROUGHTON (1987), a concentração de nisina utilizada em queijos pasteurizados depende da biocarga de esporos presentes na matéria-prima. O autor recomenda a adição de 100, 150 e 250 UI/grama do produto para uma população de 10, 100 e 1000 esporos presentes em um grama da matéria-prima, respectivamente:

- b) Leite integral: a nisina pode ser empregada no leite integral pasteurizado, em países de clima tropical, com problemas no abastecimento, tais como longas distâncias combinadas com altas temperaturas no trajeto entre o produtor e o consumidor final (EAPEN *et alii*, 1983). Concentrações de 30-50 UI/ml duplicam a vida útil destes produtos (DELVES-BROUGHTON, 1987).
- c) Bebidas alcóolicas: a nisina é usada na indústria de bebidas alcóolicas, para o controle de microrganismos contaminantes, principalmente para prevenção da deterioração causada por *Lactobacillus* e *Pediococcus*. Esses microrganismos são sensíveis a 100 UI/ml de nisina. Por não ter ação sobre leveduras, permite que ela seja usada, substituindo a lavagem ácida, para a eliminação dos microrganismos indesejáveis, ou mesmo em substituição do dióxido de enxofre, durante a fermentação do vinho. Assim, sua utilização traz grande benefício para o processamento desses produtos (OGDEN & TUBB, 1985; OGDEN, 1986; OGDEN & WAITES, 1986; OGDEN *et alii*, 1988; RADLER, 1990a, b).
- d) Sobremesas lácteas: estes alimentos normalmente possuem cereais na sua formulação e, portanto, quando aquecidos gelatinizam-se e solidificam-se, tornando-se produtos altamente condutivos. Assim, um tempo de processamento térmico prolongado é necessário para a manutenção de suas qualidades microbiológicas, com perdas significativas nas qualidades nutricionais organolépticas (HEINEMANN *et alii*, 1965). Utilizando-se a nisina, em concentrações de 50-100 mg/K, há redução no processo térmico requerido para esterilização e, conseqüentemente, na gelatinização, com controle da deterioração (EAPEN *et alii*, 1983; PHILLIPS *et alii*, 1983).

3.8.3 - Alimentos esterilizados

a) Bebidas achocolatadas: SHERATA *et alii* (1976) apud HURST (1983) obtiveram resultados satisfatórios no processamento termoquímico de bebidas achocolatadas empregando a nisina. O processo térmico requerido para a conservação desses produtos foi reduzido em 80%, sem deterioração após incubação a 37°C, durante 21 dias. Resultados semelhantes já haviam sido obtidos por WAJID & KALRA (1976). A recomendação é de 30mg/l para um processamento a 121°C durante 12 minutos (FOWLER, 1979).

b) Produtos curados a base de carne: há vários estudos sobre a substituição parcial do nitrito, poderoso agente antibotulínico e de cura, pela nisina. SCOTT & TAYLOR (1981a, b); TAYLOR & SOMERS (1985); TAYLOR *et alii* (1990) demonstraram que a nisina retarda o crescimento de esporos germinados de *C. botulinum*. Entretanto, todos os resultados indicaram que concentrações elevadas (1000 a 30.000 UI/g) são necessárias para ocorrer a inibição deste microrganismo, sendo, portanto, um processo antieconômico. Além disso, recomendaram que estudos complementares deveriam ser realizados antes de se propor a parcial substituição do nitrito pela nisina, pois foi verificado que sua eficiência é reduzida quando é associada a partículas cárneas e, também, que é de difícil homogeneização nestes alimentos (TAYLOR & SOMERS, 1985).

CASERIO *et alii* (1979), apud HOLLEY (1981), demonstraram que concentrações de 75 mg/Kg de nitrito junto com 200 mg de nisina são suficientes para prevenir o desenvolvimento de células vegetativas de *C. perfringes*, inoculados em salsichas quando estocados a 38°C durante 20 dias.

c) Produtos à base de tomate: a nisina tem grande utilização em produtos à base de tomate. CAMPBELL Jr. *et alii* (1959) verificaram que o valor D_{121°C} para esporos de

B. stearothermophilus, inoculados em suco de tomate foi reduzido de 5,93 minutos para 0,51, quando se utilizou nisina, numa concentração de 14 ppm. Dessa maneira, o valor de esterilização requerido para controlar a deterioração desses alimentos é reduzido na sua presença.

- d) Sopas enlatadas: as qualidades organolépticas das sopas enlatadas podem ser conservadas com uma esterilização térmica mais branda, o que é viável empregando nisina, numa concentração de 100-200 mg/K (EAPEN *et alii*, 1983).
- e) Vegetais de baixa acidez em salmoura ou em molho: vários estudos foram realizados afim de determinar o efeito da nisina na resistência térmica dos esporos termorresistentes empregados nos vegetais de baixa acidez em salmoura ou molho, conforme apresentado na tabela 7, p.54. As concentrações recomendadas variaram de 100-200 UI/g (DELVES-BROUGHTON, 1990a).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - MATERIAL

4.1.1 - Cultura de teste

Como cultura de teste foram utilizados esporos de *Bacillus stearothermophilus* FS 1518 obtidos da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos - FEA - UNICAMP.

4.1.2 - Meios de cultura

As formulações dos meios de cultura empregados neste trabalho encontram-se no Apêndice.

4.1.2.1 - Meios para esporulação de *B. stearothermophilus* FS 1518

a) De acordo com PFLUG (1982):

- . Caldo nutriente pH 6,9 (CN)
- . Agar para esporulação

b) De acordo com KIM & NAYLOR (1966):

- . Caldo para pré-esporulação
- . Agar para esporulação

4.1.2.2 - Meio para quantificação dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 - Agar Dextrose Triptona (ADT)

4.1.2.3 - Meios de subcultura utilizados nos ensaios de otimização do binômio tempo/temperatura de ativação dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518

- . Agar Dextrose Triptona (ADT)
- . Agar Nutriente (AN)
- . Meio Mínimo para germinação e crescimento pós-germinativo de *B. stearothermophilus* FS 1518 (CAMPBELL Jr. *et alii* (1965), modificado pela adição de triptona (1%), ácido L-glutâmico (0,144 mg/ml) e L-lisina (0,162 mg/ml), pH 7,2 (MMGCp-M).

4.1.2.4 - Meios utilizados para o estudo dos fenômenos de germinação e crescimento pós-germinativos dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 por espectrofotometria

- . Caldo dextrose triptona diluído em água (1:15,5) pH 6,7 (CDT)
- . CDT modificado pela retirada do corante púrpura de bromocresol, pH 6,6 (CDT-M)
- . CDT diluído em água (1:15,5), pH 8,1, ajustado com NaOH 0,1 N
- . MMGCp-M
- . CN, pH 6,9

4.1.2.5 - Meio utilizado para determinação da Menor Concentração Inibitória (MCI) no crescimento vegetativo dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 - AN

4.1.2.6 - Meio de aquecimento e subcultura utilizados nos ensaios de resistência térmica

Como meio de aquecimento foi utilizado um meio proposto, formulado com cogumelos frescos (*Agaricus bisporus*), cultivados na cidade de Mogi Mirim (SP) principal centro nacional de produção de cogumelos comestíveis, adquiridos na feira local. Na preparação desse meio, os cogumelos foram previamente submetidos a limpeza externa com lavagem com água. A seguir, foram grosseiramente picados e adicionados de salmoura 1,5% (RODRIGO, 1981). A proporção sólido/salmoura (1,5%) foi 1,43, simulando um produto industrial. Finalmente, procedeu-se à homogeneização em liquidificador, durante 5 minutos, e esterilização a 121°C, durante 15 minutos. Esse meio foi denominado de "Homogeneizado de Cogumelos" (HC). Para a determinação da proporção sólido/líquido utilizaram-se três produtos industriais. As proporções encontradas foram 1,43, 1,38 e 1,45. A média destas proporções ($\bar{X}$: 1,43) foi empregada para a formulação deste meio.

O meio de subcultura utilizado foi o AN.

4.1.3 - Nisina

A nisina, sob a forma de pó e contendo 10^6 UI/g foi gentilmente cedida pela Aplin & Barret Ltda.

4.1.4 - Equipamentos

- . Autoclave horizontal, Modelo 104 (FABBE)
- . Banho de água Fanem, sem agitação e com controle de temperatura, Modelo 169 (FABBE)
- . Câmara asséptica com fluxo laminar vertical (VECO)
- . Contador de colônias (BIOMATIC)
- . Liquidificador com copo esterilizável (ARNO)
- . Estufa bacteriológica estabilizada a 55°C, modelo 002/3 (FANEM)
- . Microscópio binocular, modelo STANDART (ZEISS)
- . Balança eletrônica digital modelo BEC 1000 (ACATEC)
- . Potenciômetro digital (DIGIMED)
- . Refrigerador (CONSUL)
- . Centrífuga com refrigeração, modelo B-20A (INTERNATIONAL EQUIPMENT COMPANY)
- . Banho de óleo, modelo 66600 (PRECISIONS CIENTIFIC)
- . Espectrofotômetro visível, modelo SPECTRONIC 20 (BAUSH & LOMB)
- . Calibrador potenciométrico, modelo CL511 (OMEGA)
- . Termopar flexível TT-T36 (OMEGA)
- . Incubadora com agitação, modelo MARCONI (ROBERTSHAW)
- . Agitador de tubos, modelo 1005 (BIOMATIC)

4.2 - MÉTODOS

4.2.1 - Definição das condições experimentais

4.2.1.1 - Definição do meio de esporulação de células de *B. stearothermophilus* FS 1518

Dentre as várias metodologias propostas para produção de esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 foram escolhidas aquelas que utilizavam cátions inorgânicos na formulação, garantindo a máxima resistência dos esporos produzidos (GOULD, 1971).

Os métodos utilizados foram:

- a) Método de esporulação proposto por PFLUG (1982), com algumas modificações inerentes às condições do experimento:

Os esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 foram ativados para a germinação em banho de água, a temperatura de ebulição durante 15 minutos e, imediatamente, esfriados em banho de gelo por 2 minutos. Posteriormente foram inoculados em CN (1:9) e incubados durante 24/48 horas a 55°C, em aerobiose. Após o crescimento das células vegetativas, verificado pela turbidez do meio, os microrganismos foram inoculados no meio específico formulado com AN adicionado de 5 ppm de sulfato de manganês. Este meio foi colocado em superfície inclinada, utilizando garrafas de Roux de 900 ml. Um volume de 2 ml de inóculo foi adicionado em cada garrafa contendo 200 ml de meio de cultura solidificado e espalhado com um bastão de vidro estéril. Após a secagem do inóculo na

superfície do agar, as garrafas foram incubadas durante 6 dias a 55°C, ou até obter uma alta densidade de esporos ($\pm 80\%$), observados em um campo óptico, confirmada pela coloração de esporos com verde de malaquita, segundo o método de FIELDS (1970).

b) Método de esporulação proposto por KIM & NAYLOR (1966)

Esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 ativados em banho de água a temperatura de ebulição, durante 15 minutos, e resfriados imediatamente em banho de gelo por 2 minutos (PFLUG, 1982) foram inoculados no Caldo para pré-esporulação, na proporção 1:9 de inóculo e meio de cultura. Em seguida, procedeu-se à incubação durante 12 horas a 55°C, em incubadora com agitação de 120 rpm/minuto. Da suspensão obtida, 2 ml foram semeados logo após na superfície do agar para esporulação solidificado em placas de Petri de 150 mm de diâmetro, contendo 100 ml de meio. Após a secagem das placas, essas foram invertidas e procedeu-se à incubação durante 50 horas a 55°C, em aerobiose.

4.2.1.1.1 - Coleta, limpeza e estocagem dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 produzidos

A coleta dos esporos produzidos pelos métodos descritos em 4.2.1.1 a e b foi efetuada recolhendo-se o crescimento superficial com água destilada e bagueta estéreis, de acordo com PFLUG (1982).

A limpeza, objetivando a eliminação de resíduos de meio de cultura e de células vegetativas, foi realizada centrifugando-se a suspensão obtida a 1500 G durante 15 minutos, utilizando-se uma centrífuga refrigerada estabilizada a 4°C. A operação de limpeza foi repetida três vezes, ressuspensando-se o

precipitado em água destilada estéril, após a eliminação do sobrenadante de cada etapa.

O precipitado final foi ressuspenso em 30 ml de água estéril e estocado em garrafas contendo pérolas de vidro também estéreis, a 4°C. A utilização de pérolas de vidro evita a formação de grumos na suspensão.

4.2.1.1.2 - Quantificação dos esporos de *B. stearothermophilus*

A quantificação dos esporos produzidos de acordo com os itens 4.2.1.1 a e b foi realizada pelo método de plaqueamento (PFLUG, 1982). Para tanto, a alíquota de 1 ml de cada uma das suspensões de esporos foi diluída em 9ml de água destilada estéril. Estas diluições foram submetidas ao choque térmico de 15 minutos à temperatura de ebulição e resfriamento imediato por 2 minutos, em banho de gelo. Posteriormente, foram feitas as diluições decimais, até 10^{-8} . Alíquotas de 1ml de cada diluição foram transferidas, em duplicata, para placas de Petri, seguida da adição de ADT e homogeneização. Após solidificação do meio, procedeu-se à incubação a 55°C, durante 48/72h. Posteriormente efetuou-se a contagem das colônias típicas, expressando-se os resultados em Unidades Formadoras de Colônias - UFC/ml (ICMSF, 1978).

4.2.1.1.3 - Comparação das metodologias utilizadas na produção dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518

Os seguintes parâmetros foram utilizados na avaliação das metodologias de PFLUG (1982) e KIM & NAYLOR (1965):

- a) contagem da população bacteriana produzida (UFC/ml) em ADT, após 15 minutos de ativação à temperatura de ebulição e resfriamento imediato em banho de gelo por 2 minutos (PFLUG, 1982);
- b) presença, em um campo óptico, de esporos em cerca de 80%, após coloração específica (FIELDS, 1970);
- c) custo e tempo despendido em cada método.

4.2.1.2 - Otimização do binômio tempo/temperatura de ativação (choque térmico) em diferentes meios de subcultura, para os esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518

O binômio tempo/temperatura de ativação ótimo dos esporos produzidos de *B. stearothermophilus* FS 1518 foi estabelecido pela contagem da população microbiana em diferentes meios de subcultura (KEYNAM *et alii*, 1965).

Para a otimização deste binômio nos meios sólidos AN e ADT, uma alíquota de 1ml da suspensão foi transferida, assepticamente, para 9ml de água destilada estéril. A seguir, esta diluição foi submetida ao choque térmico, com resfriamento imediato em banho de gelo por 2 minutos. Após, procedeu-se às diluições decimais até 10^{-8} . Alíquotas de 1ml das 4 últimas diluições foram transferidas, em duplicata, para placas de Petri, seguido da adição do meio, com posterior

homogeneização do inóculo e incubação, após a solidificação, a 55°C durante 48/72h. Os tempos e temperaturas empregados para a ativação nos meios sólidos AN e ADT são indicados na tabela 8. Estes meios foram escolhidos por serem os rotineiramente utilizados para contagem deste microrganismo (FIELDS, 1973; PFLUG, 1982).

TABELA 8 - TEMPOS E TEMPERATURAS UTILIZADOS NA OTIMIZAÇÃO DA ATIVAÇÃO TÉRMICA DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 INOCULADOS NO MEIO AN E ADT

MEIOS DE CULTURA	TEMPO E TEMPERATURA DE ATIVAÇÃO
ADT ¹	1,3,5,10,15,20,25 minutos a temperatura de ebulição 2 minutos a 110 °C
AN ²	1,3,5,10,15,20,25 minutos a temperatura de ebulição

1 ADT = Agar dextrose triptona

2 AN = Agar nutriente

Já para a otimização da ativação empregando-se o meio de subcultura MMGCp-M, modificado para permitir o crescimento vegetativo tanto de linhagens lisas quanto de rugosas desse microrganismo (CAMPELL Jr. *et alii*, 1965), foi utilizado a metodologia do Número Maio Provável (NMP). Para a contagem da população de esporos, tomaram-se alíquotas de 1 ml da suspensão, que foram transferidas para 9 ml de água destilada estéril. Essas diluições foram submetidas aos choques térmicos de 1, 3, 5, 8 e 10 minutos à temperatura de ebulição e 1, 2 e 5 minutos, a 110°C, com resfriamento imediato em banho de gelo, por 2 minutos. Após, procedeu-se às diluições decimais

até 10^{-7} e inoculou-se 1 ml de cada diluição em 3 séries de 5 tubos, contendo 9ml do meio MMGCp-M. Em continuação, procedeu-se à incubação dos tubos a 55°C , por um período de tempo suficiente para não haver mais mudanças na leitura. Considerou-se presuntivamente como positivos aqueles tubos que evidenciassem turbidez. A partir destas calculou-se o NMP (SPECK, 1976).

Paralelamente, foi avaliado o efeito do amido na contagem de esporos sobreviventes de *B. stearothermophilus* FS 1518 submetidos à ativação térmica (MALLIDIS & SCHOLEFIELD, 1986). Nesta avaliação foi eleito como meio para teste o MMGCp-M adicionado de 1% de amido. Este foi escolhido por ser o mais específico para estes esporos. Para tal finalidade, procedeu-se como descrito para a metodologia do NMP, utilizando-se, apenas a ativação térmica de 5 minutos à temperatura de ebulição, que mostrou ser eficiente nos outros meios.

Foi comparada também a contagem dos esporos inoculados em meios AN e em CN, após 5 minutos de ativação a 100°C . Para a contagem do crescimento em CN utilizou-se o método NMP, inoculando 3 séries de 5 tubos, contendo em cada 9 ml do meio CN, com 1ml das diluições decimais. Em seguida, procedeu-se à incubação dos tubos a 55°C , por um período de tempo suficiente para não haver mais mudanças na leitura. Considerou-se presuntivamente como positivos aqueles tubos que apresentassem turbidez. A partir dos tubos positivos calculou-se o NMP (SPECK, 1976). Para a contagem no meio AN utilizou-se o método clássico de contagem em placas, procedendo-se a incubação a 55°C durante 48h. Esta comparação foi realizada para avaliar se havia diferença no crescimento destas células quando inoculadas em meios líquidos ou sólidos, visto que o item 4.2.1.3 requer a utilização de meios líquidos.

4.2.1.3 - Seleção do meio de subcultura mais eficaz para se observar a germinação e o crescimento pós-germinativo de *B. stearothermophilus* FS 1518 e sua adaptabilidade ao método espectrofotométrico de redução da absorbância

Entre os vários métodos disponíveis para se observar as etapas de germinação e de crescimento pós-germinativo de esporos selecionou-se o método espectrofotométrico de redução da absorbância, preconizado por FIELDS (1975). Para tal, uma população de esporos foi inoculada em um tubo de vidro, em forma de L, adaptado como cubeta espectrofotométrica, contendo um dos meios de cultura eleito para esta finalidade (CDT, CDT-M, CDT.pH 8,1, MMGCp-M e CN) e incubado em banho de água estabilizado a 55°C. Um outro tubo, com as mesmas dimensões e formato, foi selecionado como tubo "branco" e neste último só foi adicionado meio de cultura estéril. O tubo "branco" foi utilizado para zerar o aparelho, antes de se efetuar a leitura. Os pares de tubos "teste" e "branco" foram mantidos durante todo o experimento. Essa última foi conduzido em duplicata, com leituras espectrofotométricas, em comprimento de onda de 590 nm, intervalos de 15 minutos, durante 8 horas. Após, o intervalo entre as leituras foi de 2 horas, ou até que as células microbianas atingissem a fase exponencial de crescimento vegetativo. As etapas de germinação e de crescimento pós-germinativo foram também confirmadas em microscópio, mediante a coloração de esporos pelo método de FIELDS (1970) e pelo método de GRAM.

A seleção dos meios para verificar as etapas de germinação e crescimento pós-germinativo desses esporos (ver item 4.1.2.4) foi baseada nos seguintes parâmetros:

- a) adaptabilidade do meio de subcultura ao método espectrofotométrico de leitura de absorbância. Para essa adaptação, tentou-se o meio CDT diluído (1:15,5), modificação deste com a retirada do corante púrpura de

bromocresol e elevação do pH para 8,1. O corante púrpura de bromocresol e a queda rápida do pH do meio foram parâmetros que preliminarmente julgamos afetar o crescimento pós-germinativo deste microrganismo.

- b) eficiência dos meios eleitos para verificar os fenômenos de germinação e de crescimento pós-germinativo, visto que nem todos permitiram o crescimento pós-germinativo.

A população bacteriana adicionada em cada tubo "teste", após ativação térmica ótima (utilizando-se o binômio tempo/temperatura estabelecido em 4.2.1.2 e resfriamento imediato em banho de gelo durante 2 minutos) foi ajustada para corresponder a uma absorbância inicial de 0,5 a 590 nm, (FIELDS, 1970), exceto quando foi utilizado o MMGCp-M. Neste último, a população bacteriana adicionada correspondeu a uma absorbância de 0,7, no comprimento de onda de 630 nm, conforme a indicação dos autores. Os resultados foram expressos em porcentagem de decréscimo da absorbância, em relação à absorbância inicial (eixo das coordenadas) pelo tempo (eixo das abcissas).

4.2.1.4 - Definição do efeito inibitório da nisina sobre as etapas germinativa e de crescimento pós-germinativo de esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518

Concentrações de nisina de 1000 - 500 - 250 - 50 - 40 - 30 - 20 - 10 UI/ml foram empregadas para avaliar o seu efeito inibitório na germinação e no crescimento pós-germinativo de esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518. A concentração de 1000 UI/ml foi escolhida como máxima por corresponder a 5-10 vezes à concentração recomendada para uso em alimentos de baixa acidez (DELVES - BROUGHTON, 1990a). Neste experimento utilizaram-se várias concentrações de nisina pois, paralelamente, tentou-se estabelecer a MCI (Menor Concentração

Inibitória). Para isto montou-se um experimento piloto onde os resultados obtidos foram tabulados com base na leitura espectrofotométrica da redução da absorbância de esporos, após o choque térmico ótimo (estabelecido no item 4.2.1.2), inoculados no meio de subcultura (adicionado das concentrações de nisina acima mencionadas) e condições físicas preconizadas no item 4.1.2.3. A adição de nisina ao meio procedeu-se após o preparo de uma solução estoque de nisina, contendo 10^4 UI/ml em HCl 0,02 N e esterilizada a 121°C durante 15 minutos (SCOTT & TAYLOR, 1981a,b). Aliquotas dessa solução foram transferidas para a "cubeta" espectrofotométrica contendo o meio de cultura. A população bacteriana adicionada em cada tubo "teste", após a ativação térmica e resfriamento imediato, foi ajustada para corresponder a uma absorbância inicial desejada. Concomitantemente, a presença de células vegetativas e esporos foram confirmadas em microscópio, através de lâminas, pelo método de GRAM e de coloração de esporos (FIELDS, 1970), respectivamente. Paralelamente, foi realizado também um teste "branco" do experimento, ou seja, a germinação e o crescimento pbs-germinativo do *B. stearothermophilus* FS 1518 foram acompanhados nas mesmas condições, apenas sem adição de nisina.

Deve ser salientado que o método aqui proposto não se mostrou eficaz para a determinação da MCI, necessitando estabelecê-la de acordo com a metodologia a seguir.

4.2.1.5 - Determinação da MCI da nisina para *B. stearothermophilus* FS 1518 no crescimento vegetativo

A MCI no crescimento vegetativo de *B. stearothermophilus* FS 1518 foi avaliada pelo método de plaqueamento em superfície, como indicado por SCOTT & TAYLOR (1981a):

A solução estoque de nisina, contendo 10^4 UI/ml em HCl

0,02 N autoclavada a 121°C durante 15 minutos, foi preparada semanalmente. As concentrações de nisina avaliadas foram 250 a 10 UI/ml. As concentrações escolhidas foram em função de dados experimentais. As alíquotas da solução estoque determinadas para obter as concentrações desejadas foram transferidas, assepticamente, para o meio estabelecido no item 4.2.1.3 esterilizado e ainda quente. A homogeneização da nisina no meio foi padronizada em 2 minutos. Em seguida, alíquotas de 40ml do meio de cultura adicionado de nisina foram vertidos em placas de Petri previamente esterilizadas. Após a solidificação do agar, procedeu-se à inoculação das placas. Para essa finalidade, uma alíquota de 1ml da suspensão de *B. stearothermophilus* FS 1518 foi diluída em 9ml de água destilada estéril. Essa diluição foi submetida ao choque térmico estabelecido em 4.2.1.2 e resfriamento imediato por 2 minutos em banho de gelo. Posteriormente, fizeram-se as diluições decimais até 10^{-2} . Alíquotas de 1ml de cada diluição foram transferidas, em duplicata, para placas de Petri com agar solidificado. Com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril fez-se o espalhamento do inóculo sobre a superfície do agar e incubou-se a 55°C, durante 48h/72h.

Foi considerado como a MCI, a menor concentração de nisina que foi capaz de inibir uma população de 10^6 de *B. stearothermophilus* FS 1518, quando comparado com o crescimento da mesma população em condições idênticas, mas sem adição de nisina (MORRIS & RIBBONS, 1973).

4.2.2 - DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DE ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO HOMOGENEIZADO DE COGUMELOS (HC) COM E SEM A ADIÇÃO DE NISINA

4.2.2.1 - Seleção do meio de aquecimento

Confirmou-se, primeiramente, a presença do microrganismo alvo da esterilização no cogumelo "in natura" triturado e não triturado, este último utilizado como meio de aquecimento. A contagem de microrganismos termofílicos causadores de acidez plana ("flat-sour") foi efetuada segundo a metodologia preconizada por SPECK (1976). Nesse procedimento, todos os instrumentos utilizados, como espátulas, facas, pinças, etc, foram desinfetados com álcool e flambados antes do uso. Uma amostra de 500 g de cogumelos "in natura" foi recebida em frascos estéreis.

Para a contagem da biocarga de "flat sour" na amostra não triturada transferiu-se 100g do produto para outro frasco estéril, onde foram adicionados 100 ml de solução salina peptonada estéril, acrescida de TWEEN 80 a 0,1%. O frasco foi fechado e agitado intensamente durante 2 minutos. Em continuação, 3 alíquotas de 20ml do sobrenadante foram transferidas, respectivamente, para tubos de rosca estéreis, de 20 x 250 mm. Essas últimas foram submetidas ao choque térmico de 30 minutos, à temperatura de ebulição e resfriamento imediato em banho de gelo por 2 minutos. De cada tubo, retiraram-se, assepticamente, 5 alíquotas de 2ml que foram distribuídas em 5 placas de Petri, seguida da adição do meio ADT com homogeneização do inóculo, e, incubação, após a solidificação, a 55°C, durante 48/72h.

Para a contagem da biocarga no cogumelo triturado, uma amostra de 25g de cogumelos foi transferida para um copo de liquidificador estéril, onde foram adicionados 225 ml de solução peptonada estéril. Procedeu-se à homogeneização durante 5 minutos. Em continuação, 3 alíquotas de 20 ml do

homogeneizado foram transferidas, respectivamente, para tubos de rosca estéreis de 20 x 250mm. Procedeu-se, então, como para a amostra não triturada, descrita acima.

4.2.2.2 - Confirmação do crescimento de *B. stearothermophilus* FS 1518 no meio

Uma alíquota de 9 ml do meio HC (ver item 4.1.2.6) estéril foi transferida, assepticamente, para um tubo também estéril de 20 x 250 mm, onde foi inoculado 1ml da suspensão de *B. stearothermophilus* FS 1518 ativada a 121°C durante 15 minutos (PFLUG, 1982). Após a homogeneização em agitador de tubos, procedeu-se à incubação a 55°C durante 48/72h. O crescimento foi confirmado pela redução do pH do meio verificado por potenciometria, e através de lâminas microscópicas, após coloração pelo método de Gram.

4.2.2.3 - Determinação da resistência térmica dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 no meio HC, com e sem nisina

Para a determinação da resistência térmica foi utilizado o método do tubo TDT selado, descrito por BIGELOW & ESTY (1920), modificado posteriormente por Esty & Williams (STUMBO, 1973), acrescidas de algumas particularidades inerentes às condições do experimento:

- 1 - todo o material utilizado foi esterilizado previamente em autoclave a 121°C por 15 minutos, inclusive o HC (ver item 4.1.2.6) e a solução de nisina preparada como indicada no item 4.2.1.4;
- 2 - posteriormente, efetuou-se a distribuição de 1,8 ml do meio de aquecimento, com e sem a adição prévia da solução

de nisina, em tubos TDT. A adição de nisina ao meio HC foi calculada de forma a se obter uma concentração final (meio + inóculo) de 25 UI/ml. Esta concentração foi empregada, em função dos dados obtidos experimentalmente de MCI e levando-se em consideração o efeito sinergista da nisina com o calor. As ampolas utilizadas possuíam as seguintes especificações: 1,5mm de parede, 7mm de diâmetro interno e 8 cm de comprimento. Nessa etapa, em função da viscosidade do HC, não se pode usar pipetas normais para colocação do meio de aquecimento. Para a distribuição empregaram-se pipetas com diâmetro interno grande-pipetas de 10 ml, com divisão 1/10 com as pontas cortadas, facilitando, desta maneira, o escoamento do meio na ampola;

- 3 - inoculação de 0,2 ml da suspensão de esporos nos tubos TDT. Após a inoculação, procedeu-se à homogeneização exaustiva do inóculo no meio, utilizando-se alças de platina previamente flambadas;
- 4 - selagem dos tubos TDT com maçarico;
- 5 - colocação dos tubos TDT no banho termostatizado, com precisão de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. As combinações de tempo/temperatura utilizadas estão especificadas na tabela 9.

TABELA 9 - COMBINAÇÕES DE TEMPO/TEMPERATURA UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO HC COM E SEM NISINA

TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	TEMPOS DE AQUACIMENTO ¹	
	SEM NISINA	COM 25 UI/ML DE NISINA
125	0, 6, 10, 12, 14, 16	0, 10, 12, 14, 16
121	0, 10, 20, 25, 30, 40	0, 5, 10, 20, 25, 27, 30, 40
118	0, 20, 35, 50, 65	0, 5, 10, 20, 35

¹ - Os tempos foram selecionados experimentalmente, de maneira a obter contagem significativa de sobreviventes
 HC = Homogeneizado de cogumelos em salmoura 1,5% (p/v) pH 6,2

Os "atrasos" térmicos de aquecimento para cada temperatura foram determinados cronometrando-se o tempo para que as amostras atingissem a temperatura do banho termostático. Para esta finalidade utilizou-se um tubo TDT contendo o meio HC, idêntico aos empregados nos testes de resistência (itens 4.2.2.3 - 1 a 4), dotados de um termopar flexível na região central do tubo, acoplados a um registrador de temperatura. Para cada temperatura foram realizados três experimentos. O tempo médio obtido para cada temperatura foi subtraído de cada tempo de aquecimento. A temperatura inicial das ampolas foi fixada em 25°C;

- 6 - após o tratamento térmico, os tubos foram imediatamente resfriados em gelo fundente;
- 7 - em continuação, os tubos TDT foram abertos assepticamente com uma vîdea. O conteúdo foi misturado exaustivamente com uma alça de platina flambada e, a seguir, uma alíquota de 1ml foi transferida para 9 ml de água destilada estéril. Para este procedimento, utilizou-se uma pipeta de 2 ml com a ponta cortada. Posteriormente, procedeu-se às diluições decimais, seguida de plaqueamento das 3 últimas diluições, usando-se como meio de subcultura o estabelecido em 4.2.1.3. As placas, após homogeneização e solidificação do ágar, foram incubadas a 55°C durante 5 dias;
- 8 - os microrganismos sobreviventes foram contados e os dados obtidos foram regressionados. Traçou-se a "Curva de Sobreviventes" e a "Curva Fantasma" de morte térmica para o estabelecimento dos valores D, Z e Fo microbiológico requerido, com e sem adição de 25 UI/ml de nisina. O valor Fp microbiológico requerido, com e sem nisina, foi estabelecido para o produto em questão pelo método de PFLUG (1990), levando-se em consideração a probabilidade de sobrevivência deste microrganismo em alimentos de baixa acidez, mantidos a temperatura elevadas, o que é comum em países com climas tropicais. Para tanto, o número de reduções decimais (γ) proposto pelo autor, para este microrganismo alvo, é 5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518

Os resultados para as metodologias para produção de esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 são apresentados na tabela 10.

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DAS METODOLOGIAS USADAS PARA A PRODUÇÃO DE ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518

MÉTODO	PFLUG (1982)	KIM & NAYLOR (1966)
Meios de cultura	1 - CN 2 - Agar para esporulação	1 - Caldo para pre-esporulação 2 - Agar para esporulação
Tempo e temperatura de incubação	1 - 48h/55°C 2 - 6 dias/55°C	1 - 12h/55°C, com aeração 2 - 50h/55°C
esporos/ml ¹	2,7 x 10 ⁸	2,4 x 10 ⁷

1 - Em UFC/ml. Os resultados correspondem à média das duplicatas.

As duas metodologias usadas puderam ser comparadas, pois a cultura de partida, o binômio tempo/temperatura de ativação e as condições de subcultura foram as mesmas.

O método proposto por KIM & NAYLOR (1966) mostrou-se eficiente e rápido, visto que a maioria das metodologias requerem de 4 a 14 dias de incubação (FINLEY & FIELDS, 1960); CAMPBELL Jr. *et alii*, 1965). Os autores propuseram 26 horas de incubação no

agar para esporulação, para a obtenção de uma concentração de esporos em 80-90%, confirmados por observação em microscopia. Entretanto, para atingir esta concentração o tempo de incubação necessitou ser prolongado até 50 horas. De acordo com os autores, a adição de extrato de levedura nos meios de pré-esporulação e esporulação e a aeração do meio de pré-esporulação são fundamentais para aumentar o número de esporos de *B. stearothermophilus* produzidos. Estes parâmetros foram também empregados por ROTMAN (1967) apud FIELDS (1970) e THOMPSON & THAMES (1967) com o mesmo objetivo.

O método preconizado por PFLUG (1982) também não produziu a concentração desejada de esporos ($\pm$ 80% em um campo óptico) no tempo indicado de 48 horas. Este meio é semelhante ao indicado por TITUS (1957) apud FIELDS (1970). Eles não possuem nutrientes específicos como o extrato de levedura e não sofrem aeração, entretanto mostrou-se mais eficaz que o indicado por KIM & NAYLOR (1966). POWELL & HUNTER (1953) obtiveram 80-90% de esporulação de várias células vegetativas de *Bacillus* sp., apenas inoculando-os em H₂O destilada. Estes resultados são condizentes com o pressuposto que a esporulação ocorre quando o crescimento vegetativo é interrompido por depleção de nutrientes (KANCKO, 1975).

O método proposto por PFLUG (1982), apesar de mais demorado que o original de KIM & NAYLOR (1966), foi avaliado como mais eficiente por produzir uma maior população de esporos, utilizar meios menos onerosos e por requerer metodologias mais simplificadas. Os esporos produzidos por esta metodologia foram os utilizados durante toda esta pesquisa.

5.2 - OTIMIZAÇÃO DO BINOMIO TEMPO/TEMPERATURA, EM DIFERENTES MEIOS DE SUBCULTURA, PARA ATIVAR OS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518

Objetivando-se otimizar as condições experimentais

necessitou-se estabelecer o melhor choque térmico para a ativação dos esporos produzidos, em meios de subcultura que proporcionassem melhor crescimento vegetativo, visto que estes parâmetros influenciariam no crescimento vegetativo (MORRAN *et alii*, 1990).

Os resultados obtidos para esta avaliação são apresentados nas tabelas 11 (para o meio ADT), 12 (para o meio AN) e 13 (para o MMGCp-M).

TABELA 11 - DETERMINAÇÃO DO CHOQUE TÉRMICO ÓTIMO PARA OS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO ADT

TEMPO DE AQUECIMENTO (minutos)	TEMPERATURA (°C)	CONTAGEM (UFC/ml) ¹
1	ebulição	4,3 x 10 ⁸
3	ebulição	7,2 x 10 ⁸
5	ebulição	2,8 x 10 ⁸
10	ebulição	1,1 x 10 ⁸
15	ebulição	3,0 x 10 ⁷
20	ebulição	4,3 x 10 ⁶
25	ebulição	3,7 x 10 ⁶
2	110°C	1,2 x 10 ⁸

¹ UFC/ml = Unidades formadoras de colônias/ml. Os resultados correspondem à média das duplicatas.

De acordo com os resultados obtidos para o meio ADT verificou-se que a contagem de células após 10, 15, 20, 25 minutos de aquecimento à temperatura de ebulição foi decrescente, evidenciando morte térmica. O tempo de 3 minutos à temperatura de ebulição foi considerado como ótimo de ativação neste meio, pois consegue-se recuperar maior número de células vegetativas. A ativação durante 2 minutos a 110 °C mostrou-se semelhante à de 10 minutos à temperatura de ebulição. Este resultado contradiz os obtidos por FINLEY & FIELDS (1962), KEYNAN *et alii* (1965) e FIELDS (1970), que observaram a ocorrência de dormência em temperaturas de ebulição inferiores a 100 °C. Cabe indicar que o

tempo ótimo de ativação depende também das características próprias da suspensão de esporos (MORRAN *et alii*, 1990).

TABELA 12 - DETERMINAÇÃO DO CHOQUE TÉRMICO ÓTIMO PARA OS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO AN

TEMPO DE AQUECIMENTO (minutos)	TEMPERATURA (°C)	CONTAGEM (UFC/ml) ¹
1	ebulição	4,8 x 10 ⁸
3	ebulição	2,4 x 10 ⁸
5	ebulição	3,3 x 10 ⁸
10	ebulição	1,1 x 10 ⁸
15	ebulição	8,5 x 10 ⁶
20	ebulição	1,3 x 10 ⁶
25	ebulição	7,5 x 10 ⁵

1.- UFC/ml = Unidades formadoras de colônia/ml. Os resultados correspondem à média das duplicatas.

No meio AN o tempo ótimo de ativação foi 1 minuto à temperatura de ebulição. Após este tempo de aquecimento houve declínio na contagem de células. Este declínio foi maior que o observado no meio ADT. Este fato observado parece contraditório, pois o meio ADT contém, em sua formulação o corante púrpura de bromocresol, que comprovadamente inibe o crescimento vegetativo destes esporos (COOK & GILBERT, 1968; EIROA *et alii*, 1985).

A contagem da população bacteriana em CN foi a mesma obtida em AN: 3,3 x 10⁸ UFC/ml, após 5 minutos de ativação a 100°C. Isto leva à dedução que a adição e retirada do ágar não influencia na produção de células. Em vários trabalhos consultados sobre a recuperação de esporos, não há referências sobre este assunto.

TABELA 13 - DETERMINAÇÃO DO CHOQUE ÓTIMO PARA OS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MMGCp-M E MO MMGCp-M + 0,1% DE AMIDO

MEIOS	TEMPO DE AQUECIMENTO (minutos)	TEMPERATURA (°C)	CONTAGEM (UFC/ml) ¹
MMGCp-M	1	ebulição	$2,0 \times 10^2$
	3	ebulição	$2,0 \times 10^4$
	5	ebulição	$5,0 \times 10^4$
	8	ebulição	$7,9 \times 10^2$
	10	ebulição	$7,9 \times 10^2$
	1	110°C	$2,0 \times 10^2$
	2	110°C	$5,0 \times 10^3$
	5	110°C	-
MMGCp-M 0,1% de amido	5	ebulição	2×10^3

1 - UFC/ml = Unidades formadoras de colônias/ml. Os resultados correspondem à média das duplicatas.

As mesmas observações apresentadas para os resultados obtidos com os meios ADT e AN (tabelas 11 e 12) podem ser feitas para o MMGCp-M, com algumas peculiaridades: dentro todos os meios, este foi o menos eficaz, confirmado pela reduzida população microbiana recuperada. Observou-se, também, que a adição de amido na concentração de 0,1% não foi eficiente para a recuperação de esporos, visto que a população produzida foi de 2×10^3 UFC/ml nestas condições. Este resultado não condiz com os obtidos por COOK & GILBERT (1968) que verificaram o efeito positivo do amido (0,1%) na recuperação de esporos sobreviventes ao choque térmico.

A ativação dos esporos produzidos durante 5 minutos à temperatura de ebulição mostrou-se adequada nos três meios estudados. Este binômio para ativação térmica ficou, então, padronizado, e passou a ser utilizado durante toda a pesquisa.

5.3 - GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO DE ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NOS MEIOS DE SUBCULTURA SELECIONADOS PARA TAIS FINALIDADES

A figura 4 representa os resultados para a germinação e crescimento pós-germinativo de esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 no meio CDT diluído em água (1:15,5) pH 6,7. Os esporos foram ativados em água à temperatura de ebulição durante 5 minutos.

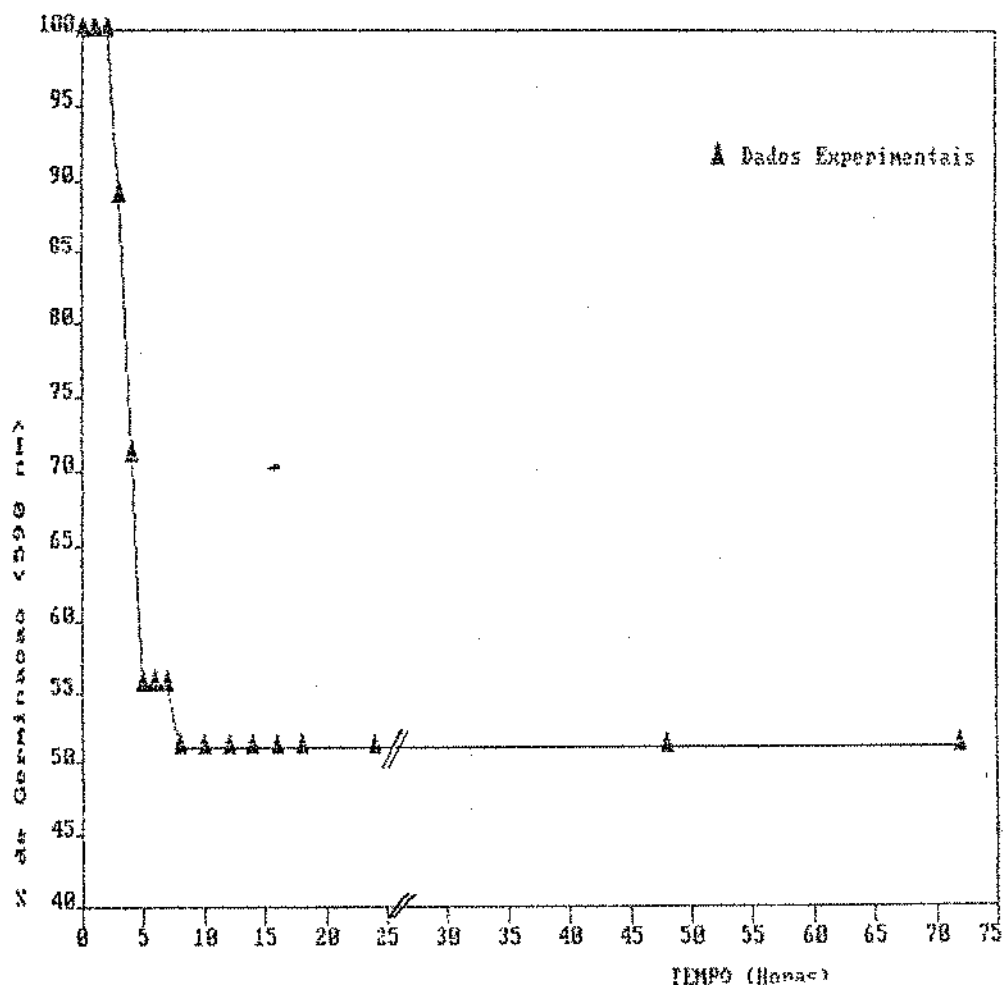


FIGURA 4 - GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518, NO MEIO CDT DILUÍDO EM ÁGUA (1:15,5) pH 6,7

Este meio permitiu um decréscimo de 55% na absorbância em 5 horas de incubação, mas não foi verificado o crescimento pós-germinativo após 72 horas de incubação.

Suspeitando-se de que o crescimento pós-germinativo não ocorreu pela privação de nutrientes do meio, ocorrida pela diluição do mesmo, o corante púrpura de bromocresol foi retirado da formulação do CDT, de maneira que se pudesse fazer a leitura espectrofotométrica, sem necessitar diluí-lo. Este meio passou a ser denominado CDT-M. O resultado é apresentado na figura 5. O binômio tempo/temperatura para ativação também foi de 5 minutos, à temperatura de ebulição.

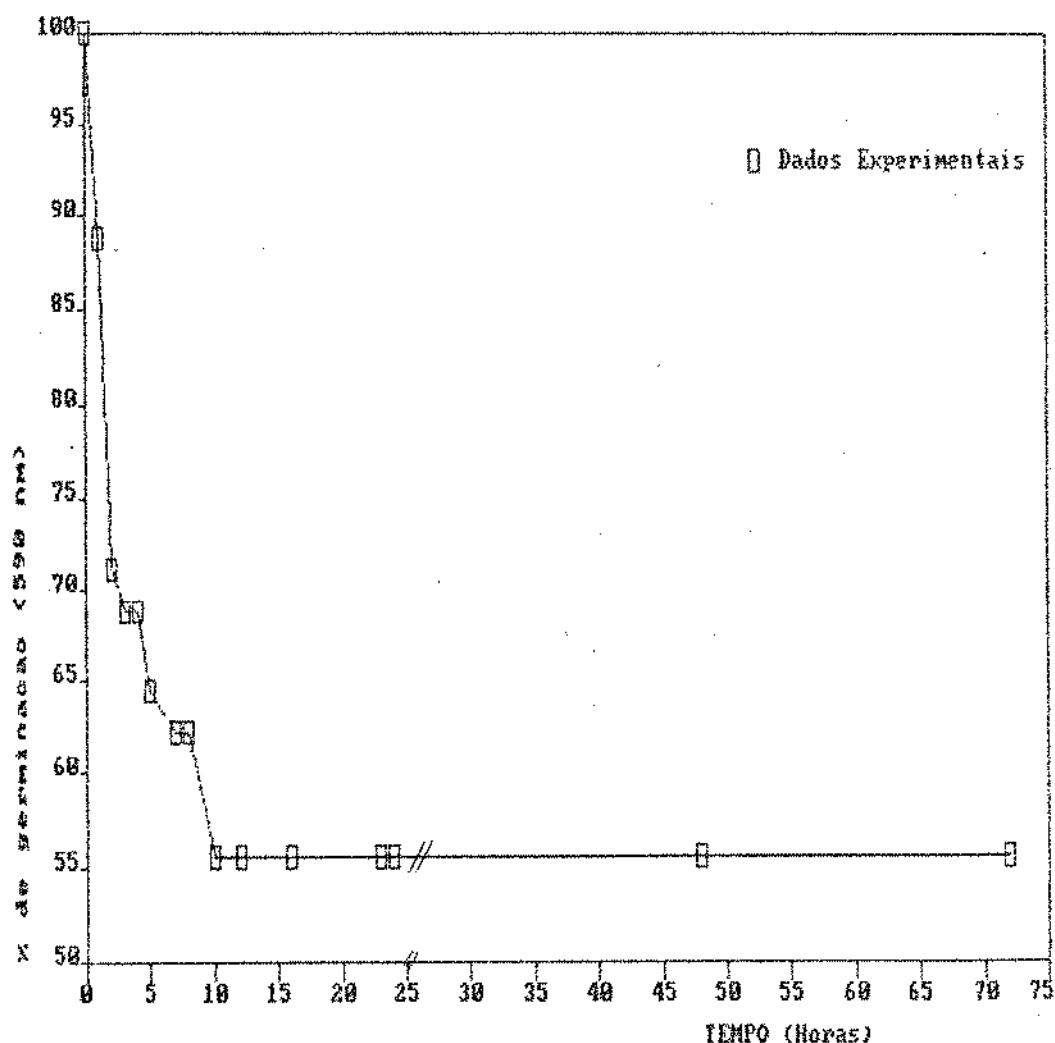


FIGURA 5 - GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO POS-GERMINATIVO DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO CDT-M pH 6,6

Neste meio o fenômeno da germinação de esporos foi nítido, com decréscimo da absorbância em 57%, após 10 horas de incubação. Entretanto, este meio também não permitiu o crescimento pós-germinativo dos esporos.

Buscando-se uma causa que pudesse explicar a não ocorrência do crescimento pós-germinativo, o experimento representado na figura 4 foi repetido com determinações do valor de pH em diferentes tempos de incubação. Para tanto, aliquotas de outra cubeta espectrofotométrica, inoculada em condições idênticas, foram retiradas e o pH foi determinado por potenciometria. O valor de pH do meio antes da incubação foi 6,7 e decresceu para 4,9 e 4,2, após 6 e 10 horas de incubação, respectivamente, confirmado pela cor amarela do meio. O corante púrpura de bromocresol tem ponto de viragem em pH 5,2 (ASSUMPÇÃO & MORITA, 1968). Os resultados quanto à germinação e crescimento pós-germinativo foram idênticos ao apresentado na figura 4.

Suspeitando-se que uma rápida produção de ácido pelo microrganismo causando uma brusca redução do pH e impedindo o crescimento pós-germinativo, e com base no fato que o pH mínimo para crescimento vegetativo de *B. stearothermophilus* FS 1518 varia de 4,0 a 5,0 (HILL & FIELDS, 1967b; BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 1975; LEITAO *et alii*, 1983;), este meio foi ajustado para pH 8,1 com NaOH 0,1N. Os resultados da germinação e do crescimento pós-germinativo após ativação durante 5 minutos à temperatura de ebulição, e os valores de pH em diferentes tempos de aquecimento são apresentados na figura 6.

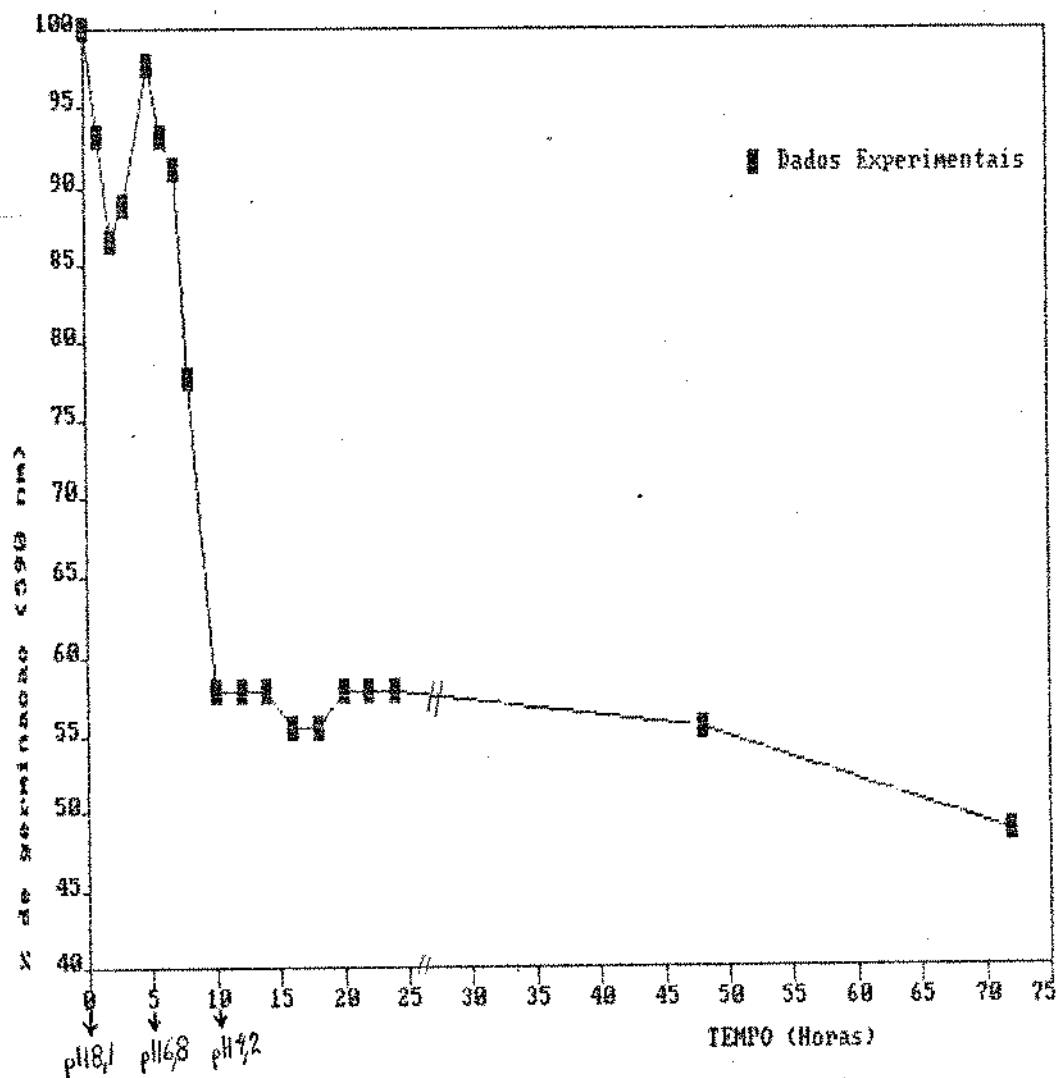


FIGURA 6 - GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO DE ESPOROS DOS *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO CDT DILUÍDO EM ÁGUA (1:15,5) pH 8,1

Através da figura 6 pode ser observado que houve germinação e um ligeiro acréscimo no valor da absorvância, após 5 horas de incubação, sugerindo um crescimento pós-germinativo. Este crescimento foi confirmado pela presença de células vegetativas em um campo óptico, após coloração de GRAM. Observou-se, também, que a redução do valor de pH do meio foi menos abrupta que nos experimentos anteriores. No entanto, não foi

observado aumento significativo da absorbância após 72 horas de incubação.

Como nenhuma das alterações propostas no meio CDT permitiu o crescimento pós-germinativo destes esporos, avaliou-se o MMGCp-M. O resultado é mostrado nas figuras 7. O tempo para ativação empregado foi de 5 minutos, à temperatura de ebulição.

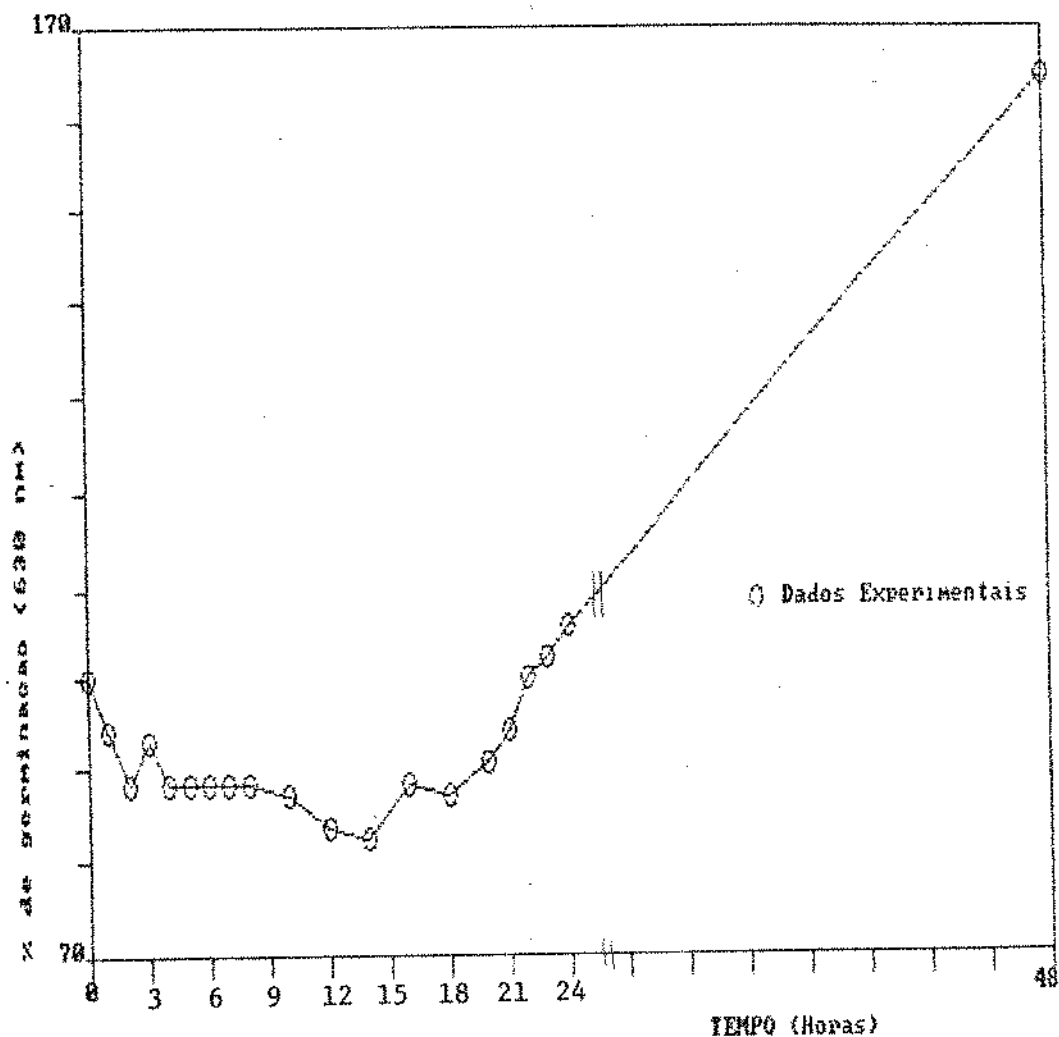


FIGURA 7 - GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO DE ESPOROS DOS *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MMGCp-M pH 7,0

No MMGCp-M a germinação e o crescimento pós-germinativo foram evidenciados, com redução da absorbância em 17% após 15

horas e posterior elevação até 1,40 em 48 h de incubação. A presença de células vegetativas foi ainda confirmada em microscópio, após coloração de GRAM.

Buscando-se um meio simples onde permitisse acompanhar a germinação e o crescimento pós-germinativo foi avaliado o meio CN pH 6,9. A ativação dos esporos inoculados no meio CN foi de 5 minutos a temperatura de ebulição. O resultado é apresentado na figura 8.

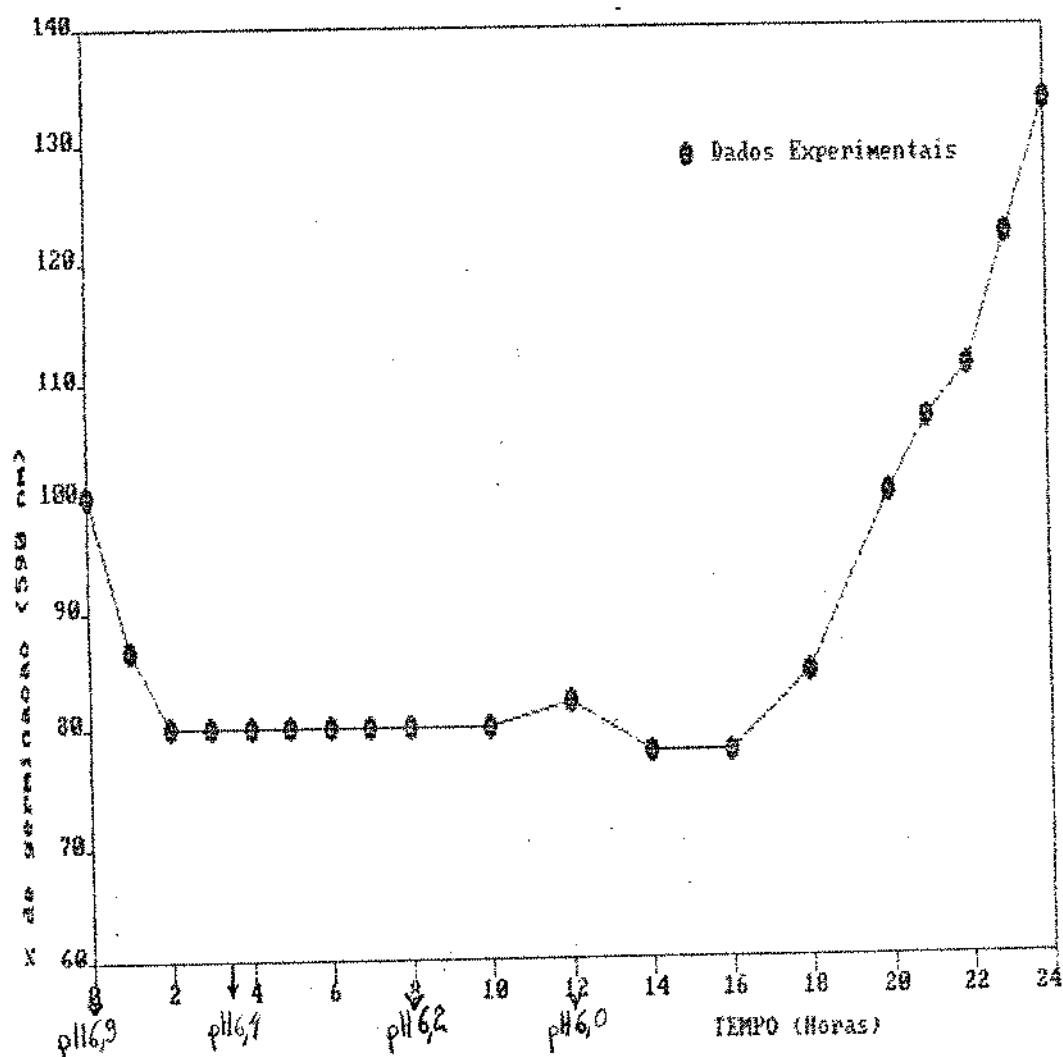


FIGURA 8 - GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO CN pH 6,9

O meio CN permitiu uma rápida germinação, com decréscimo da absorbância de 22% em 3 horas de incubação e o crescimento pós-germinativo ocorreu após 18 horas de incubação. Observou-se, também, que não houve queda brusca no valor de pH do meio de cultura inoculado.

Concluindo, os dois meios que permitiram observar as etapas de germinação e o crescimento pós-germinativo do esporo de *B. stearothermophilus* FS 1518 foram o MMGCp-M e o meio CN. Observa-se nas figuras 7 e 8 que a fase "lag" para o crescimento pós-germinativo destes esporos foi longa (± 13 h).

Os esporos produzidos pelo método de PFLUG (1982) não podem ser considerados como extremamente dormentes. Para GOULD (1970) este conceito se aplica àqueles que demoram a germinar. Em todos os experimentos a germinação ocorreu, mesmo que incompleta, nas primeiras horas após a incubação. Vale salientar aqui, que há dificuldades na determinação da taxa de germinação, neste e nas outras metodologias disponíveis, visto que esta taxa refere-se a uma população, onde há esporos em diferentes estágios, e não a um esporo isoladamente (VARY & HALVORSON, 1965).

De acordo com os resultados obtidos parece que o meio CDT (diluído ou não, com ou sem o corante púrpura de bromocresol) não permitiu o crescimento pós-germinativo destes esporos por causa da rápida solubilização dos ácidos formados durante o crescimento vegetativo no meio líquido. Esta solubilização é menos favorecida em meios sólidos sendo, portanto, o meio ADT indicado para seu crescimento (FIELDS, 1973; PFLUG, 1982). Esta observação pode ser utilizada também para explicar a redução da contagem de células sobreviventes com a adição de amido em 0,1% nos experimentos de otimização do binômio de ativação. COOK & GILBERT (1968) observaram o aumento na contagem de sobreviventes com 0,1% de amido em meios sólidos. O meio CN não possui glicose e/ou amido na sua formulação, o que permitiu uma redução menos drástica no valor de pH, e o MMGCp-M possui sais, que possivelmente têm efeito tamponante.

5.4 - INIBIÇÃO DA GERMINAÇÃO E DO CRESCIMENTO PÓS-GERMINATIVO DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 PELA NISINA

Como mostrado na figura 9 (A, B, C) a nisina não teve ação inibitória sobre a germinação dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518, e sim sobre o crescimento pós-germinativo dos mesmos. Os resultados obtidos com a adição de concentrações inferiores a 50 UI/ml também permitiram a germinação destes esporos e foram inconclusivos sobre a inibição do crescimento pós-germinativo. Portanto, através deste método, a MCI não pode ser estabelecida.

Fig. 9a-

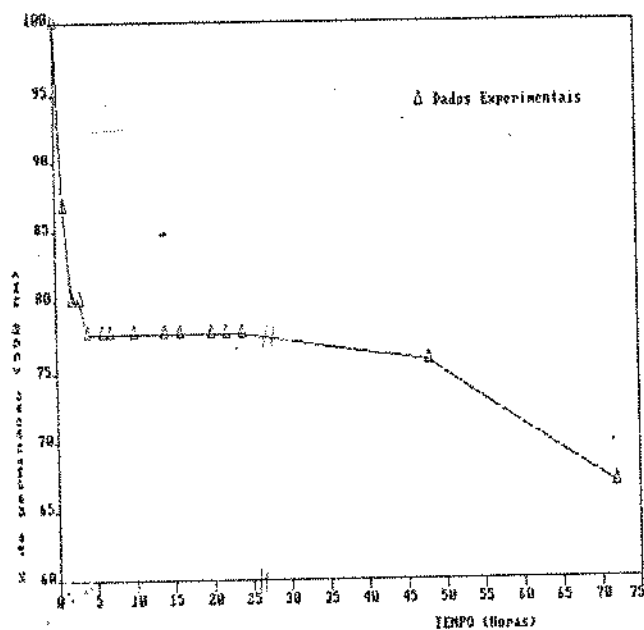


Fig. 9b -

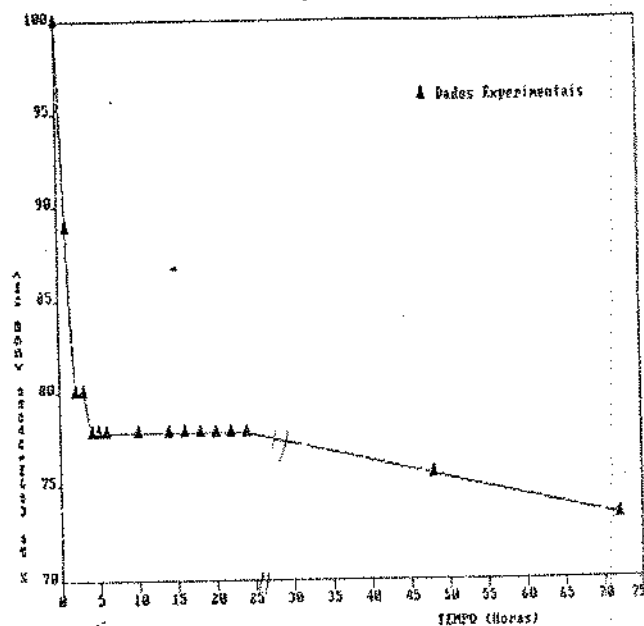


Fig. 9c -

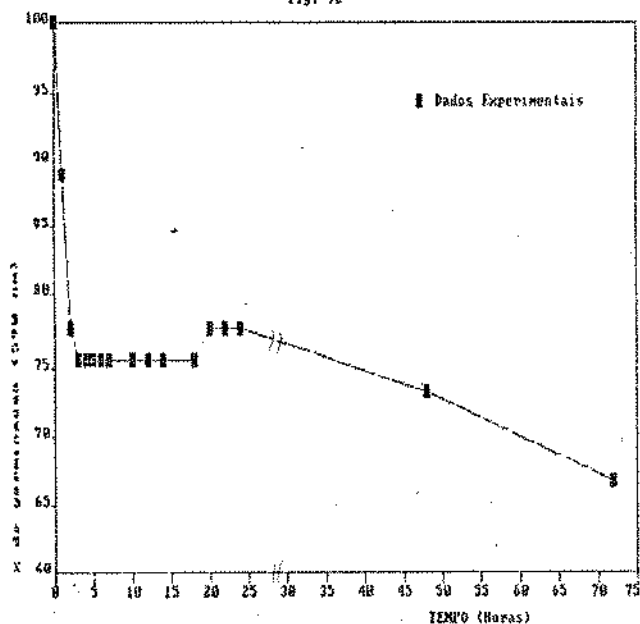


FIGURA 9 - EFEITO DA NISINA, NA CONCENTRAÇÃO DE 1000 UI/ml (A), 500 UI/ml (B) e 250 UI/ml (C) SOBRE A GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO POS-GERMINATIVO DE ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518

Ainda que o modo de ação da nisina em células vegetativas e esporos seja um dado pouco estudado, os trabalhos de revisão mais recentes citam que ocorre inibição do crescimento pós-germinativo dos esporos (DELVES-BROUGHTON, 1990 a, b; HARRIS *et alii*, 1992), e os resultados obtidos no presente trabalho corroboram as observações acima.

5.5 - MCI DA NISINA SOBRE O CRESCIMENTO VEGETATIVO DE ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518

Os esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 foram ativados para germinação durante 5 minutos à temperatura de ebulição, com resfriamento imediato durante 2 minutos em banho de gelo. O meio de cultura empregado foi o AN, adicionado de nisina em várias concentrações. A contagem de inóculo de partida, nas mesmas condições sem nisina foi de $8,9 \times 10^6$ UFC/ml (média de duplicatas). Os resultados obtidos são apresentados na tabela 14:

TABELA 14 - CONTAGEM DE CÉLULAS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO AN CONTENDO
VARIAS CONCENTRAÇÕES DE NISINA

INOCULO (UFC/ml) ¹	CONCENTRAÇÃO DE NISINA ADICIONADOS NO MEIO AN (UI/ml)													
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	150	200	250
$8,9 \times 10^6$	> 300	$1,9 \times 10^8$	$2,3 \times 10^7$	5×10^5	5×10^4	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
$8,9 \times 10^5$	> 300	$6,5 \times 10^6$	$9,5 \times 10^5$	5×10^5	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
$8,9 \times 10^4$	> 300	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
$8,9 \times 10^3$	$1,9 \times 10^5$	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC
$8,9 \times 10^2$	$4,8 \times 10^4$	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC	NC

1 - Os resultados correspondem à média das duplicatas;
Incubação : 72 horas a 55°C; NC = não houve crescimento

Como mostrado na tabela 14, concentrações de 0-40 UI/ml de nisina permitiram o crescimento pós-germinativo destes esporos, evidenciado pela formação de colônias em agar. Concentração acima de 50 UI/ml não permitiram o crescimento vegetativo de 10^6 esporos/ml. Estudos complementares são necessários para afirmar se a inibição ocorreu no crescimento vegetativo ou no pós-germinativo. Foi observado, também, que a concentração inibitória é dependente da biocarga do inóculo, o que já havia sido relatado por RAYMAN *et alii* (1981).

De acordo com JARVIS (1967), a MCI para prevenir a formação de colônias a partir de esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 é variável com o tipo da capa de esporos (se do tipo L ou M) e com a linhagem deste microrganismo. Para GUPTA *et alii* (1971), o componente do meio de subcultura também é outro fator que influencia este valor. A MCI para estes organismos varia de 2 a 1000 UI/ml (DENNY *et alii*, 1961; JARVIS, 1967). No presente experimento ficou evidenciado que uma concentração de 50 UI/ml de nisina é a MCI para uma população de esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 de 10^6 UFC/ml, quando submetidos a uma ativação para germinação durante 5 minutos à temperatura de ebulição com resfriamento por 2 minutos em banho de gelo e inoculados em meio de subcultura AN.

5.6 - DETERMINAÇÃO DA RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 COM E SEM NISINA NO MEIO DE AQUECIMENTO

5.6.1 - Quantificação de microrganismos termofílicos totais produtores de acidez plana no cogumelo "*in natura*"

Na tabela 15 são apresentados os resultados da contagem total de microrganismos produtores de "flat-sour" no cogumelo "*in natura*" triturado e não-triturado. Observa-se que a contagem

no cogumelo triturado foi maior que o dobro da contagem no cogumelo não triturado. Este dado é coerente, pois estes esporos podem se abrigar com facilidade nas estruturas mais internas do cogumelo. A média de contagem de 280 UFC/10 g do produto triturado dá a indicação de que em uma embalagem de 250 g do produto pode haver 7000 UFC de microrganismos produtores de "flat-sour". Se aplicarmos 5 reduções decimais, esta população ficaria reduzida a 0,07 UFC/250 g.

TABELA 15 - QUANTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS TERMÓFILOS CAUSADORES DE ACIDEZ PLANA EM COGUMELOS TRITURADOS E NÃO TRITURADOS

AMOSTRA	ALÍQUOTAS	CONTAGEM EM 48h (UFC/10g)	X ₁ (UFC/10g) 48h	CONTAGEM EM 72h (UFC/10g)	X ₂ (UFC/10g) ¹ 72h
Não triturada	1	108	106	109	114
	2	121		141	
	3	88		91	
Triturada	1	340	230	370	280
	2	240		310	
	3	110		170	

1. X₁ e X₂ Correspondem aos valores médios das contagens em 48-72h, respectivamente.

Cabe salientar que não existe indicação do padrão de "flat-sour" para este tipo de produto. O mais próximo é da NCA (National Canners Association) para açúcar adicionado em alimentos enlatados, o qual indica que em cinco amostras, a média não pode exceder a 50 esporos/10 g de amostra (SPECK, 1976).

5.6.2 - Confirmação do crescimento dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 no meio HC

A confirmação do crescimento dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 no meio HC foi evidenciada pelo decréscimo do valor de pH de 6,2 para 3,9, após 72 horas de incubação a 55 °C. O crescimento também foi confirmado por microscopia, após coloração de GRAM.

Tubos contendo o HC, após a esterilização, foram incubadas a 37° C e 55° C, para confirmar o processo de esterilização. Nestes, não foi verificada redução no valor de pH e nem a presença de microrganismos por microscopia, após coloração específica.

5.6.3 - Determinação dos "atrasos" térmicos para as ampolas TDT contendo meio HC e inóculo

Os "atrasos" térmicos encontrados para as ampolas TDT e a média destes para cada temperatura, são apresentados na tabela 16.

TABELA 16 - DETERMINAÇÃO DOS "ATRASOS" TÉRMICOS DAS AMPOLAS TDT

TEMPERATURA (°C)	"LAG"1 (min)	"LAG"2 (min)	"LAG"3 (min)	"LAG" médio (min)
118	3,67	3,67	3,55	3,63
121	3,47	3,25	3,67	3,46
125	3,25	3,50	3,92	3,55

Os valores médios dos "atrasos" obtidos para cada temperatura foram utilizados para determinar o tempo real de aquecimentos dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 nos ensaios de resistência térmica. Para tal, o valor médio de cada "atraso" foi subtraído de cada tempo de aquecimento.

5.6.4 - Determinação da resistência térmica dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 no meio HC com e sem a adição de nisina

A metade da MCI de nisina (25 UI/ml) foi a concentração escolhida para estudar o seu efeito sobre os esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 no meio HC. Para cada temperatura de trabalho determinou-se o número de sobreviventes nos tempos de aquecimento correspondentes, com e sem a adição de nisina ao meio de aquecimento. Os respectivos resultados com e sem adição de nisina são apresentados nas tabelas 17 e 18, respectivamente e visualizados nas figuras 10 a 13.

TABELA 17 - RESISTENCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO HC A 125°, 121° E 118°C

TEMPERATURA DE AQUECIMENTO (°C)	TEMPO DE AQUECIMENTO (min)	TEMPO DE AQUECIMENTO CORRIGIDO (min) ¹	MÉDIA DA CONTAGEM DO NÚMERO DE SOBREVIVENTES (UFC/ml) ²
125	0	0	$3,9 \times 10^6$
	6	2,45	$4,6 \times 10^4$
	10	6,45	$1,6 \times 10^4$
	12	8,45	$2,1 \times 10^4$
	14	10,45	$1,2 \times 10^4$
	16	12,45	$1,3 \times 10^3$
121	0	0	$3,9 \times 10^5$
	10	6,53	$2,2 \times 10^4$
	20	16,53	$1,4 \times 10^4$
	25	21,53	$4,1 \times 10^3$
	30	26,53	$3,5 \times 10^3$
	40	36,53	$1,4 \times 10^3$
118	0	0	$3,9 \times 10^5$
	20	16,38	$5,0 \times 10^3$
	35	31,38	$2,1 \times 10^3$
	50	46,38	$7,5 \times 10^2$
	65	61,38	$2,8 \times 10^2$

1 - Tempo corrigido = Tempo de aquecimento - "atraso" térmico. Os valores dos tempos "lag" foram 3,55; 3,46 e 3,63 minutos para as temperaturas de 125°, 121° e 118°C, respectivamente.

2 - Meio de subcultura = AN. Condições de incubação: 5 dias a 55°C. Os resultados correspondem à média das duplicatas.

HC = Homogeneizado de cogumelos em salmoura 1,5% (p/v) pH 6,2.

TABELA 18 - RESISTENCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO HC ADICIONADO DE NISINA A 125°, 121 E 118°C

TEMPERATURA DE AQUECIMENTO (°C)	TEMPO DE AQUECIMENTO (min)	TEMPO DE AQUECIMENTO CORRIGIDO (min) ¹	MÉDIA DA CONTAGEM DO NUMERO DE SOBREVIVENTES (UFC/ml) ²
125	0	0	2,9 x 10 ⁶
	10	6,45	3,4 x 10 ³
	12	8,45	2,9 x 10 ³
	14	10,45	2,1 x 10 ²
	16	12,45	1,3 x 10 ²
121	0	0	3,1 x 10 ⁵
	5	1,53	5,5 x 10 ⁴
	10	6,53	2,8 x 10 ³
	20	16,53	1,5 x 10 ³
	25	21,53	2,5 x 10 ³
	27	23,53	6,0 x 10 ²
	30	26,53	não cresceu
	40	36,53	não cresceu
118	0	0	3,1 x 10 ⁵
	5	1,38	5,9 x 10 ⁴
	10	6,38	1,8 x 10 ⁴
	20	16,38	2,7 x 10 ³
	35	31,38	2,2 x 10 ²
	50	46,38	não cresceu
	60	61,38	não cresceu

1 - Tempo corrigido = Tempo de aquecimento - "lag" térmico. Os valores dos tempos "lags" foram 3,55; 3,46 e 3,63 minutos para as temperaturas de 125°, 121° e 118°C, respectivamente.

2 - Meio de subcultura = AN + 25 UI/ml de nisina. Condições de incubação: 5 dias a 55°C. Os resultados correspondem à média das duplicatas.

HC = Homogeneização de cogumelos em salmoura 1,5% (p/v) pH 6,2.

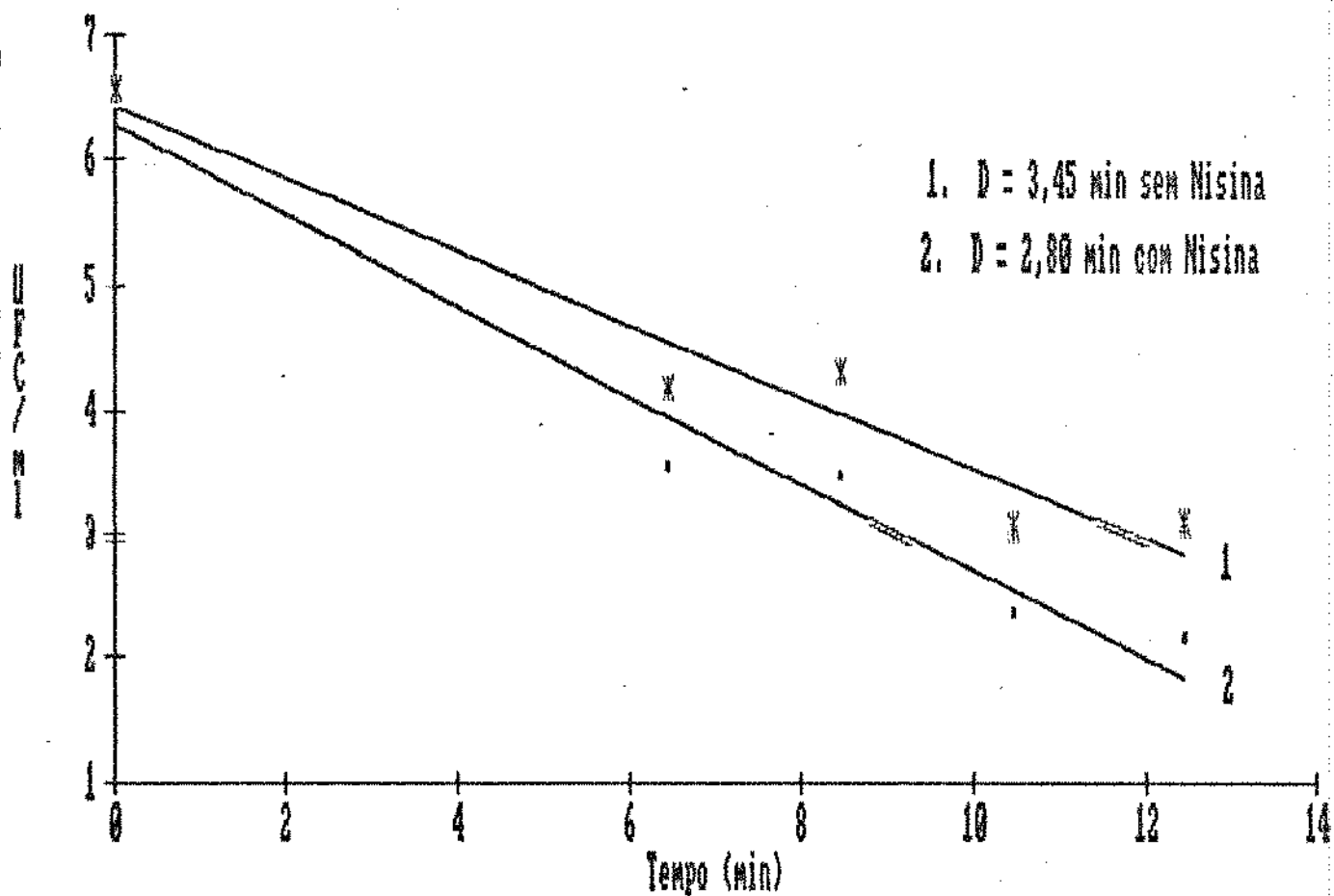


FIGURA 10 - CURVA DE SOBREVIVENTES DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO HC COM E SEM ADIÇÃO DE 25 UI/ml DE NISINA A 125°C

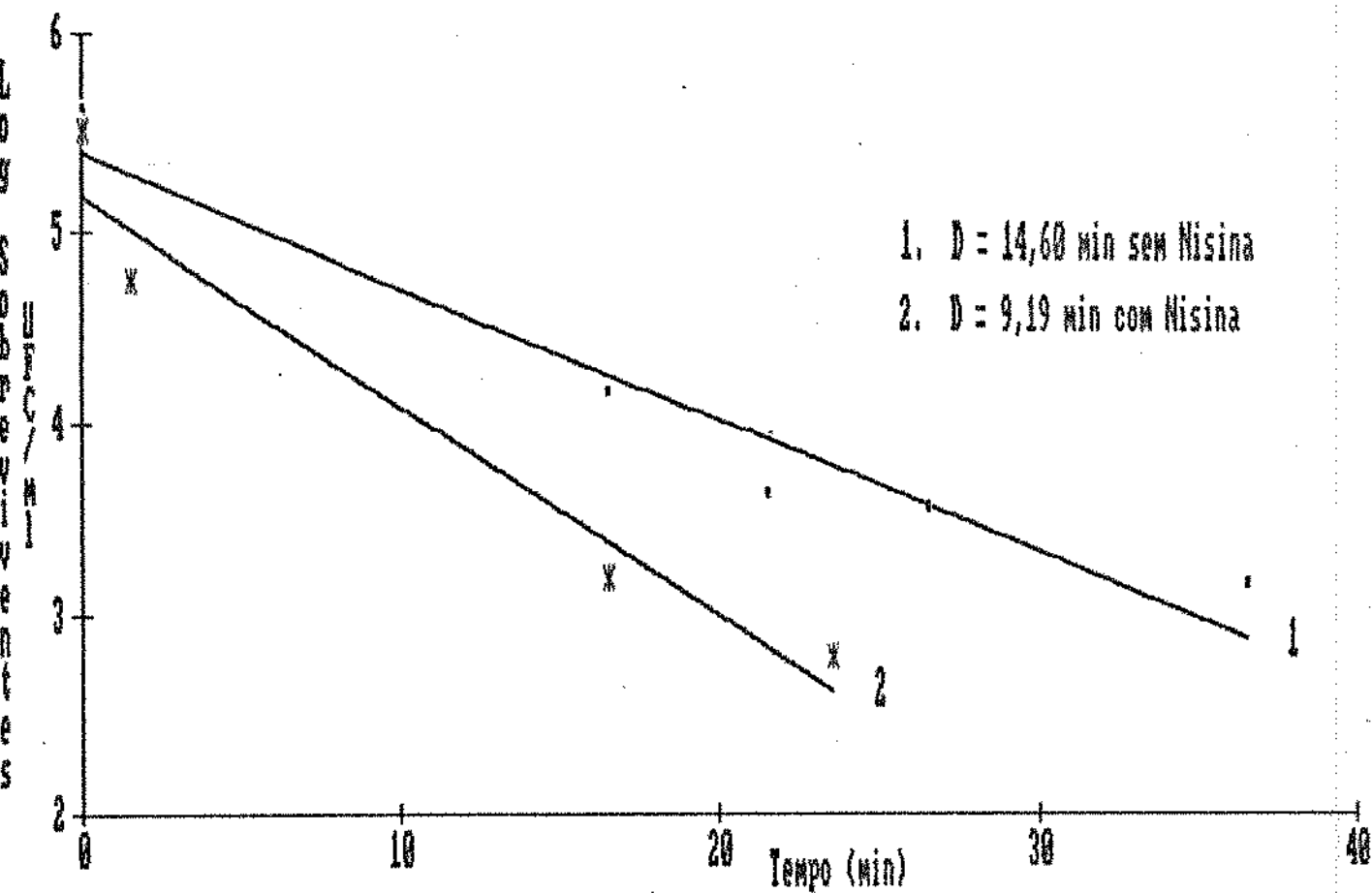


FIGURA 11 - CURVA DE SOBREVIVENTES DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO HC COM E SEM A ADIÇÃO DE 25UI/ml DE NISINA A 121°C

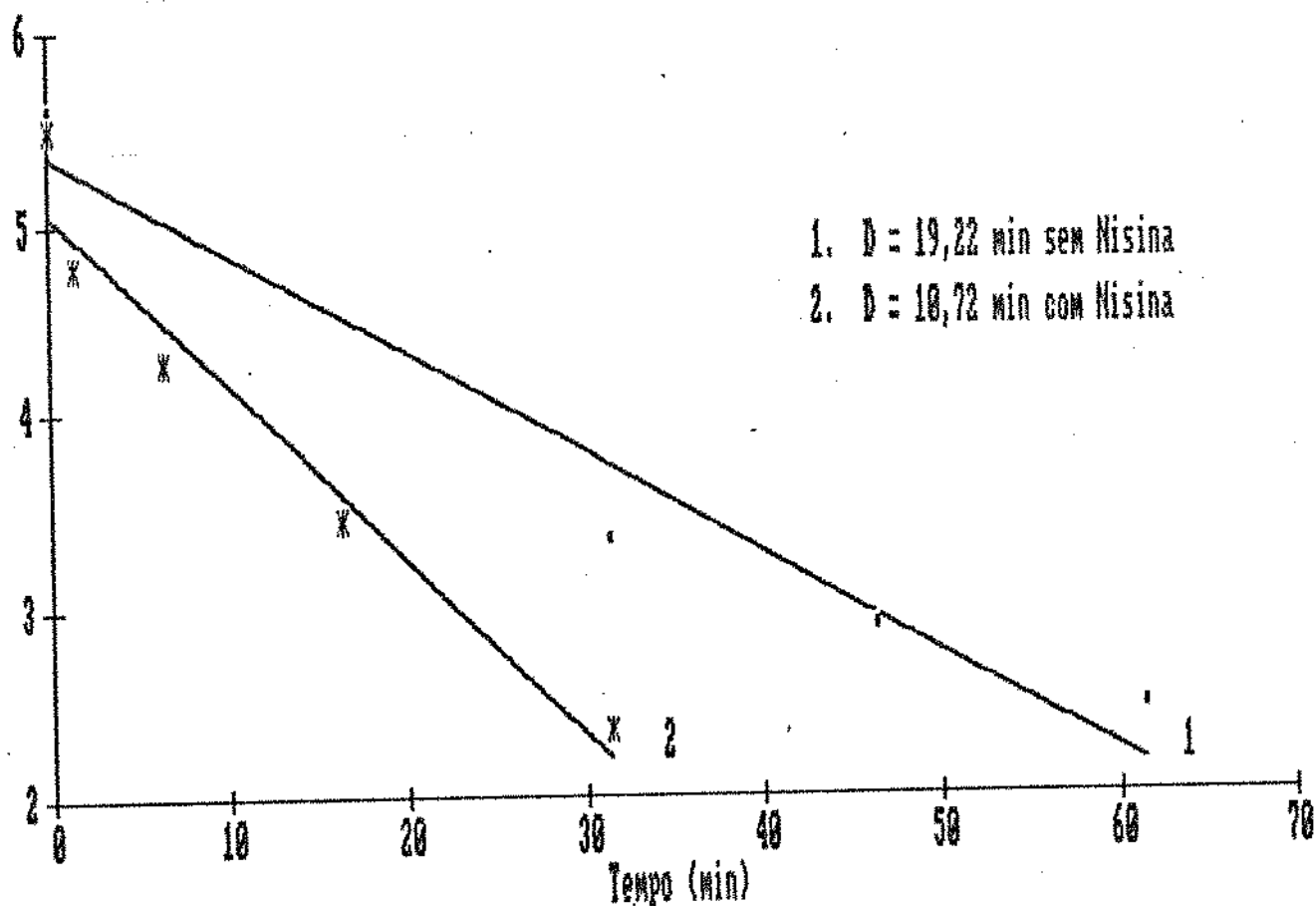


FIGURA 12 - CURVA DE SOBREVIVENTES DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO HC COM E SEM A ADIÇÃO DE 25UI/ml DE NISINA A 118°C

Os inversos negativos dos coeficientes angulares de cada "Curva de sobreviventes" foram considerados como o tempo de Redução Decimal (valor D) a cada temperatura e são apresentados na tabela 19.

TABELA 19 - COMPARAÇÃO DOS ÍNDICES DE REDUÇÃO DECIMAL (D) PARA OS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO HC COM E SEM A ADIÇÃO DE NISINA

MEIO DE AQUECIMENTO	TEMPERATURA (°C)	VALOR D (min)	CORRELAÇÃO (r^2)
HC sem nisina	125	3,45	0.94
	121	14,59	0.94
	118	19,22	0.95
HC com 25 UI/ml de nisina	125	2,80	0.97
	121	9,19	0.95
	118	10,72	0.96

Os Índices de Redução Decimal (valor D) decresceram em 19, 36 e 44% nas temperaturas de 125°, 121° e 118°C, respectivamente. Os dados indicam que a ação da nisina é maior quando se reduz a temperatura de aquecimento, sugerindo que há perda de sua atividade com o aumento da temperatura. O'BRIEN *et alii* (1956) evidenciaram 30% de redução no valor $D_{121^\circ\text{C}}$, para os mesmos esporos, em purê de ervilha contendo 140 UI/ml de nisina. Este dado se assemelha com os do presente estudo. Os valores D no meio HC sem nisina obtidos foram bastantes elevados, sugerindo que este alimento proporciona um aumento na resistência térmica dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518. BERRY Jr. & BRADSHAW (1982) obtiveram valores bem inferiores (tabela 21). Entretanto, estes autores produziram esporos por outra metodologia e utilizaram salmoura com 3% de sal. As condições de

produção de esporos influenciam na resistência térmica (YOKOYA & YORK, 1965). Vale salientar também que BERRY Jr. & BRADSHAW (1982) determinaram a resistência térmica dos esporos na salmoura, e não no homogeneizado de cogumelos como no presente estudo. Eles encontraram valores D aproximadamente 7 vezes inferior que o obtido neste trabalho.

Falta de dados sobre a resistência térmica de *B. stearothermophilus* FS 1518 neste alimento dificultam a comparação dos resultados obtidos.

O valor Z (Índice de Temperatura) foi determinado matematicamente, equivalendo ao recíproco da inclinação da "Curva de Resistência Térmica", obtida graficando log dos valores D no eixo das coordenadas a cada temperatura, e no eixo das abcissas as temperaturas correspondentes, de acordo com a figura 13.

Os resultados obtidos para o valor Z estão próximos dos obtidos por STUMBO (1973) e PFLUG (1982), apresentados na tabela 21.

TABELA 20 - VALORES DO ÍNDICE DE TEMPERATURA (Z) PARA OS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO HC COM E SEM DE 25 UI/ml DE NISINA

MEIO DE AQUECIMENTO	TEMPERATURA (°C)	VALOR D (min)	LOG VALOR D (min)	TEMPERATURA (°C)	VALOR Z (°C)	CORRELAÇÃO (r ²)
HC	125	3,45	0,5378	125	9,15	0,92
	121	14,59	1,1641	121		
	118	19,22	1,2838	118		
HC com 25 UI/ml de nisina	125	2,80	0,4472	125	11,66	0,89
	121	9,19	1,9633	121		
	118	10,72	1,0302	118		

Para o cálculo do valor de esterilização requerido deste produto (F) com e sem a adição de nisina, utilizou-se de 5 reduções decimais, totalizando 72,95 minutos a 121°C sem a adição de nisina e 45,95 minutos a 121°C com 25 UI/ml de nisina. Desta maneira, a adição de nisina é eficaz para a redução do processo térmico requerido em, aproximadamente, 36% nesta temperatura. HEINEMANN *et alii* (1965) obtiveram uma redução de 88% no valor de esterilização utilizando 40 UI/ml de nisina neste alimento (tabela 21)

Os dados obtidos neste estudo são suficientes para estabelecer o valor de esterilização da conserva de cogumelos em salmoura 1,5% (p/v) pH 6,2 com 25 UI/ml de nisina. O tratamento propõe uma alternativa na produção industrial desta conserva, que atualmente utiliza a acidificação como forma de preservação, alterando as qualidades sensoriais deste produto.

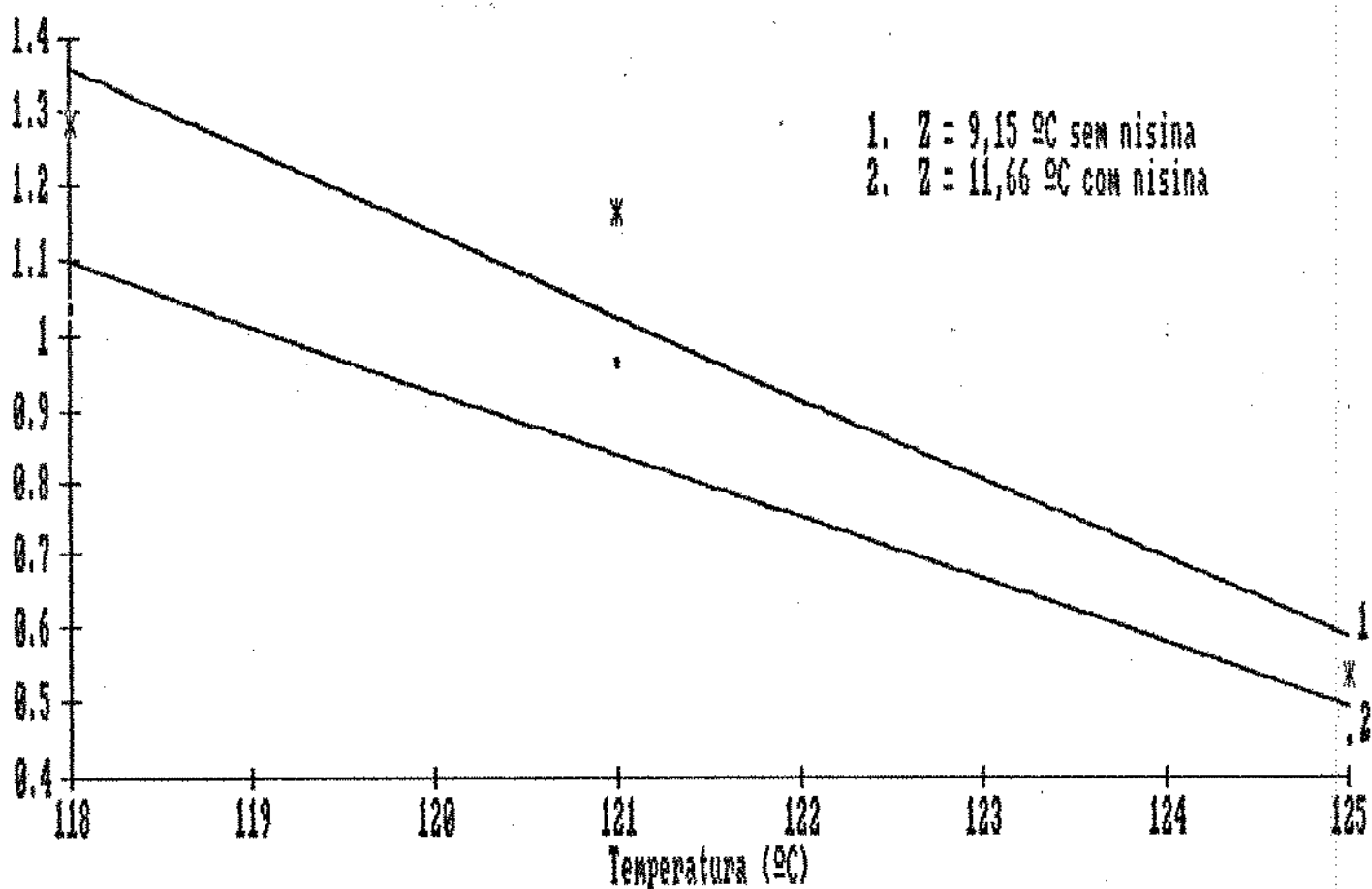


FIGURA 13 - CURVA DE RESISTÊNCIA TÉRMICA DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 NO MEIO HC COM E SEM 25UI/ml DE NISINA

Os valores comparativos citados nesta discussão são apresentados na tabela 21.

TABELA 21 - DADOS SOBRE A CINÉTICA DE DESTRUÇÃO TÉRMICA DOS ESPOROS DE *B. stearothermophilus* FS 1518 COM E SEM NISINA

MEIO DE SUSPENSÃO	VALOR D 121°C (min)	VALOR Z (°C)	TRATAMENTO TÉRMICO	REFERÊNCIA
	4 - 5	8 - 9		STUNBO (1973)
Solução salina com dextrose 5%	1,3	11,40		PFLUG (1982)
água	4,0	8,4		
solução aquosa com dextrose 5%	2,42	10,3		
Caldo triptona- Extrato de levedura			25 UI/g + 5 min/100°C ¹	DENNY <i>et alii</i> (1961)
Purê de cogumelos pH 6,1			40 UI/ml + F = 3 min a 121°C ²	HEINEMANN <i>et alii</i> (1965)
Cogumelos em salmoura 3,0%	1,12 e 3,53 (exp. 1) 2,56 (exp 2)			BERRY JR. & BRADSHAW (1982)

1 - Não deteriorou quando incubado por 10 dias a 55°C

2 - Este processo impediu a deterioração de todas latas analisadas, entretanto houve deterioração no controle. Este alimento, sem nisina, necessita de F = 25 minutos.

6. CONCLUSÕES

- A metodologia para a produção de esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 proposta por PFLUG (1982) foi mais eficiente, pois a população obtida foi maior que na metodologia proposta por KIM & NAYLOR (1966). Ademais, os meios de cultura utilizados no método de PFLUG (1982) foram menos onerosos e a metodologia mais simplificada. Os esporos produzidos pela metodologia de PFLUG (1982) não são muito dormentes, visto que germinaram facilmente nos meios CDT, CDT diluído, CDT-M, CN e MMGCp-M.
- A ativação mais adequada para os esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518 produzidos foi de 5 minutos a temperatura de ebulição nos meios ADT, AN e MMGCp-M. Verificou-se também que a população obtida no meio CN é a mesma obtida no meio AN, comprovando que a adição de agar no meio de cultura não influencia na produção de células. Comprovou-se que a adição de amido, na concentração de 0,1%, não é eficiente para a recuperação de esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518, no meio MMGCp-M.
- Os únicos meios que permitiram observar as etapas de germinação e de crescimento pós-germinativo dos esporos de *B. stearothermophilus* FS 1518, utilizando o método espectrofotométrico de redução de absorbância foram o MMGCp-M e o meio CN. O meio CDT (diluído ou não com ou sem corante púrpura de bromocresol) não permitiu o crescimento pós-germinativo destes esporos por causar rapidamente a solubilidade dos ácidos formados durante o crescimento vegetativo, reduzindo rapidamente o pH do meio e inibindo o crescimento deste microrganismo.
- Verificou-se que a nisina não inibe a germinação destes

esporos. O efeito de inibição foi posterior à germinação. Concentrações de nisina maior ou igual a 50 UI/ml inibiram o crescimento pós-germinativo destes esporos no meio AN. A MCI, numa população de 10^6 UFC/ml, foi de 50 UI/ml.

- As porcentagens de redução dos valores D para estes esporos, inoculados no meio HC contendo 25 UI/ml de nisina, decresceram com o aumento da temperatura. Observou-se que a ação da nisina é maior quando se reduz a temperatura de aquecimento, sugerindo que há perda da sua atividade com o aumento da temperatura. Houve redução no valor de esterilização requerido (F) deste produto na presença de 25 UI/ml de nisina. A ação da nisina coadjuvante térmico neste produto ficou demonstrada.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, G.; DEBRAY E.; CANDAU, Y. and PIAR, G. - Mathematical model of thermal destruction of *B.stearothermophilus* spores. Applied and Environmental Microbiology, 56: 3073-3080, 1990.
- AMERICAN CAN COMPANY - The canned food reference manual. New York, 1943, p 300.
- ASSUMPÇÃO, R. M. V. & MORITA, T. - Manual de soluções, reagentes e solventes. Edgar Blücher Ltda, 1968.
- ATKINSON, A.; EVANS, C. G. T. and YEO, R. G. - Behaviour of *B.stearothermophilus* grown in different media. Journal of Applied Bacteriology, 38: 301-304, 1975.
- BENKERROUN, N. & SANDINE, W. E. - Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. Journal of Dairy Science, 71: 3237, 1988.
- BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, 8 ed. In: BUCHANAN, R. E. & GIBBONS, N. E. (eds) Baltimore, Williams & Wilkis Company, 1975.
- BERRY JR., M. R. & BRADSHAW, J. G. - Heat penetration for sliced mushrooms in brine processed in still and agitating retorts with comparisons to store count reduction. Journal of Food Science, 47: 1698-1704, 1982.
- BIGELOW, W. D. & ESTY, J. R. - The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. Journal Infections Diseases, 27: 602-617, 1920.
- BOONE, P. - Mode of action and applications of nisin. Food Manufacture, 41: 49-51, 1966.

- BRASIL. Ministério da Saúde - DINAL Portaria No 06 de 14 de Fevereiro de 1990. Diário Oficial da União, 16 de fevereiro, 1990.
- CAMPBELL Jr., L. L. - Bacterial spore germination - Definitions and methods of study. In: HALVORSON, H. O. (ed) Spores. Washington DC, American Institute of Biological Sciences, 1957.
- CAMPBELL Jr., L. L. & O'BRIEN, R. T. - Antibiotics in food preservations. Food Technology, 9: 461-465, 1955.
- CAMPBELL Jr., L. L. & SNIFF, E. E. - Effect os subtilin and nisin on the spores of *B. coagulans*. Journal of Bacteriology, 77: 766-770, 1959.
- CAMPBELL Jr., L. L. SNIFF, E. E. and O'BRIEN, R. T. - Subtilin and nisin as additives that lower the heat-process requeriments of canned foods. Food Tecnology, 13: 462-464, 1959.
- CAMPBELL Jr., L. L. & WILLIAMS, O. B. - The effect of temperature on the nutritional requeriments of facultative and obligate thermophilic bacteria. Journal of Bacteriology, 65: 141-145, 1953.
- CAMPBELL Jr., L. L.; RICHARDS, C. M. and SNIFF, E. E. - Isolation of strains of *B.stearothermophilus* with altered requeriments for spore germination. In: CAMPBELL Jr., L. L. & HALVORSON, H. O. (eds) Spores III, Michigan, Soc. for Microbiol, 1965.
- CHURCH, B. D.; HALVORSON H. and HALVORSON, H. O. - Studies on spore germination: its independence from alanine racemase activity. Journal of Bacteriology, 68: 393-399, 1954.

- CLAYPOOL, L.; HEINEMANN, B.; VORIS, L. and STUMBO, C. R. - Residence time of nisin in the oral cavity following consumption of chocolate milk containing nisin. *Journal of Dairy Science*, 49: 314-316, 1966.
- COOK, A. M. & GILBERT, R. J. - Factors affecting the heat resistance of *B. stearothermophilus* spores. *Journal of Food Technology*, 3: 285-293, 1968.
- COOK, F. K. & PIERSON, M. D. - Inhibition of bacterial spores by antimicrobials. *Food Technology*, 11: 115-126, 1983.
- DELVES - BROUGHTON, J. - Nisin in food preservation. *North European Dairy Journal*, 53: 1-8, 1987.
- DELVES BROUGHTON, J. - Nisin and its application as a food preservative. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 43: 73-76, 1990a.
- DELVES-BROUGHTON, J. - Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology*, 44: 100-117, 1990b.
- DENNY, C. B. - Thermophilic organisms involved in food spoilage: introduction. *Journal of Food Protection*, 44: 144-145, 1981.
- DENNY, C. B.; REED, J. M. and BOHRER, C. W. - Effect of tylosin and heat on spoilage bacteria in canned corn and canned mushrooms. *Food Technology*, 15: 338-340, 1961.
- DIEP, O.; BOULET, M. and JULIEN, J. P. - Etude de la germination des espores de *B. stearothermophilus* en milieux artificiels et dans de conserves alimentaires. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 5: 159-164, 1972.
- DONLEY, R. J. - Nitrate reductase and respiratory adaptation in *B. stearothermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 91: 634-641, 1966.

- EAPEN, K. C.; SANKARAN, R.; VIJAYARAGHAVAN, P. K. - The present status on the use of nisin in processed foods. *Journal of Food Science and Technology*, 20: 231-240, 1983.
- EIROA, M. N. U.; LEITAO, M. F. de F. and TANIWAKI, M. H - Estudo comparativo de modificação do meio agar-dextrose triptona para a contagem de esporos termófilos "flat-sour" em açúcar. *Coletânea do ITAL*, 15: 113-126, 1985.
- FDA Bacteriological Analytical Manual. Arlington Association of Analytical Chemist, 1984.
- FIELDS, M. L. The flat-sour bacteria. *Advances in Food Research*, 18: 163-217, 1970.
- FIELDS, M. L. A research note. Spore counts of thermophilic aerobic bacteria in soil. *Journal of Food Science*, 37: 783-785, 1972.
- FIELDS, M. L. - Effect of dipicolinate on vegetative cells of *Bacillus*. *Journal of Food Science*, 38: 1166-1168, 1973.
- FIELDS, M. L. - Método para estudo das bactérias termofilas. Trad. de YOKOYA, F. & CANHOS, V. P. Campinas. Fundação Centro Tropical de Pesquisa e Tecnologia de Alimentos, 1975. p. 67.
- FIELDS, M. L. & FINLEY, N. - The effect of selected carbohydrates and plant extracts on the heat activation of *B. stearothermophilus* spores. *Journal of Food Science*, 29: 635-640, 1964.
- FIELDS, M. L. & FRANK, H. A. - Dipicolinate-induced germination of *B. stearothermophilus* spores. *Journal of Bacteriology*, 97: 464-465, 1969.

FINLEY, N. & FIELDS, M. L. - Heat activation and heat induced dormancy of *B. stearothermophilus* spores. *Applied Microbiology*, 10: 231-236, 1962.

FOOD PROCESSORS INSTITUTE - Alimentos Enlatados, principios de controle de processamento térmico, acidificação e avaliação do fechamento de recipientes. Tradução pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas, 1983. 377 p.

FOWLER, G. G. - The potential of nisin - *Food Manufacture*: 57-59, 1979.

FOWLER, G. G. & McCANN, B. - The growing use of nisin in dairy industry. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 26: 44-46, 1971.

FRAZIER, W. C. - Características y cultivo de los microorganismos termófilos. In: FRAZIER, W. C. & WESTOFF, D. C. 3 ed. *Microbiología de los Alimentos*. Zaragoza, Acriba, 1985.

GAO, F. H.; ABEE, T. and KONNINGS, W. N. - Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c oxidase - containing proteoliposomes. *Applied and Environmental Microbiology* 57,: 2164-2170, 1991.

GARCERA, M. J. G.; ELFERINK, M. G. L.; DRIESSEN, A. J. M. and KONNINGS, W. N. - *In vitro* pore-forming activity of the antibiotic nisin. Role of protomotive force and lipid composition. *Journal of Biochemistry*, 212: 417-422, 1993.

GORDON, R. E. & SMITH, N. R. - Aerobic spore forming bacteria capable of growth at high temperatures. *Journal of Bacteriology*, 58: 327-342, 1949.

GOULD, G. W. - Germination and the problem of dormancy. *Journal of Applied Bacteriology*, 33: 34-39, 1970.

- GOULD, G. W. - Methods for studying bacterial spores. IN: MORIS, J. R. & RUBBONS, D. W. (eds). *Methods in Microbiology*. London, Academic Press, 1971.
- GUPTA, K. G.; SIDHU, R. and YADAV, N. K. - Effect of monovalent and divalent ions upon the germination of *Bacillus* spores in the presence of nisin. *Journal of Food Science*, 36: 896-898, 1971.
- GUPTA, K. G.; SIDHU, R. and YADAV, N. K. - Effect of various sugars and their derivatives upon the germination of *Bacillus* spores in the presence of nisin. *Journal of Food Science*, 37 (6): 971-972, 1972.
- HALL, R. H. - Nisin and food preservation. - *Process Biochemistry*, 1: 461-464, 1966.
- HARNULY, B. G.; JOHANSSON, M. and SNYGG, B. G. - Heat resistance of *B. stearothermophilus* spores at different water activities. *Journal of Food Science*, 42: 91-93, 1977.
- HARRIS, L. J.; FLEMING, H. P. and KLAENHAMMER, T. R. - Sensitivity and resistance of *L. monocytogenes* ATCC 19115, SCOTT A, and VAL 500 to nisin. *Journal of Food Protection*, 54: 836-840, 1991.
- HARRIS, L. J.; FLEMING, H. P. and KLAENHAMMER, T. R. - Developments in nisin research. *Food Research International*, 25: 57-66, 1992.
- HAWLEY, B. H. - Nisin in food technology-1. *Food Manufacture*, 32: 370-376, 1957.
- HEINEMANN, B.; VORIS, L. and STUMBO, C. R. - Use of nisin in processing food products. *Food Tecnology*, 19: 592-596, 1965.

- HENNING, S.; METZ, R. and HAMMES, W. P. - Studies of the mode of actions of nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 3: 121-134, 1986a.
- HENNING, S.; METZ, R. and HAMMES, W. P. - New aspects of application of nisin to food products based on the mode of action. *International Journal of Food Microbiology*, 3: 135-141, 1986b.
- HERSON, A. C. & HULLAND, E. D. - Principal spoilage in canned food In: HERSON, A. C. & HULLAND, E. D. (eds). *Canned Food; an introduction to their microbiology*. London, Chemical Publishing Company, 1964.
- HILL, W. M. & FIELDS, M. L. - Factors affecting growth and interactions of rough and smooth variants of *B. stearothermophilus*. 1- Oxygen tension and temperature. *Journal Food Science*, 32: 458, 1967a.
- HILL, W. M. & FIELDS, M. L. - Factors affecting the growth and interactions of rough and smooth variants of *B. stearothermophilus*. 2- Media and pH. *Journal of Food Science*, 32: 463-467, 1967b.
- HIRSCH, A. - Some polypeptide antibiotics. *Journal of Applied Bacteriology*, 17: 108-115, 1954.
- HITCHINS, A. D.; GOULD, G. W. and HURST, A. - The swelling of bacterial spores during germination and outgrowth. *Journal of General Microbiology*, 30: 445-453, 1963.
- HOLLEY, R. A. - Review of the potential hazard from botulism in cured meats. *Canadian Institute Food Science and Technology Journal*, 14: 183-195, 1981.

- HURST, A. - Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In: BRANEN, A. L. & DAVIDSON, P. M. (eds). *Antimicrobial in Foods*, New York, Marcer Dekker, 1983.
- ICMSF (International Comission on Microbiological Specifications for Foods). *Microbial Ecology of Foods*. New York, Academic, 1978. 997p.
- ITO, K. A. - Thermophilic organisms in food spoilage: flat-sour aerobes. *Journal of Food Protection*, 44: 157-163, 1981.
- JARVIS, B. - Resistance to nisin and production of nisin inactivating enzymes by several *Bacillus* spores. *Journal of General Microbiology*, 47: 33-48, 1967.
- JARVIS, B. & FARR, J. Partial purification, specificity and mechanism of action of the nisin - inactivating enzyme from *B. cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 227: 232-240, 1971.
- JARVIS, B. & MORISETTI, M. D. - The use of antibiotics in food preservation. *International Biodeterioration Bulletin* 5,: 39-61, 1969.
- JAY, J. M. - Antibiotics as food preservatives. In: ROSE, A. H. (ed). *Food Microbiology*. London, Academic Press, 1983. cap. 4, p. 117-143 (Economic microbiology).
- KANCKO, I. - Cell differentiation in sporulating *Bacilli* In: ISHKAWA, T.; MARUYAMA, Y. and MATSUMYA, H. (eds). *NRI - Symposia on Modern Biology Growth and Differentiation un Microrganismos*, TOKYO, Japan Scientific Society, University Park Press, 1975.
- KEYNAN, A, ISSAHARY - BRAND, G. and EVENCHICK, Z. - Activation of bacterial spores. In: CAMPBELL Jr., L. L. & HALVORSON, H. O. (eds) *Spore III*. Michigan, Society for Microbiology, 1965.

- KEYNAN, A. & HALVORSON, H. O. - Transformation of a dormant spore into a vegetative cell. In: CAMPBELL Jr., L. L. & HALVORSON, H. O. (eds). Spore III, Michigan, Society for Microbiology, 1965.
- KIM, J. & FOEGEDING, P. M. - Effects of heat-, CaCl_2 - and ethanol-treatments on activation of *Bacillus* spores. Journal of Applied Bacteriology, 69: 414-420, 1990.
- KIM, J. & NAYLOR, H. B. - Spore production by *B. stearothermophilus*. Applied Microbiology, 14: 690-691, 1966.
- KOBAYASHI, Y.; STEINBERG, W.; HIGA, A.; HALVORSON, H. O. and LEVINTHAL, C. - Sequential synthesis of macromolecules during outgrowth of bacterial spores. In: CAMPBELL Jr., L. L. & HALVORSON, H. O. (eds). Spore III. Michigan, Society for Microbiology, 1965.
- KRISTJANSSON, J. K. - Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes. Tibtech, 7: 349-353, 1989.
- LEITAO, M. F. F.; EIROA, M. N. V.; DELAZARI, I. - Contaminação de matérias primas e alimentos semiprocessados de origem vegetal por esporos de bactérias I. *Bacillus* sp. mesófilos, *B. coagulans* e *B. stearothermophilus*. Boletim do ITAL, 20: 39-54, 1983.
- LEITAO, M. F.; FALOMIR, C. A. O.; CIAMPI, C. and QUAST, D. G. - Resistência térmica de *B. stearothermophilus* FS 1518 e *Clostridium* PA 3679 em purê de banana natural. Coletânea do ITAL, 8: 313-327, 1977.

- LEITÃO, M. F. F.; HAGLER, L. C. S. M.; HAGLER, A. N. and MENEZES T. J. de Deterioração microbiana de alimentos frescos e processados. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R. and AZEVEDO, J. L. (eds). Tratado de Microbiologia. v. 1. São Paulo, Manole, 1988.
- LEVINE, M.; BUCHANAN, J. H. and LEASE, G. - Effect of concentration and temperature on germicidal efficiency of sodium hidroxide. *Journal of Science*, 1: 379, 1927.
- LEWIS, J. C.; SNELL, N. S. and ALDERTON, G. - Dormancy and activation of bacterial spores. In: CAMPBELL Jr., L. L. & HALVORSON, H. O. (eds). *Spore III*. Michigan, Society. for Microbiology, 1965.
- LIU, W. & HANSEN, J. N. - Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactobacillus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 2551-2558, 1990.
- LONG, S. K. & WILLIAMS, O. B. - Growth of obligate thermophiles at 37°C as a function of the cultural conditions employed. *Journal of Bacteriology*, 77: 545-547, 1960.
- LOPEZ, A. - A complete course in canning and related processes. In: LOPEZ, A. (ed). *Processing procedures for canned food products*, 20 ed. Baltimore, Canning Trade, 1987.
- MALLIDIS, C. G. & SCHOLEFIELD. J. - Evaluation of recovery media for heated spores of *B. stearothermophilus*. *Journal of Applied Bacteriology*, 61: 517-523, 1986.
- MANDELSTAM, J. & McQUILLEM. K. - Differentition: spores and sporogeneses and germination. In: MANDELSTAM, J. & McQUILLEM (eds). *Biochemistry of Bacterial Growth*. New York. Halsted Press, 1973.

- MATTICK, A. T. R. & HIRSCH, A. - Further observations on a inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, II: 5, 1947.
- MAUNDER, D. T. - Thermophilic flat-sour spore formers. In: SPECK, M. L. (ed). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, American Public Health Association, 1976. p. 254-262.
- MORRAN, L.; ROWE, M. T. and HAGAN, I. - The effect of various heat activation treatments on fast, intermediate and slow germinating spores of *Bacillus* ssp. *Letters in Applied Microbiology*, 10: 43-46, 1990.
- MORRIS, J. R. & RIBBONS, D. W. - *Methods in microbiology*. London, Academic Press, 1973. 283p.
- MORRIS, S. L.; WASCH, R. C. and HANSEN, N. - Identification and characterezations of some bacterial membrane, sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action. *The Journal of Biological Chemistry*, 259: 13590-13594, 1984.
- O'BRIEN, R. T. & CAMPBELL Jr., L. L. - The nutritional requeriments for germination and outgrowth of spores and vegetative cell growth of some aerobic spore forming bacteria. *Journal of Bacteriology*, 73: 522-525, 1957.
- O'BRIEN, R. T.; TITUS, D. A.; DELULIN, K. A.; STUMBO, C. R. and LEWIS, J. C. - Antibiotics in food preservation II - Studies on the influence of subtilin and nisin on the thermal resistance of food spoilage. *Food Technology*, 10: 352-355, 1956.
- OGDEN, K. - Nisin, a bacteriocin with a potential use in brewing. *Institute of Brewing Journal*, 92: 379-383, 1986.

- OGDEN, K. & TUBB, R. S. - Inhibition of beer- spoilage lactic acid bacteria by nisin. Institute of Brewing Journal, 91: 390-392, 1985.
- OGDEN, K. & WAITES, M. J. - The action of nisin on beer spoilage lactic acid bacteria. Institute of Brewing Journal, 92: 463-467, 1986.
- OGDEN, K.; WAITES, M. J. and HAMMOND J. R. M. - Nisin and brewing Institute of Brewing Journal, 94: 233-238, 1988.
- PFLUG I. J. - Spore growing procedures. In: PFLUG, I. J. (ed). Selected papers on the microbiology and engineering of sterilization. Minneapolis, Environmental Sterilization Laboratory, 1982.
- PFLUG, I. J. - Microbiology and Engineering of Sterilization. Minneapolis, Environmental Sterilization Laboratory, 1900.
- PHILLIPS, J. D.; GRIFFITHS, M. W. and MUIR, D. D. - Effect of nisin on the shel-life of pasteuerized double cream. Journal of the Science of Dairy Technology, 36: 17-21, 1983.
- POWELL, J. F. & HUNTER, J. R. - Sporulation in distilled water. Journal of General Physiology, 36: 601-609, 1953.
- RADLER, F. - Possible use of nisin in winemaking. I Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeasts in solid and liquid media. American Journal of Enology and Viticulture, 41: 1-6, 1990a.
- RADLER, F. - Possible use of nisin in winemaking. II Experiments to control lactic acid bacteria in the production of wine American Journal of Enology and Viticulture, 41: 7-11, 1990b.

- RAJU, V. V. R. & KUMAR, M. K. - Heat resistance of aerobic forming bacteria in milk. *Indian Journal of Dairy Science*, 42: 71-74, 1989.
- RAMSEIER, H. R. - Die Wirkung von Nisin auf *Clostridium butyricum* prazm. *Archiv für Mikrobiologie*, 37: 57-94, 1960.
- RAYMAN, M. K., ARIS, B. and HURST, A. - Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 41: 375-380, 1981.
- REISENGER, P.; SEIDEL, H.; TSCHESCHE, H. and HAMMES, W. P. - The effect of nisin on murein synthesis. *Archive of Microbiology*, 127: 187-193, 1980.
- RODRIGO, M. - El champiñón y su industrialización. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 21: 437-453, 1981.
- RUHR, E. & SAHL, H.G. - Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmatic and artificial membrane vesicles. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 27: 841-845, 1985.
- SCHMIDT, C. F. - Thermal resistance of microorganisms In: REDDISH, G. F. (ed). *Antiseptics, disinfectants, fungicides, and sterilization*, 2 ed. Philadelphia, Lea and Febiger, 1957.
- SCOTT, V. N. & TAYLOR, S. L. - Effect of nisin on the outgrowth of *C. botulinum* spores. *Journal of Food Science*, 46: 117-120, 126, 1981a.
- SCOTT, V. N. & TAYLOR, S. L. - Temperature, pH and spore load effects on the ability of nisin to prevent the outgrowth of *C. botulinum* spores. *Journal of Food Science*, 46: 121-125, 1981b.

- SHTENBERG, A. J. & IGNATE'EV, A. D. - Toxicological evaluation of some combinations of food preservatives. *Food and Comestics Toxicology*, 8: 369-380, 1970.
- SINGH, L.; MOHAN. M. S. and SANKARAN, R. - Nisin as an aid for thermal preservation of Indian dishes- Upma and Kheer. *Journal of Food Science and Technology*, 24: 227-280, 1987.
- SOMERS, E. B. & TAYLOR, S. L. - Antibolulinal effectiveness of nisin in pasteurized process cheese spreads. *Journal of Food Protection*, 50: 842-848, 1987.
- SPECK, R. V. - Aciduric flat-sour sporoformers. In: SPECK, M. L. (ed). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington, American Publisc Health Association, 1976. p. 248-253.
- SRIMANI, B. & LONCIN, M. - Determination of decimal reduction time of *B.stearothermophilus* and *B. subtilis* spores at 100°C. *Lebensm. Wiss und technol.* 13 (4): 190-192, 1980.
- STERN, J. A. & PROCTOR, B. E. - A micromethod and apparatus for the multiple determination rates of destruction of bacteria and bacterial spores subjected to heat. *Food Technology*, 8: 139-143, 1954.
- STEVENS, K. A.; SHELOON, B. W.; KLAPES, N. A. and KLAENHAMMER, T. R. - Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Envinonmental Microbiology*, 57: 3613-3615, 1991.
- STUMBO, C. R. - Bacteriological considerations relating to process evaluation. *Food Technology*, 2: 115, 1948.
- STUMBO, C. R. - *Thermobacteriology in food processing*. 2 ed. London, Academic Press, 1973. 329 p.

- TANAKA, N.; TRAISMAN, E.; PLANTINGA, P.; FINN, L.; FLOM, W.; MESKE, L. and GUGGISBERG, J. - Evaluation of factors involved in antibotulinal properties of pasteurized process cheese spreads. *Journal of Food Protection*, 49: 526-531, 1986.
- TAYLOR, S. L.; CANN, D. C. and WELCH, B. J. - Antibotulinal properties of nisin in fresh fish packaged in a atmosphere of carbon dioxide. *Journal of Food Protection*, 53: 953-957, 1990.
- TAYLOR, S. L. & SOMERS, E. B. - Evaluation on the antibotulinal effectiveness of nisin in bacon. *Journal of Food Protection*, 48: 949-952, 1985.
- THOMPSON, P. J. & THAMES, O. A. - Sporulation of *B. stearothermophilus*. *Applied Microbiology*, 15: 975-979, 1967.
- THORPE, R. H. - The action of nisin on spoilage bacteria. I The effect of nisin on the heat resistance of *B. stearothermophilus* spores. *Applied Microbiology*, 23: 136-143, 1960
- TOMLINS, R. I. & ORDAL, Z. L. - Thermal injury and inactivation in vegetative bacteria In: SKINNER, F. A. & HUGO, W. B. (eds) *Inhibition and inactivation of vegetative microbes*. London, Academic Press, 1976.
- TRAMER, J. & FOWLER, G. G. - Estimation of nisin in foods. *Journal of Science Food and Agriculture*, 15: 522-528, 1964.
- TROLLER, J. A. - Cleaning and sanitatizing. In: STEWART, G. P.; SCHWEIGER, T. B. S. and HAWTHORN, J. (eds). *Sanitation in food processing*. New York, Food Science and Technology, cap. 5, 1983 p. 79-111.

- VAN DE VEN, J. M.; VAN DEN HOOVEN, H. W.; KONINGS, R. N. H. and HILBERTS, W. - NMR studies of lantibiotics. The structure of nisin in aqueous solution. *European Journal of Biochemistry*, 202: 1181-1188, 1991.
- VARY, J. C. & HALVORSON, H. O. - Kinetics of germination of *Bacillus* spores. *Journal of Bacteriology*, 89: 1340-1347, 1965.
- VILJOEN, J. A. - Heat resistance studies. *Journal of Infections Diseases*, 39: 286-290, 1962.
- VUYST, L. de & VANOAME, E. J. - Influence of the carbon source on nisin production in *L. Lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology*, 138: 571-578, 1992.
- WAJID, H. R. A. & KALRA, M. S. - Nisin as an aid for extending shelf life of sterilized milk. *Journal of Food Science Technology*, 12: 6-8, 1976.
- WHEATON, E. & HAYS, G. L. - Antibiotics and the control of spoilage in canned foods. *Food Technology*, 18: 147-149, 1964.
- WILLIAMS, C. C.; MERRIL, C. M. and CAMERON, E. J. - Apparatus for determination of spore-destruction rates. *Food Research*, 2: 369-375, 1937.
- YAO, M. & WALKER, H. W. - Liquid medium for production of *B. stearothermophilus*. *Applied Microbiology*, 15: 455, 1967.
- YOKOYA, F. & YORK, G. K. - Effect of several environmental conditions on the "thermal death rate" of endospores of aerobic thermophilic bacteria. *Applied Microbiology*, 13: 993-999, 1965.

8. APENDICE

FORMULAÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS:

1) Meio para Esporulação, de acordo com PFLUG (1982):

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar bacteriológico	15 g
MnSO ₄	5 ppm
H ₂ O	1000 ml

pH: 7,0 - 7,2

2) Meio para Esporulação, de acordo com KIM & NAYLOR (1966):

2.1. Meio para Pré-Esporulação:

Triptona	1,0%
Extrato de levedura	0,5%
K ₂ HPO ₄	0,2%
H ₂ O	

pH: 7,2 ± 0,1

2.2. Meio para Esporulação:

Caldo Nutriente	0,8%
Extrato de Levedura	0,4%
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	10 ppm
Agar bacteriológico	2%
H ₂ O	

pH: 7,2 ± 0,1

3) Agar Dextrose Triptona (ADT):

Triptona	10 g
Dextrose	5 g
Púrpura de bromocresol	0,04%
Agar bacteriológico	15 g
H ₂ O	1000 ml

4) Caldo Dextrose Triptona (CDT)

Triptona	10 g
Dextrose	5 g
Púrpura de bromousol	0,04%
H ₂ O	1000 ml

5) Agar Nutriente (AN)

Extrato de carne	3 g
Peptona	5 g
Agar bacteriológico	15 g
H ₂ O	1000 ml

6) Meio Mínimo para germinação e crescimento pós-germinativo de esporos de *B. stearothermophilus* de CAMPBELL Jr. et alii (1965) modificado pela adição de triptona, ácido L-glutâmico e L-lisina (MMGCp-M):

L - Arginina	10,5 mg
L - Histidina	4,5 mg
L - Leucina	19,2 mg
DL - Isoleucina	14 mg
DL - Metionina	6,0 mg
DL - Valina	14,4 mg
Glicose	400 mg
Acetato de sódio	50 mg
Na ₂ HPO ₄	250 mg
KH ₂ PO ₄	100 mg
NH ₄ Cl	100 mg
NaCl	100 mg
MgCl ₂ . 6H ₂ O	0,5 mg
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,5 mg
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,5 mg
Biotina	0,9 µg
Tiamina	15 µg
ac. nicotínico	150 mg
Triptona	1%
Acido L-glutâmico	0,144 mg/ml
L - lisina	0,162/ml
H ₂ O	100 ml

pH: 7,0 - 7,2