

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

*Este exemplar corresponde a redação final da
tese defendida por Neusely da Silva e apro-
vada pela Comissão julgadora em 04-08-88
Campinas, 04 de agosto de 1988.*

Hanks

Presidente da Banca

INFLUÊNCIA DO RESFRIAMENTO EM TORRE SOBRE A
MICROBIOTA DO CALDO DE CANA NO PROCESSO DE
PRODUÇÃO DE ALCOOL

Neusely da Silva

14188

Prof. Dr. Vanderlei Peres Canhos
Orientador

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

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr.Vanderlei Peres Canhos pela orientação e pela amizade demonstrada.

As amigas Mari, Denise, Ilse e Teresinha, pela ajuda em todos os sentidos.

Ao Sidney, da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia, por facilitar a utilização dos programas de gráficos para micro-computador.

A todos os funcionários do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, pela contribuição indireta no desenvolvimento do trabalho.

A ABIA, pelas cópias xerox.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A minha mãe.

RESUMO

Amostras de caldo de cana clarificado, pasteurizado e pré-resfriado foram coletadas na entrada e saída de uma torre de resfriamento (Modelo PV/INS 155 - Alpina S/A Ind.e Comércio) da Usina MODELO de Piracicaba - SP, no final da safra de cana de 1985.

Contagens de aeróbios em placas evidenciaram uma significativa variação no número de contaminantes do caldo durante a passagem pela torre, com elevações médias de 33 vezes nas contagens em PCA e 18 vezes nas contagens em MRS, acompanhadas de um decréscimo nos valores de pH das amostras (média de 0,35). Da população de contaminantes foram selecionadas 217 colônias, caracterizadas utilizando-se o método de replicação em placas e tubos.

A microbiota do caldo mostrou-se predominantemente bacteriana (88%) e Gram positiva (87%), sendo *Lactobacillus* o contaminante mais frequente (38%), seguido de cepas pertencentes à família *Micrococcaceae* (23%), aos gêneros *Leuconostoc* (12%) e *Bacillus* (3%) e à família *Enterobacteriaceae* (1%).

As cepas de *Lactobacillus* foram classificadas como *L. fermentum* (33%), *L.confusus* (18%), *L.viridescens* (11%) e *L.plan-tarum* (2%). As demais ficaram com a identidade provável entre *L.fermentum/L.reuteri* (15%), *L.brevis/L.buchneri* (4%), *L.fermen-tum/L.reuteri/L.brevis/L.buchneri* (7%) e 10% não foram identifi-cadas.

As cepas de *Leuconostoc* foram classificadas como *L. mesenteroides* subsp.*mesenteroides* (50%), *L. paramesenteroides* (27%) e *L. mesenteroides* subsp.*dextranicum* (23%).

Foi observado que a passagem do caldo pela torre de resfriamento provocou uma elevação significativa no número de cepas de *Leuconostoc* nas amostras (46%).

SUMMARY

Samples of clarified, pasteurized and pre-cooled sugar cane juice were collected at the entry and outlet of a cooling tower (Model PV/INS 155 - Alpina S/A Ind.e Comércio) at the MO-DELO Sugar Mill, Piracicaba - SP, during the end of sugar season of 1985.

Aerobic plate counts showed a significant variation in the number of contaminants in the cane juice after its passage through the cooling tower, with an average increase of 33 times in PCA and 18 times in MRS counts. The pH of samples decreased 0,35 with the increase of contaminants. Colonies (217) of the contaminating population were selected and characterized using the replica-plating method.

It was found that the microbial population was predominantly bacterial (88%) and Gram positive (87%). *Lactobacillus* spp were the major contaminant (38%) followed by strains of the *Micrococcaceae* family (23%), *Leuconostoc* spp (12%), *Bacillus* spp (3%) and strains of the *Enterobacteriaceae* family (1%).

The *Lactobacillus* strains were classified as *L.fermentum* (33%), *L.confusus* (18%), *L.viridescens* (11%) and *L.plantarum* (2%). The remaining strains were tentatively classified as *L.fermentum/L.reuteri* (15%), *L.brevis/L.buchneri* (4%), *L.fermentum/L.reuteri/L.brevis/L.buchneri* (7%) and 10% could not be identified.

The *Leuconostoc* strains were identified as *L.mesenteroides* subsp.*mesenteroides* (50%), *L.paramesenteroides* (27%) and *L.mesenteroides* subsp.*dextranicum* (23%).

It was found that the passage of the cane juice through the cooling tower caused an increase in the number of *Leuconostoc* strains (46%).

I N D I C E

RESUMO

SUMMARY

INDICE

INTRODUÇÃO.....	01
REVISÃO DA LITERATURA.....	08
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
1. AMOSTRAGEM.....	27
2. ENUMERAÇÃO.....	29
3. CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA.....	31
Isolamento.....	31
Purificação.....	31
Manutenção das Culturas Puras.....	32
Caracterização Preliminar das Cepas Isoladas.....	32
4. IDENTIFICAÇÃO.....	33
5. CLASSIFICAÇÃO.....	42

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
1. ENUMERAÇÃO.....	50
2. CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA.....	53
2.1. Cocos Gram Positivos.....	56
2.1.1. <i>Leuconostoc</i>	56
2.1.2. <i>Micrococcaceae</i>	59
2.2. Bastonetes Gram Positivos.....	61
2.2.1. <i>Lactobacillus</i>	61
2.2.2. <i>Bacillus</i>	67
2.3. Bastonetes Gram Negativos.....	69
3. COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA DAS AMOSTRAS.....	71
4. VARIAÇÃO DA MICROBIOTA APÓS O RESFRIAMENTO NA TORRE.....	73
5. VARIAÇÃO DA MICROBIOTA EM FUNÇÃO DO MEIO DE ISOLAMENTO....	78
CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
APÊNDICE.....	100

INTRODUÇÃO

A produção de álcool no Brasil experimentou, nos últimos dez anos, um excepcional estímulo, devido à sua utilização como combustível alternativo. Conforme se verifica em publicações da COPERSUCAR, somente nas Usinas Cooperadas o volume de produção cresceu de 0,37 bilhões de litros, na safra de 76/77, para 2,53 bilhões de litros, na safra de 82/83, representando um incremento percentual de 650%.

Segundo FINGUERUT *et al.* (1983), esse extraordinário crescimento deveu-se principalmente aos investimentos em ampliação no porte das usinas instaladas, sem alterações significativas na tecnologia utilizada para a produção.

O processo de fermentação alcoólica usado na maioria das destilarias brasileiras é o método de Melle - Boinot, baseado na alimentação semi-contínua de uma série de reatores cilíndricos aos quais se acrescenta um inóculo de leveduras proveniente de um ciclo anterior. Durante e após a alimentação, os açúcares do mosto são convertidos em álcool, dióxido de carbono e outros subprodutos, até que a fermentação seja completada. O mosto fermentado passa às separadoras centrífugas, a fase leve (vinho), rica em álcool, seguindo para a destilação e a fase pesada, (leite), rica em leveduras, sendo tratada e retornando ao ciclo anterior.

No preparo do mosto entram caldos com diferentes pontos de pré-tratamento, misturados a melaço e água. O caldo é normal-

mente clarificado, pasteurizado e, em seguida, resfriado.

Um esquema simplificado do processo de produção de álcool pode ser visto na FIGURA 1.

Nas Usinas Cooperadas da COPERSUCAR observou-se, até 1979, uma expressiva elevação no teor alcoólico dos vinhos, demonstrando que houve um aperfeiçoamento tecnológico na qualidade e controle da fermentação (FINGUERUT et.al., 1983). A partir daí, entretanto, embora o volume de álcool produzido tenha crescido continuamente, o rendimento da fermentação propriamente dita passou a apresentar uma nítida tendência para a estabilização, fato que, segundo os mesmos autores, poderia significar a existência de uma barreira tecnológica a ser superada.

Com base em tais dados, é válido supor que, sem continuar aumentando indefinidamente a capacidade volumétrica instalada, qualquer futuro ganho em produtividade só será possível a partir de amplos investimentos no desenvolvimento da tecnologia.

Para tanto, far-se-á necessária a participação da comunidade científica, em diferentes campos de pesquisa e conhecimento, para reavaliar e aperfeiçoar os diversos pontos chave do processamento, dentre os quais podem ser destacados: a qualidade e estabilidade da matéria prima; a seleção de cepas mais produtivas e resistentes às alterações ambientais; o melhor balanceamento nutricional do mosto para atender às exigências de nitrogênio, fósforo, macro e micronutrientes das leveduras; o controle cinético da fermentação (vazão, concentração do mosto, concentração do vinho em fermentação) e o rigoroso controle microbiológico do processamento, com a sistemática eliminação de con-

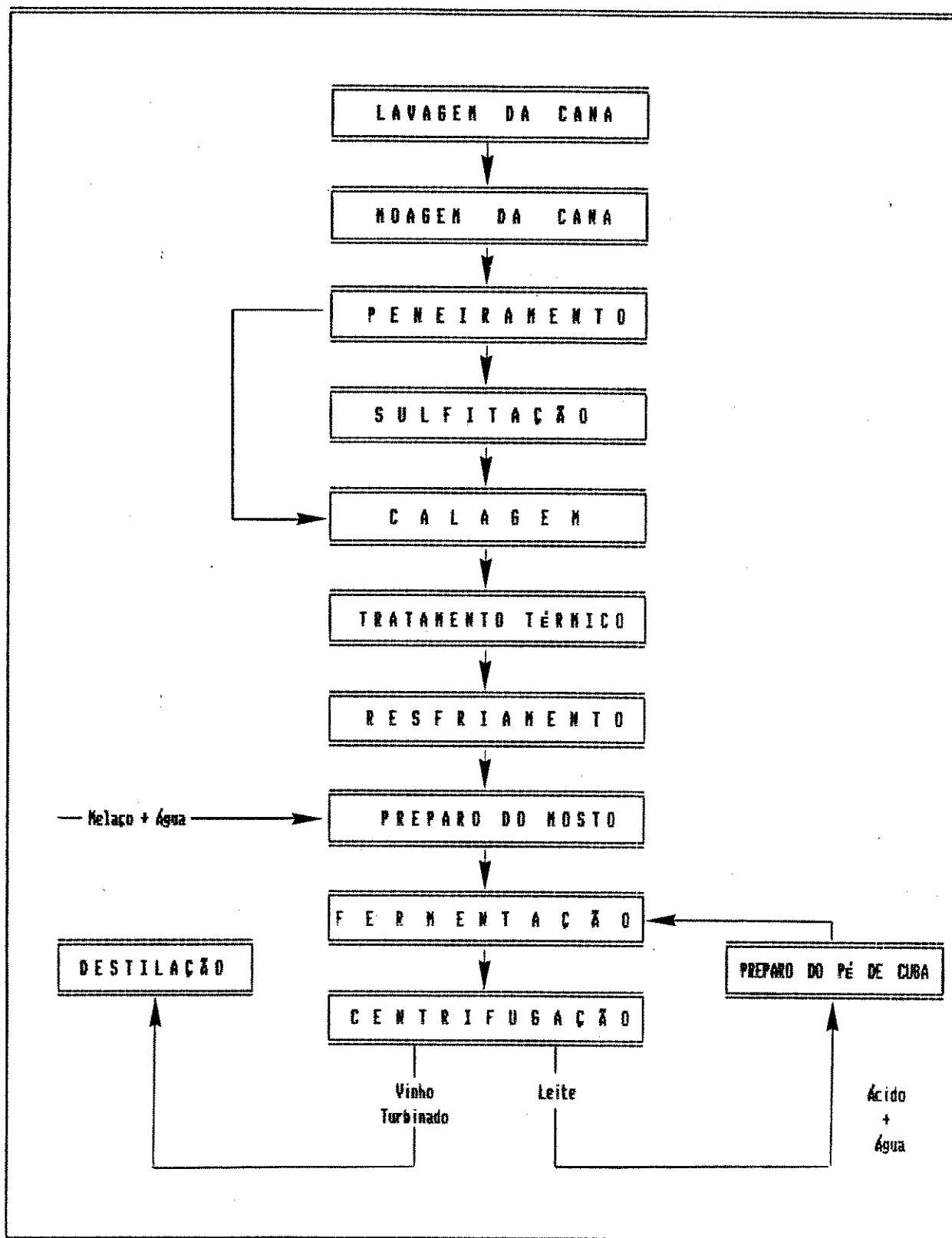


FIGURA 1. Fluxograma do Processamento de Produção de Alcool de Cana.

taminantes bacterianos, o que representará a necessidade de melhor pré-tratamento do caldo e de projetos para melhorar a qualidade sanitária de equipamentos e tubulações.

Deve-se ressaltar que muitos desses pontos já estão sendo objeto da cuidadosa atenção das usinas e centros de pesquisa e que muitas destilarias aproveitaram-se das mais recentes ampliações da capacidade instalada para introduzir, conjuntamente, alguns mecanismos de aperfeiçoamento e controle tecnológico.

Na área de controle microbiológico do processamento, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos pelo Departamento de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, pelo Departamento de Microbiologia da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello e pelo Centro de Tecnologia CO-PERSUCAR, objetivando a criação de uma metodologia sistematizada, prática e eficiente, para o rigoroso controle microbiológico do processo de produção de açúcar e álcool nas usinas brasileiras.

A preocupação com a contaminação bacteriana nos processos de fermentação alcoólica não é recente, como demonstram os inúmeros relatos sobre o assunto que acumulam-se na literatura. Os problemas com os contaminantes bacterianos não só são antigos como também persistentes - têm acompanhado sistematicamente o processo de produção de álcool, obrigando as destilarias à contínua adoção de medidas preventivas que não sempre necessárias mas nem sempre eficientes. As bactérias participam ativamente da deterioração da cana colhida, reduzindo o tempo de estocagem; introduzem no processo produtos de metabolismo indesejáveis que

tanto dificultam as etapas anteriores à fermentação como também causam alterações ambientais desfavoráveis às leveduras durante a fermentação; provocam a floculação e perda do fermento; consomem a sacarose inicialmente presente na cana, bem como os nutrientes do mosto destinados às leveduras, além de outras inúmeros problemas que, em todos os casos, reverterem em perdas no rendimento alcoólico da fermentação.

As várias etapas que compõem o processo de produção de álcool têm sido, em maior ou menor extensão, objeto de estudos microbiológicos constantes, destacando-se a deterioração da matéria prima, o desenvolvimento de goma, a qualidade do caldo em diferentes pontos de pré-tratamento e o tratamento do fermento. Diversas etapas certamente ainda exigem estudos mais rigorosos e detalhados, não tendo recebido, até o momento, a atenção que sua importância para o processo obrigatoriamente requer. Dentre elas podemos ressaltar o resfriamento do caldo, que compõe a última etapa do processamento que antecede à fermentação propriamente dita. Qualquer variação quantitativa ou qualitativa da microbiovta nesse estágio inevitavelmente refletir-se-á na fermentação imediatamente posterior.

O resfriamento do caldo pode ser feito em torres de resfriamento ou em trocadores de calor. No passado, a maioria das usinas utilizavam-se unicamente das torres para o resfriamento do caldo pasteurizado. Com a elevação da produção, os problemas de eficiência e de infecções aumentaram paralelamente, levando à sua gradativa substituição por trocadores de calor. Atualmente, com a produção crescendo continuamente, também os trocadores de

calor começam a apresentar problemas de eficiência na troca de calor e dificuldades na limpeza e desinfecção, exigindo ampliações na capacidade instalada, para atender à demanda.

Do ponto de vista de instalações industriais, um retorno à utilização das torres, em conjunto com os trocadores de calor já instalados, em lugar da instalação de novos trocadores de calor, poderia representar uma significativa economia de recursos para as destilarias; as torres apresentam baixo consumo de energia; não requerem instalações suplementares, como circuito de água de resfriamento, bombas secundárias e outros implementos necessários à instalação de trocadores de calor; limitam a manutenção e facilitam as lavagens espaçadas; são altamente duráveis e resistentes à corrosão.

A possibilidade de utilização das torres, entretanto, está subordinada à solução de um sério problema - o problema da recontaminação do caldo durante o resfriamento. No resfriamento em torres, o caldo está muito mais susceptível à recontaminações pois trata-se de um processo não asséptico.

Assim sendo, é imprescindível o desenvolvimento de projetos eficientes de sanificação para solucionar os problemas de infecções, o que exige um maior acúmulo de dados sobre os contaminantes do caldo durante a etapa de resfriamento em torres, informações que são raramente encontradas na literatura.

O objetivo do presente trabalho é efetuar um levantamento da variação quantitativa e qualitativa da microbiota do caldo de cana durante o resfriamento em torres de resfriamento.

O trabalho está engajado em um conjunto de estudos desenvolvidos pelo Departamento de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, objetivando o atendimento às necessidades da indústria de Açúcar e Alcool do Brasil, estando também engajado num projeto maior, o de servir à comunidade, princípio que sempre norteou a existência e a pesquisa na UNICAMP.

REVISÃO DA LITERATURA

A fermentação alcoólica, desde os primórdios de sua utilização para a produção de álcool, tem sido acompanhada de contaminantes indesejáveis e deletérios, responsáveis por problemas que persistem até os nossos dias.

Os relatos sobre contaminações nos processos de fermentação alcoólica remontam ao final do século passado e início desse século, com os trabalhos de PASTEUR (1873) sobre a participação das bactérias nas chamadas "doenças do vinho" e de GICHARD (1896) e MONVOISON (1910), sobre as contaminações acidentais durante a fermentação alcoólica.

A produção de álcool a partir de cana de açúcar é suscetível de frequentes e persistentes problemas com contaminantes pois a matéria prima carrega, para dentro da indústria de açúcar e álcool, uma grande quantidade de microrganismos que tanto podem fazer parte de sua flora epifítica como estar presente na terra aderida aos colmos, raízes e folhas. Canas saudáveis podem conter 10^1 a 10^8 bactérias/g e 10^1 a 10^3 fungos/g (MAYEUX, 1960; DUNCAN and COLMER, 1964).

Os microrganismos mais comumente encontrados no caule da cana são bactérias dos gêneros *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Corynebacterium* (SHEHATA, 1960; TILBURY, 1970), além de leveduras como *Torulopsis* e *Candida* (TILBURY, 1967), *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia* (BEVAN and BOND, 1971).

é interessante notar que o processo de queimar a cana, uma prática bastante comum que eleva a temperatura do caule a 55 - 85°C, parece não destruir muitas bactérias asporogêneas termossensíveis, presentes minutos após a queimada. É o caso de *Leuconostoc*, encontrado com igual frequência antes ou depois da queimada (BEVAN and BOND, 1971).

A biodeterioração da cana colhida pode elevar significativamente a população microbiana presente. TILBURY (1968) verificou que lactobacilos, leveduras e bactérias acidófilas apresentam uma relação direta entre a contagem e o tempo de estocagem da cana. As bactérias mais ativas na deterioração, segundo o mesmo autor, são lactobacilos, predominantemente *L. plantarum* e *L. casei*, como também *Leuconostoc mesenteroides*. BRUIJN (1966b) verificou que os principais produtos desenvolvidos por microrganismos que tornam a cana menos apropriada para o processamento são ácidos e polissacarídeos do tipo dextrano.

No caldo extraído da cana os microrganismos presentes podem ser originados não só da cana como também de focos de contaminação nas moendas, esteiras e outros equipamentos. O número e tipos dependem de como o processo é conduzido, bem como das condições peculiares de cada etapa, que podem selecionar o desenvolvimento de certos grupos em particular.

No caldo misto (mistura de caldos de diversas moendas) a contagem de bactérias é da ordem de 10^5 a 10^7 /ml, quando a cana é sadia. Canas doentes ou armazenadas por longos períodos de tempo originam caldos que podem apresentar contagens maiores, por volta de 10^8 bactérias/ml (SILLIKER et al., 1980).

As bactérias mais comumente encontradas no caldo misto são *Actinomyces*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Serratia* e *Streptomyces* (PEDERSON, 1938; PEDERSON and HUCKER, 1946; MacMASTER and RAVNO, 1975).

Apesar de ser um meio propício para o crescimento microbiano, nem todos os microrganismos competem bem para crescer no caldo de cana. O caldo misto, que tem Brix variando de 10 a 18, temperatura entre 25 e 30°C e pH entre 5,0 e 5,6, parece favorecer bactérias acidófilas como *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (BEVAN and BOND, 1971; SHARPE et al., 1972; TILBURY, 1975). As bactérias lácticas e particularmente *Leuconostoc mesenteroides* são as mais bem adaptadas (PEDERSON and HUCKER, 1946; MacCLESKEY et al., 1947).

A clarificação e o tratamento térmico do caldo auxiliam na eliminação de células vegetativas, embora formas termodúricas selecionadas e adaptadas ao ambiente severo das destilarias possam sobreviver, como é o caso de *Lactobacillus* (BRYAN-JONES, 1975). Esporulados dos gêneros *Bacillus* (BEVAN and BOND, 1971) e *Clostridium* (CLARK et al., 1980), igualmente podem sobreviver aos processos térmicos utilizados.

A preocupação com os contaminantes nos processos fermentativos está ligada a diversos transtornos que tais microrganismos podem provocar.

Um dos problemas mais frequentes no processo de produção de álcool de cana é a formação de goma. A presença de goma eleva a viscosidade do caldo, provocando entupimentos nas tubulações,

centrífugas e peneiras, além de dificultar diversas outras etapas do processamento (EGAN, 1965; FOSTER, 1969; TILBURY, 1975). Diversos microrganismos produtores de goma têm sido isolados do caldo de cana - *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* (DUNCAN and COLMER, 1964), *Bacillus* produtores de levano e particularmente *Leuconostoc mesenteroides* (FAVILLE, 1947; EGAN and REHBIN, 1963; EGAN, 1964/65) que produz dextrano (BRUIJN, 1966b).

Outro problema frequente na fermentação alcoólica é a floculação do fermento - formação de flocos compostos de células de leveduras e bactérias. SERRA et al. (1979) detectaram várias espécies de *Bacillus* associadas à floculação, bem como uma cepa resistente ao tratamento ácido utilizado no preparo do pé de cuba, identificada como *Sporolactobacillus*.

As fermentações acidentais, paralelas à fermentação alcoólica, também podem provocar transtornos no processamento. AMORIM et al. (1981) relatam perdas substanciais no rendimento alcoólico como consequência desse tipo de problema. As bactérias comumente associadas com fermentações acidentais são *Acetobacter* - fermentação acética (GALLI, 1961), *Lactobacillus* e *Leuconostoc* - fermentação láctica, *Clostridium* - fermentação butírica, *Bacillus* e *Enterobacter* (AMORIM e OLIVEIRA, 1982).

Na tentativa de controle de infecções na fermentação alcoólica, diversas práticas envolvendo o uso de agentes antimicrobianos vêm sendo adotadas. A aplicação de ácido sulfúrico é uma prática comum. A penicilina V ácida é comumente empregada no controle de cocos e micrococos (AMORIM e OLIVEIRA, 1982). Outros compostos testados e comumente recomendados são o pentaclorofe-

nol (GAI, 1945; BARRETO, 1949; ALMEIDA e LIMA, 1953), associações de penicilina e cloranfenicol (AQUARONE et al., 1968) e penicilina G potássica/hexaclorofeno/cloranfenicol associados (SATO et al., 1980).

Os contaminantes frequentemente encontrados em associação com a produção de álcool podem ser reunidos em 4 grupos:

1. Cocos Gram Positivos.
2. Bastonetes Gram Positivos não esporulados.
3. Bastonetes Gram Positivos esporulados.
4. Bastonetes Gram Negativos.

1. Cocos Gram Positivos

De acordo com SCHLEIFER (1986), os cocos Gram positivos incluem 15 gêneros filogenética e fenotipicamente bastante diversos, com apenas umas poucas características morfológicas (cocos Gram positivos) e fisiológicas (quimiorganotróficos, mesófilos, não esporulados) em comum.

A presença ou ausência de catalase e citocromos separa os cocos Gram positivos em dois grupos: De um lado as famílias *Micrococcaceae* (*Staphylococcus*, *Stomatococcus*, *Micrococcus* e *Planococcus*) e *Deinococcaceae* (*Deinococcus*) que possuem catalase e/ou citocromos. Por outro lado os demais, que carecem desses componentes ou exibem apenas uma fraca atividade de catalase, sem apresentar citocromos.

Os cocos catalase negativos podem ser subdivididos em dois grupos:

Um grupo que consiste dos organismos anaeróbios facultativos ou microaerófilos dos gêneros **Streptococcus**, **Leuconostoc**, **Pediococcus**, **Aerococcus** e **Gemella**.

Um grupo que consiste dos organismos estritamente anaeróbios dos gêneros **Peptococcus**, **Peptostreptococcus**, **Ruminococcus**, **Coprococcus** e **Sarcina**.

Os cocos Gram positivos frequentemente associados ao problema de contaminações no processo de produção de álcool são as bactérias pertencentes à família **Micrococcaceae** ou ao gênero **Leuconostoc**.

A família **Micrococcaceae**, de maneira geral, não forma um grupo filogeneticamente relacionado. Com base nos caracteres fenotípicos, entretanto, os gêneros apresentam uma série de similaridades úteis na identificação:

As células caracteristicamente dividem-se em mais de um plano, resultando na formação de cachos irregulares típicos dos membros da família.

A produção de pigmentos é comum, usualmente carotenóides com diversas colorações: **Planococcus** pode desenvolver colônias amarelas ou laranja; **Micrococcus** produz carotenóides, com cores variando de amarelo a laranja ou vermelho; **Staphylococcus** pode desenvolver colônias branco-amareladas, amarelas e laranjas.

Os membros da família **Micrococcaceae** são quimiorganotróficos, com metabolismo respiratório e/ou fermentativo. Dois gêneros, **Planococcus** e **Micrococcus** (exceto **Micrococcus kristinae**)

são estritamente aeróbios. *Stomatococcus* e *Staphylococcus* (exceto *Staphylococcus saccharolyticus*) são anaeróbios facultativos.

Micrococcus oxida compostos de carbono a dióxido de carbono e água - glucose é metabolizada pela via da exose monofosfato e ciclo do ácido tricarboxílico. O ciclo glicolítico só funciona sob condições aeróbias.

Seus requerimentos nutricionais são variáveis, cresce em 5% de NaCl e a temperatura ótima para crescimento está entre 25 e 37°C. Diversas linhagens podem apresentar amilases e gelatinases, mas não produz lecitinases e hemolisinas.

Têm sido primariamente isolados da pele de mamíferos, incluindo o homem, de onde podem atingir diferentes produtos. Seu habitat secundário são carne e produtos cárneos, produtos lácteos, solo e água.

Staphylococcus exibe metabolismo respiratório e fermentativo mas o crescimento é mais rápido sob aerobiose. Diversos carboidratos podem ser utilizados com produção de ácido e, para muitas linhagens, o principal produto de fermentação da glucose é ácido láctico, através da via Embden-Meyerhof. Na presença de oxigênio os produtos finais são ácido acético e dióxido de carbono. Os requerimentos nutricionais são variáveis e uracil e/ou um carboidrato fermentescível podem ser requeridos para crescer anaeróbiamente. Muitas linhagens crescem na presença de 10% de NaCl e entre 18 e 40°C. Diversas produzem proteases, lipases, deoxirribonucleases (DNases) e lecitinases. Algumas apresentam coagulases e hemolisinas.

Têm sido isolados de uma variedade de produtos animais (carne, leite e queijos, por exemplo) e de fontes ambientais como ar, água, solo, areia e poeira. Diversas linhagens são patógenos oportunistas do homem e/ou animais.

Os cocos catalase negativos anaeróbios facultativos ou microaerófilos incluem quatro importantes gêneros de bactérias lácticas que podem ser distinguidos com base nos produtos finais de fermentação: *Streptococcus* apresenta fermentação homolática, *Pediococcus* fermenta glucose a ácido láctico provavelmente pela via Embden-Meyerhof e *Aerococcus* (bem como *Gemella*) produzem ácido a partir de carboidratos. Caracteristicamente, nenhum produz dióxido de carbono a partir de glucose, o que os diferencia de *Leuconostoc* que fermenta glucose com produção de gás carbônico.

Segundo GARVIE(1986), os cocos do gênero *Leuconostoc* são imóveis, não esporulados e ocorrem usualmente aos pares ou cadeias. A morfologia da célula pode ser afetada pelas condições de crescimento, tendendo a formas alongadas, bastonetiformes, quando cresce em meios líquidos. O crescimento em meio líquido geralmente apresenta turbidez uniforme com sedimento liso no fundo dos tubos.

O crescimento de *Leuconostoc* nunca é rápido. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, que tem o menor tempo de geração, pode crescer em 24 horas a 30°C mas subspécies como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, por exemplo, podem requerer 48 horas de incubação e preferem 22°C à 30°C. *Leuconostoc oenos* cresce melhor em pH 4,2-4,8 com adição de suco de tomate,

requerendo 5 a 7 dias de incubação a 22°C. Dessa forma, as colônias de *Leuconostoc* em meios sólidos são pequenas, geralmente menores que 1 mm em diâmetro. O crescimento é favorecido por condições microaerófilas, com temperatura ótima variando entre 20 e 30°C.

O crescimento de *Leuconostoc* é sempre dependente de um carboidrato fermentescível - todos fermentam glucose e, com exceção de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, todos preferem frutose. A glucose é fermentada por uma combinação das vias hexose monofosfato e fosfocetolase, resultando em etanol, ácido láctico e dióxido de carbono (Heterofermentação).

Leuconostoc exige meios ricos para crescimento, requerendo complexos fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas. Leite é um meio pobre para *Leuconostoc* e, embora *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* normalmente acidifique e coagule o leite, as outras linhagens são menos ativas ou inativas em leite. Caseína não é digerida e ainda, segundo GARVIE(1960), litmus não é reduzido em litmus milk.

A classificação de *Leuconostoc* a nível de espécies baseia-se particularmente na capacidade de produzir dextrano a partir de sacarose e na fermentação de carboidratos diversos.

Leuconostoc mesenteroides inclui três subspécies, duas dextrano formadoras - subsp. *mesenteroides* e subsp. *dextranicum* e a terceira, subsp. *cremoris*, não produz dextrano.

As duas linhagens dextrano formadoras são estreitamente relacionadas e difíceis de serem diferenciadas com base em caracteres fenotípicos. De maneira geral, a subsp. *mesenteroides*

é mais ativa na produção de dextrano e o crescimento a 20-25°C pode favorecer a formação da goma.

A formação de goma parece oferecer uma certa proteção às linhagens produtoras de dextrano pois a subsp. *mesenteroides*, que não sobrevive a tratamento térmico brando como 30 minutos a 55°C em caldo glucose, pode suportar 80-85°C em soluções de açúcares viscosas, que contenham goma (GARVIE, 1986).

Leuconostoc paramesenteroides, embora não produza dextrano, é também fenotipicamente muito semelhante às linhagens formadoras de dextrano. De maneira geral, *L. paramesenteroides* é mais tolerante a altos teores de NaCl do que as outras linhagens de *Leuconostoc*.

2. Bastonetes Gram Positivos não Esporulados

De acordo com KANDLER and WEISS (1986), o grupo dos bastonetes Gram positivos não esporulados inclui sete gêneros muito diferenciados que têm apenas umas poucas características morfológicas (bastonetes Gram positivos não esporulados) e fisiológicas (mesófilos, quimiorganotróficos, só crescem em meios complexos) em comum.

Metabolicamente, os sete gêneros podem ser divididos em três grupos:

Um grupo que consiste de dois gêneros - *Lactobacillus* e *Erysipelothrix* - fermentativos, sacarolíticos, microaerófilos, não possuem heme-catalase, citocromos ou menaquinonas. Utilizam oxigênio apenas via oxidases flavínicas ou peroxidases.

Um grupo que consiste de dois gêneros - **Brochothrix** e **Listeria** - aeróbios ou anaeróbios facultativos, possuem cofatores e enzimas para a respiração e também são capazes de fermentar açúcares sob limitação ou ausência de oxigênio. Catalase positivos.

Um grupo que consiste de três gêneros - **Kurtia**, **Caryophanon** e **Renibacterium** - estritamente aeróbios, não utilizam glicose como fonte de carbono ou energia nem fermentam açúcares a ácidos orgânicos. Catalase positivos.

Os bastonetes Gram positivos não esporulados frequentemente associados ao processo de fermentação alcoólica são as bactérias pertencentes ao grande gênero **Lactobacillus**, que compreende cerca de 50 espécies.

Microaerófilo, o crescimento de **Lactobacillus** em superfície de meios sólidos é pobre, produzindo colônias pequenas, com 2 a 5 mm em diâmetro. São colônias circulares, com margens perfeitas, convexas e raramente pigmentadas (amareladas quando ocorre pigmentação). O crescimento em meio líquido produz turbidez uniforme e sedimento liso (raramente granular ou mucóide). Nunca forma película.

Seu metabolismo fermentativo é sempre dependente de um carboidrato fermentescível. Duas vias metabólicas podem ser utilizadas para fermentação de hexoses - as linhagens homofermentativas utilizam a via Embden-Meyerhof e as linhagens heterofermentativas utilizam a via do 6-fosfogluconato. Um grupo de lactobacilos homofermentativos, tradicionalmente chamado "Streptobactéria" (ORLA-JENSEN, 1919), possuem uma fosfocetolase indutí-

vel cujos indutores são pentoses. Esse grupo é capaz de fermentar pentoses por essa via, enquanto as hexoses são metabolizadas pela via Embden-Meyerhof.

Os lactobacilos são muito exigentes nutricionalmente e os requerimentos para aminoácidos, peptídeos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, etc. são complexos e característicos de cada espécie.

A classificação de *Lactobacillus* a nível de espécies baseia-se particularmente no tipo metabólico (Homo ou Heterofermentativo), nas temperaturas máxima e mínima de crescimento (45 e 15°C) e na fermentação de diversos carboidratos.

Com base no tipo metabólico, lactobacilos podem ser agrupados em três grandes grupos:

Grupo I. Obrigatoriamente homofermentativos, hexoses são fermentadas exclusivamente pela via Embden-Meyerhof, resultando em ácido láctico. Pentoses e gluconato não são fermentados.

Grupo II. Heterofermentativos facultativos, hexoses fermentadas pela via Embden-Meyerhof, resultando em ácido láctico. Sob limitação de glucose, para muitas linhagens, pode resultar em ácido láctico, ácido acético, etanol e ácido fórmico. Pentoses são fermentadas a ácido láctico e acético via fosfocetolase indutível.

Grupo III. Obrigatoriamente heterofermentativos, hexoses são fermentadas a ácido láctico, ácido acético (ou etanol) e dióxido de carbono pela via do 6-fosfogluconato. Pentoses fermentadas a ácido láctico e acético.

A morfologia das células de **Lactobacillus** é muito variada, desde longos bastonetes retos ou encurvados até cocobacilos que podem ser tão pequenos que chegam a ser confundidos com estreptococos ou **Leuconostoc** (como por exemplo **Lactobacillus confusus**, originalmente considerado como **Leuconostoc**). São raramente móveis. Grânulos internos são comuns, formando corpos bipolares que provavelmente contém polifosfatos, observados na coloração de Gram ou com azul de metileno.

Goma extracelular é produzida em grande quantidade, a partir de sacarose, por **Lactobacillus confusus** e por algumas linhagens particulares de espécies heterofermentativas (SHARPE et al., 1972). Colônias tipicamente mucóides, entretanto, são desenvolvidas apenas por **Lactobacillus confusus** (KANDLER and WEISS, 1986).

Lactobacillus cresce bem em meios levemente ácidos, com pH inicial entre 4,5 e 6,5. São acidúricos ou acidófilos e o pH mínimo para inibir o crescimento varia com as espécies e linhagens. Geralmente o crescimento é inibido a valores de pH abaixo de 3,6-4,0.

A maioria dos lactobacilos cresce melhor a temperaturas mesófilas, com máximo próximo a 40°C. Diversas linhagens, entretanto, são termodúricas e podem apresentar máximo perto de 55°C. Termófilos estritos, que cresçam apenas acima de 55°C não são conhecidos.

Crescendo sob anaerobiose ou redução de oxigênio, acidúricos ou acidófilos capazes de reduzir o pH a aproximadamente 4,0, o que inibe o crescimento de praticamente todos os competi-

dores exceto outras bactérias lácticas e leveduras, os lactobacilos podem habitar diversos ambientes providos dos fatores de crescimento necessários. Têm sido isolados do trato intestinal do homem e animais e de diversos alimentos de origem vegetal e animal. Na superfície de plantas ocorrem em baixos números mas crescem luxuriosamente em matéria vegetal decomposta, principalmente frutas. *Lactobacillus fructivorans* e *Lactobacillus hilgardii* (FORNACHON et al., 1949) são típicos de bebidas alcoólicas ácidas. *Lactobacillus collinoides* (CARR and DAVIES, 1970) é encontrados em cidra e outros sucos de frutas.

Leite não contém normalmente lactobacilos, mas pode vir a ser contaminado pela poeira e utensílios. Entretanto, como estreptococos crescem rapidamente em leite, o número de lactobacilos permanece geralmente baixo em leite fermentado espontaneamente. Somente após longos períodos de incubação lactobacilos podem predominar, devido à sua alta tolerância a acidez. A espécie tipicamente encontrada em leite é *Lactobacillus helveticus*, uma das espécies mais ácido tolerantes. É utilizado como coalho na produção de queijos tipo Suíço, Grana, Gorgonzola e Parmesão (BOTTAZZI et al., 1973). Atualmente *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e subsp. *lactis* estão sendo também utilizados (BIEDE et al., 1976; AUCLAIR and ACCOLAS, 1983). Nos queijos com maiores períodos de maturação, acima de 14 dias, outras linhagens de lactobacilos, como *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei*, originários do leite ou do ambiente, podem atingir níveis mais altos (SHARPE, 1962; ABO ELNAGA and KANDLER, 1965; vanKERKEN and KANDLER, 1966). Na fabricação de iogurte a linhagem

utilizada é *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, desenvolvida para a produção de leite fermentado (DAVIS, 1975).

Em carnes e produtos cárneos, lactobacilos desempenham um importante papel na produção de embutidos fermentados contendo sacarose. As espécies comumente encontradas são *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus viridescens*, o último conhecido por provocar esverdeamento em produtos cárneos sob refrigeração (NIVEN and EVANS, 1957).

O trato intestinal abriga muitas espécies de *Lactobacillus*, sendo *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus fermentum* as mais proeminentes. *Lactobacillus reuteri* é comum nas fezes de ratos.

3. Bastonetes Gram Positivos Esporulados

De acordo com SNEATH (1986), as bactérias formadoras de esporos são, em sua maioria, bastonetes Gram positivos dos gêneros *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, *Clostridium* e *Desulfotomaculum*. Algumas formas filamentosas ramificadas, morfologicamente similares aos estreptomicetos são capazes de produzir esporos, como as bactérias pertencentes aos gêneros *Thermoactinomyces* e *Pasteuria*.

Outros microrganismos têm demonstrado, em estudos morfológicos, possuir esporos. Os mais conhecidos são *Oscillospira*, *Sporopirillum* (DELAPORTE, 1964a) e *Fusosporus* (DELAPORTE, 1964b, 1969).

As relações taxonômicas entre as bactérias esporuladas são ainda incertas. Evidências demonstram que *Bacillus* e *Clostridium* pertencem a um ramo maior de procariotos que também pode conter gêneros como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Acetobacterium*, *Sarcina* e, provavelmente, os micoplasmas (STACKEBRANDT and WOESE, 1981; KANDLER, 1982). Com base nos estudos em desenvolvimento, parece emergir um quadro demonstrativo de que as formas esporuladas pertencem a um ramo distinto de bactérias mas que esse ramo também contém gêneros que não formam esporos. Se a corrente ênfase na esporulação e morfologia da célula for descontada, a semelhança entre espécies de *Bacillus*/*Sporosarcina*/*Planococcus* ou entre *Bacillus*/*Sporolactobacillus*/*Lactobacillus* é enorme.

A diferenciação entre os bastonetes Gram positivos esporulados é feita com base em alguns poucos caracteres fenotípicos:

Bastonetes aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase usualmente positivos - *Bacillus*.

Bastonetes microaerófilos, catalase negativos - *Sporolactobacillus*.

Bastonetes anaeróbios que não reduzem sulfato a sulfito - *Clostridium*.

Bastonetes anaeróbios que reduzem sulfato a sulfito - *Desulfotomaculum*.

Os esporulados comumente associados com contaminações nos processos de fermentação alcoólica são bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Sporolactobacillus* e *Clostridium*.

Sporolactobacillus foi originariamente designado como um sub-gênero dentro do gênero **Lactobacillus** (KITAHARA and SUZUKI, 1963) devido ao seu metabolismo homofermentativo e reação de catalase negativa. **Sporolactobacillus**, entretanto, é bem menos exigente nutricionalmente do que **Lactobacillus**, além de apresentar motilidade e produzir esporos. KITAHARA and LAI (1967) elevaram esse grupo ao nível de gênero e KITAHARA and TOYOTA (1972) transferiram-no para a família **Bacillaceae**. OKADA et al. (1976) sugeriram que, dada sua similaridade fenotípica tanto com **Bacillus** como com **Lactobacillus**, **Sporolactobacillus** constituiria um gênero intermediário entre os outros dois.

Clostridium e **Bacillus** são fenotípica e genotipicamente bastante diferenciados - **Clostridium** forma um sub-ramo de microrganismos anaeróbios estritos relacionado com **Peptococcus**, **Peptostreptococcus** e **Ruminococcus**.

Segundo CLAUS and BERKELEY (1986), os bastonetes do gênero **Bacillus** são Gram positivos nos estágios iniciais de crescimento; em estágios mais avançados a reação pode variar chegando a apresentar-se Gram negativa. As células podem mostrar-se isoladas ou em cadeias.

A forma dos endosporos de **Bacillus** (cilíndrico, elipsoidal, oval ou esférico) e sua localização no interior da célula (central, paracentral, subterminal, terminal ou lateral) são características de cada espécie.

Cápsulas de polissacarídeos como dextrano, levano ou outro polissacarídeo complexo, podem ser sintetizadas por algumas linhagens, sob diversas condições.

A produção de pigmentos pode ocorrer, com cores variando de preto a castanho e vermelho e de amarelo a laranja. Os pigmentos não são produzidos em qualquer meio e essa característica pode perder-se facilmente durante transferências seriadas (GORDON et al., 1973).

A aparência das colônias de *Bacillus* em meios sólidos varia grandemente com as condições ambientais. Os requerimentos nutricionais da maioria das linhagens são pequenos, crescendo satisfatoriamente em Agar Nutriente.

4. Bastonetes Gram Negativos

As bactérias Gram negativas constituem um grupo de microrganismos enormemente diferenciados, com mais de 120 gêneros agrupados em tribos e famílias. Com base na morfologia celular e requerimento de oxigênio para crescimento, dois grandes grupos de Gram negativos destacam-se:

Os Bastonetes Gram negativos estritamente aeróbios.

Os Bastonetes Gram negativos anaeróbios facultativos.

O grupo de bastonetes Gram negativos anaeróbios facultativos compõe-se de 3 famílias que podem ser diferenciadas com base em algumas poucas características fenotípicas como motilidade e reação de oxidase.

Oxidase negativa, motilidade usualmente positiva por flagelo peritríqueo - *Enterobacteriaceae*.

Oxidase positiva, motilidade positiva por flagelo polar, bastonetes que podem apresentar-se curvos - *Vibrionaceae*.

Oxidase positiva, motilidade negativa - **Pasteurellaceae**.

Os bastonetes Gram negativos normalmente associados à produção de álcool são as bactérias pertencentes à família **Enterobacteriaceae**.

De acordo com BRENNER (1984), a família **Enterobacteriaceae** é composta por 20 gêneros de bactérias Gram negativas que exibem enorme heterogeneidade em sua ecologia, patogenicidade potencial e variação de hospedeiros. A delimitação taxonômica de seus membros para os membros de outras famílias é completa, salvo algumas raras exceções. São amplamente distribuídos no ambiente, encontrados no solo, água, frutas, vegetais, grãos, plantas, animais, insetos e no homem.

Enterobacteriaceae são quimiorganotróficos, exibindo metabolismo respiratório e fermentativo. Ácido e frequentemente gás visível são produzidos a partir da fermentação de glucose e outros carboidratos. Reação de catalase positiva, com raras exceções.

MATERIAL E MÉTODOS

1. AMOSTRAGEM

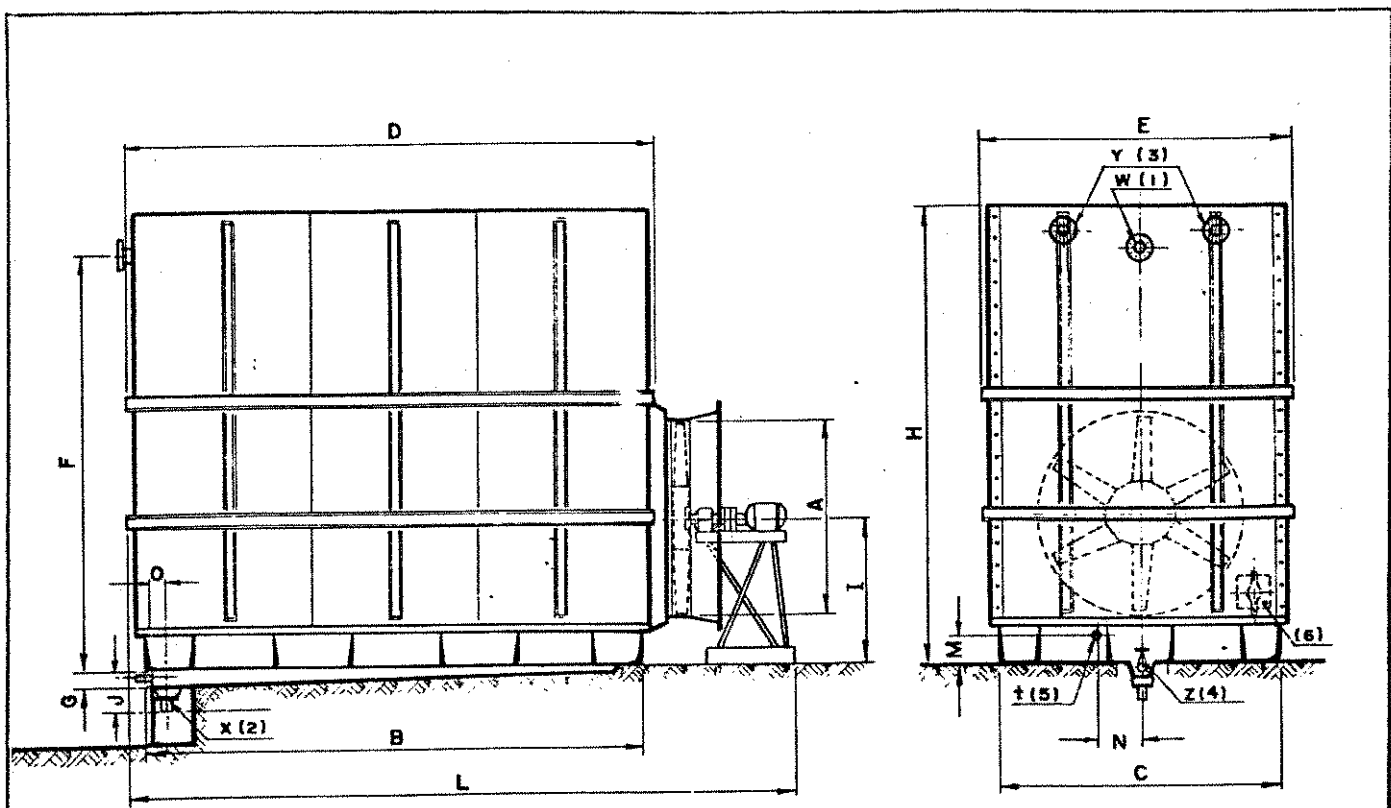
As amostras de caldo de cana utilizadas para o desenvolvimento do trabalho foram coletadas no final da safra de cana de açúcar de 1985, na Usina MODELO, de Piracicaba - SP.

A amostragem visou as etapas imediatamente anterior e imediatamente posterior ao resfriamento em torre - foram coletadas, na entrada da torre, 6 amostras de caldo de cana clarificado e pasteurizado, provenientes do pré-resfriamento em trocadores de calor e, na saída da torre, 6 amostras de caldo resfriado, destinado ao preparo do mosto para a fermentação.

Um desenho esquemático da torre de resfriamento da usina MODELO e dos pontos de onde foram recolhidas as amostras encontra-se na FIGURA 2.

Trata-se de um resfriador de caldo Modelo PV/INS 155, fabricado pela ALPINA S/A Indústria e Comércio, com carcaça em poliéster fibra de vidro, nas dimensões 5,31 x 3,01 x 4,90 metros. O caldo proveniente dos trocadores de calor é injetado na torre através de pulverizadores de bronze, com pressão de 10 m CA. O resfriamento é feito com o auxílio de um ventilador axial de fibra de vidro, com 2,15 metros de diâmetro e as perdas por arraste são minimizadas por eliminadores de gotas.

A lavagem da torre é feita a intervalos de 14 horas, com água a aproximadamente 90°C, proveniente de uma linha pressuri-



MODELO PV/HIS	DIMENSÕES (mm)															CONEXÕES		MOTOR		PESOS (kg)		Volume de Embarque (m ³)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M	N	O	(1) W	(2) X	CV	Polos	Embarque	Operação		
100	2150	3550	3010	3980	3440	4500	150	4900	1650	350	5320	320	500	160	4"	4"	15,0	4	1300	8500	22	
125	2150	4250	3010	4680	3440	4500	150	4900	1650	370	6020	320	500	180	5"	5"	20,0	4	1600	9500	25	
155	2150	5310	3010	5740	3440	4500	150	4900	1650	370	7080	320	500	180	5"	5"	20,0	4	2000	10.500	27	
200	2500	5310	3850	5740	4260	4500	150	4900	1825	370	7080	320	700	180	5"	5"	25,0	4	2300	13000	30	

OBSERVAÇÕES GERAIS

1. W = ENTRADA DE CALDO QUENTE
2. X = SAÍDA DE CALDO FRIO
3. Y = ENTRADA DE ÁGUA DE LAVAGEM

4. Z = DRENAGEM $\phi = 1 1/2"$

5. T = CONEXÃO DE TRANSBORDO $\phi 2"$

6. POSTIGO DE INSPEÇÃO

FIGURA 2. DESENHO ESQUEMÁTICO DA TORRE DE RESFRIAMENTO DA USINA MODELO.

zada de água quente que circula na torre por comando de válvulas. Após a limpeza, a água é drenada e o fluxo de caldo reiniciado. A amostragem foi feita em dois momentos de funcionamento da torre - 15 minutos após o reinício do fluxo de caldo (amostras de tempo zero) e 60 minutos depois das amostras de tempo zero (amostras de tempo 60).

As análises a que foram submetidas as amostras coletadas, bem como as técnicas utilizadas para o isolamento, purificação, preservação e caracterização inicial das cepas isoladas, encontram-se esquematizadas na FIGURA 3.

Após a coleta, foi determinada a temperatura das amostras que, acondicionadas em frascos estéreis, foram imediatamente transportadas para o laboratório, em recipientes de isopor com gelo picado.

No laboratório, foi assépticamente separada uma alíquota de cada amostra para determinação do pH, passando-se então aos procedimentos para enumeração da microbiota presente.

2. ENUMERAÇÃO

As amostras foram submetidas a diluições seriadas e as diluições 10^{-5} - 10^{-6} e 10^{-7} foram plaqueadas em profundidade, para enumeração pelo método de contagem em placas descrito por SPECK (1978).

Para contagem total de aeróbios foi usado PCA (Plate Count Agar - BBL 11638), segundo recomendação de SPECK (1978). Adicionalmente, como esperava-se uma significativa incidência

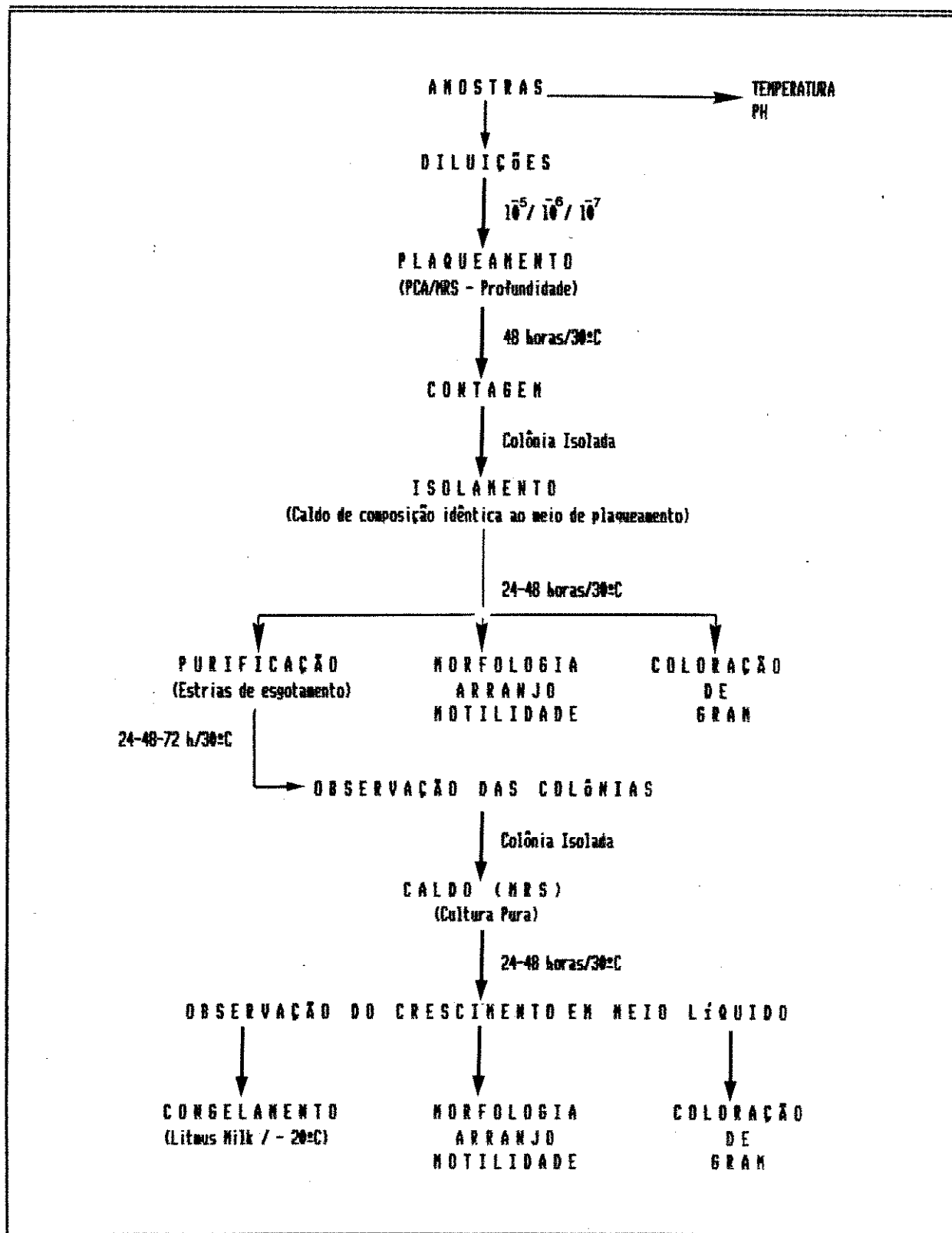


FIGURA 3. Esquema do trabalho desenvolvido para o tratamento das amostras e caracterização preliminar das cepas isoladas.

de bactérias lácticas no caldo pasteurizado, particularmente lactobacilos termodúricos, o meio não seletivo MRS Agar (de Man, Rogosa and Sharpe - MRS Bouillon - MERCK 10661) foi utilizado para contagem de bactérias lácticas, conforme indicação de SPECK (1978).

As placas, em duplicata, foram incubadas a 30°C e as colônias foram contadas após 48 horas de incubação.

3. CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA

Isolamento - Com palitos estéreis, colônias das diversas placas de contagem foram assépticamente transferidas para caldo de composição idêntica ao meio de origem. As colônias foram selecionadas de forma a compor uma amostragem estatisticamente representativa da microbiota contaminante do caldo nas amostras examinadas - para cada amostra plaqueada, foram tomadas todas as colônias desenvolvidas nas placas de maior diluição, tanto de PCA como de MRS. No caso de um número excessivo de colônias, as placas foram divididas em dois ou quatro campos e tomadas todas as colônias de um mesmo campo.

As culturas foram incubadas a 30°C por 24-48 horas.

Purificação - As culturas em caldo foram reinoculadas em agar de composição idêntica ao meio de origem, pelo método de estrias de esgotamento. A incubação foi feita a 30°C por 24-48 horas e colônias isoladas foram transferidas para caldo MRS.

Manutenção das culturas puras - As culturas em fase estacionária de crescimento foram inoculadas em Litmus Milk (DIFCO 0107) e congeladas para posterior liofilização. Durante os meses de trabalho no laboratório, para curtos períodos de preservação, as cepas foram inoculadas em MRS Agar, incubadas até crescimento visível e estocadas a 4°C por 15 dias.

Caracterização preliminar das cepas isoladas - Foi feita com base nos resultados da verificação das características de crescimento em meios líquidos e sólidos, bem como na determinação da morfologia, arranjo, Gram e motilidade.

Na verificação do crescimento em meio líquido (MRS) foram observadas as seguintes características, de acordo com descrição de PELCZAR JR.(1957): tipo de sedimento formado (liso, mucóide, floculento), turvação ou ausência de turvação do meio e desenvolvimento ou não desenvolvimento de película superficial e suas características, quando presente (lisa, mucóide, rugosa).

Na verificação do crescimento em meios sólidos (PCA ou MRS) foram observadas as seguintes características das colônias, de acordo com descrição de PELCZAR JR.(1957): forma (puntiforme, circular, filamentosa, irregular), elevação (plana, elevada, convexa, pulvinada, umbunada), margem (perfeita, ondulada, rizóide), diâmetro (com 24, 48 e 72 horas de incubação) e pigmentação.

As características de morfologia e arranjo das células, bem como a motilidade, foram verificadas em montagens úmidas a partir de culturas com 24 horas de crescimento em caldo MRS. A

motilidade foi posteriormente confirmada em meio semi-sólido, na realização do teste de Oxidação/Fermentação de glucose. A morfologia e o arranjo foram confirmados nos esfregaços corados para reação de Gram, a partir de culturas com 24 horas de crescimento em PCA ou MRS.

4. IDENTIFICAÇÃO

Para a realização dos testes necessários à identificação das cepas isoladas, foi utilizado o método de replicação múltipla descrito por CANHOS (1980).

O método envolveu a replicação simultânea de 20 culturas contidas em uma placa mestra previamente preparada, com o auxílio de um replicador, para placas e tubos contendo os meios teste (FIGURA 4).

Para a replicação em tubos foram utilizadas estantes de alumínio construídas de forma a poder acomodar os tubos de ensaio nas posições das agulhas do replicador (FIGURA 5). Os diferentes meios, previamente esterilizados, foram assépticamente distribuídos nos tubos com um dispensador (Dispensate tipo Oxford) que permitiu a distribuição de volumes constantes de 1 a 10 ml de líquido (FIGURA 6).

Para cada grupo de 20 culturas, foram preparadas duas placas de MRS Agar que, após a exclusão da umidade superficial, foram marcadas com o replicador para a preparação das placas mestras. As culturas em caldo foram inoculadas nas placas mestras, em duplicata, com o auxílio de palitos estéreis.

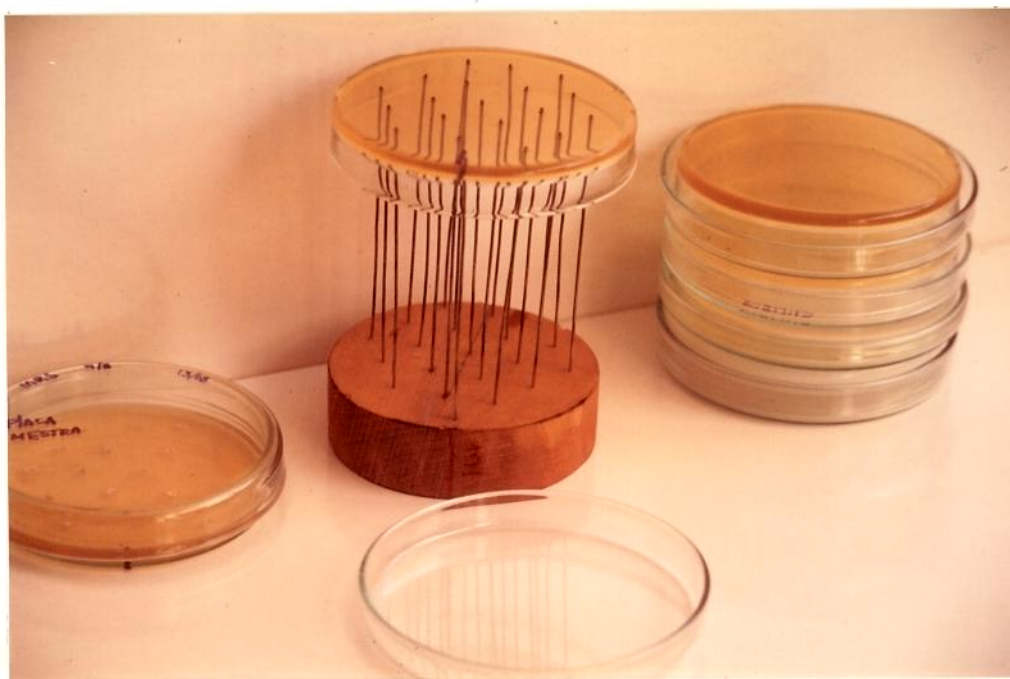


FIGURA 4. Detalhe do replicador múltiplo e da replicação em placas.

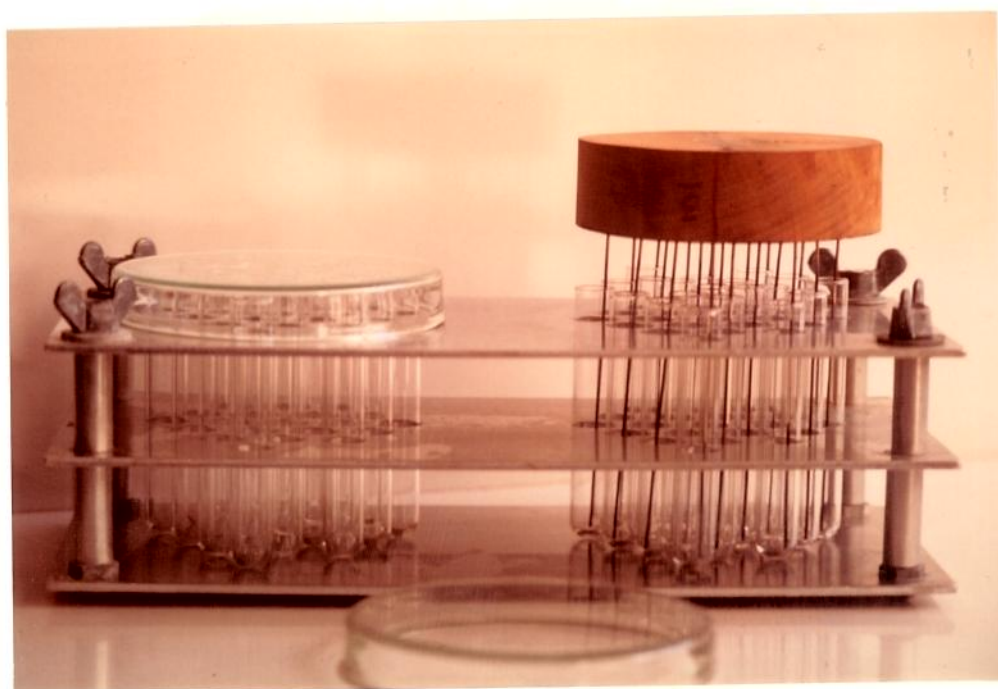


FIGURA 5. Detalhe da estante de alumínio e da replicação em tubos.



=====

FIGURA 6. Detalhe do "Dispensate" tipo Oxford e da distribuição dos meios para os tubos de ensaio.

Todo o trabalho foi desenvolvido em câmara de fluxo laminar (Veco).

As placas em duplicata foram incubadas a 30°C até crescimento visível e, de cada par de placas mestras preparadas, uma foi selada com fita adesiva e estocada a 4°C, para ser utilizada na repicagem das culturas, quinze dias depois. Essas placas não foram manuseadas até o momento de sua utilização.

A outra placa de cada par foi utilizada na replicação das culturas para os meios teste, na realização das provas bioquímicas que encontram-se sumarizadas na FIGURA 7 e descritas a seguir.

Teste de Catalase - Foi realizado de acordo com metodologia descrita por MacFADDIN (1980), após 24 horas de incubação das culturas a 30°C em PCA.

Formação de esporos - a capacidade de formar esporos foi verificada em esfregaços corados de acordo com o método descrito por FIELDS (1975), após 1 a 30 dias de incubação a 30°C em Sporulating Agar (DIFCO 0582).

Crescimento em 6,5 e 7,5% NaCl - Foi verificado em Triplicase Soy Agar (BBL 11043), recomendado por EISENBERG and EVANS (1963) e IANDOLO (1964). O meio contém 0,5% de NaCl; a quantidade adicional foi acrescentada. As placas foram incubadas a 30°C e o resultado foi considerado positivo com 24-48 horas de incubação, negativo com 72 horas.

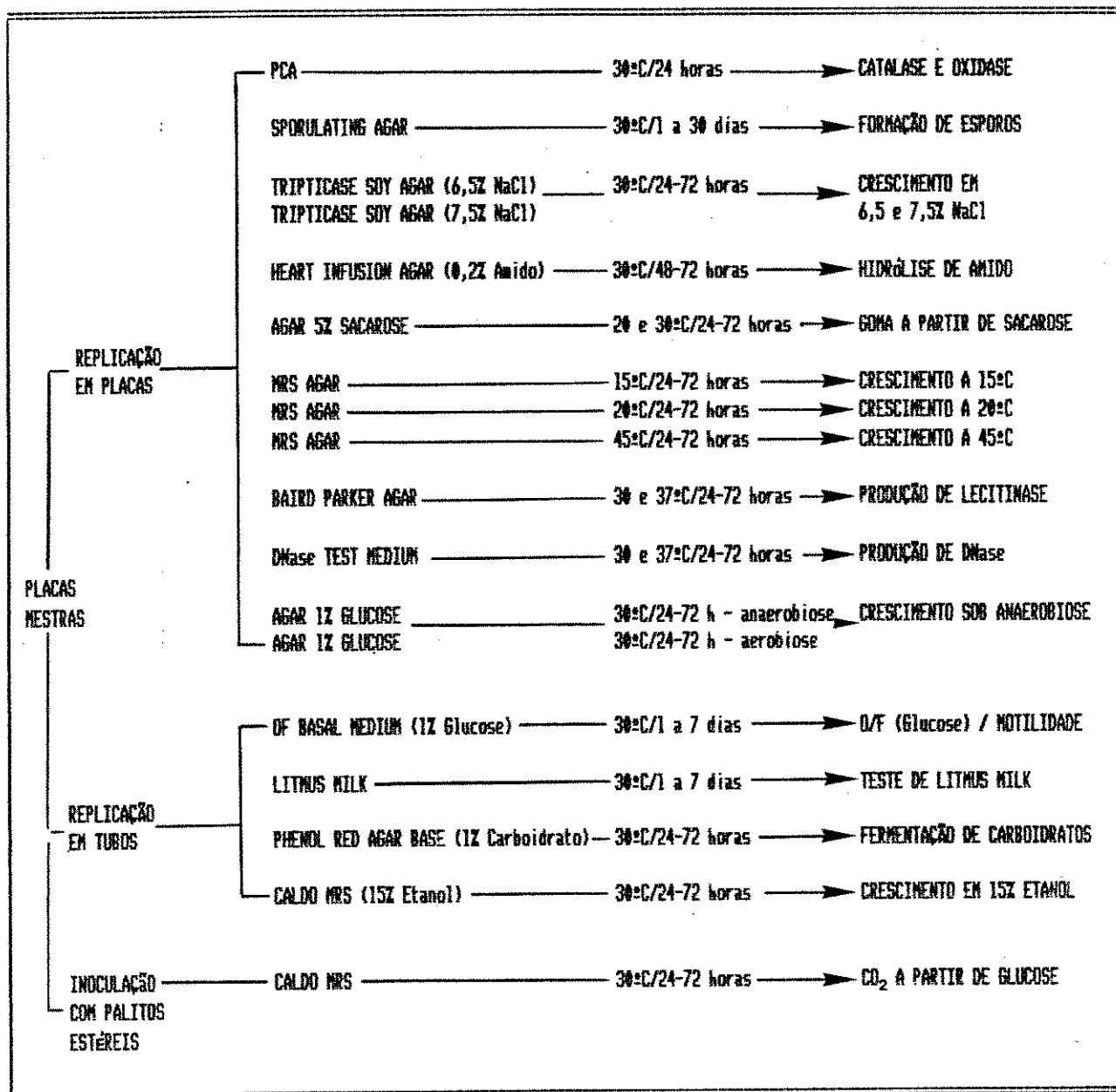


FIGURA 7. Testes Morfológicos e Bioquímicos realizados para a identificação das cepas isoladas.

Hidrólise de amido - A produção de amilases foi verificada obedecendo a metodologia descrita por MacFADDIN(1980), após 48 horas de incubação a 30°C em Heart Infusion Agar (DIFCO 044) com 0,2% de amido.

Produção de goma a partir de sacarose - A capacidade de formação de goma a partir de sacarose foi verificada no meio descrito por GARVIE (1960). As culturas foram incubadas a 30°C e também a 20°C, para favorecer as cepas de *Leuconostoc* que preferem baixas temperaturas. Foi considerado resultado fortemente positivo a produção de grandes colônias mucóides com 24 horas de incubação a 20 e/ou 30°C; resultado positivo a formação de colônias mucóides relativamente menores, nas mesmas condições e resultado negativo a formação de colônias não mucóides após 72 horas de incubação.

Crescimento a 15 - 20 e 45°C - O crescimento a 15°C, 20°C e 45°C foi verificado em MRS Agar, com resultado considerado positivo após 24-48 horas de incubação e negativo com 72 horas. Todos os resultados negativos em agar foram confirmados em caldo MRS.

Formação de Lecitinasas - A verificação da produção de lecitinase foi feita em Baird Parker Agar, de acordo com o método descrito por SPECK (1978), para diferenciação e confirmação de *Staphylococcus*.

Formação de DNases - A verificação da capacidade de formação de deoxirribonucleases foi feita conforme metodologia descrita por MacFADDIN (1980).

Crescimento sob Anaerobiose - A verificação do crescimento sob anaerobiose foi efetuada em meio preparado com Triptona (4%), Extrato de levedura (1%), Glucose (1%) e Agar (1,5%). A incubação anaeróbia foi feita em atmosfera de dióxido de carbono e hidrogênio (jarras com Gas-Pack). As placas foram incubadas a 30°C, tanto anaeróbia como aerobiamente, para comparação da velocidade de crescimento nas duas condições. O resultado do crescimento anaeróbio foi considerado positivo com 24-48 horas de incubação, fracamente positivo com 72 horas e negativo com incubação adicional por 24 horas.

Teste de Oxidase - Foi realizado de acordo com a metodologia descrita por MacFADDIN (1980), após incubação a 30°C por 24 horas em PCA.

Teste de O/F Glucose - O teste foi realizado de acordo com a metodologia descrita por MacFADDIN (1980) e o meio basal - OF Basal Medium (DIFCO 0688) foi suplementado com 0,1% de extrato de levedura, para suportar o crescimento de lácticas. A solução de glucose foi esterilizada por filtração (MILLIPORE) e adicionada assépticamente ao meio basal, até concentração final de 1%. Os tubos foram incubados a 30°C por 1 a 7 dias e os resultados foram interpretados conforme as indicações do autor.

Teste de Litmus Milk - Foi efetuado de acordo com metodologia descrita por MacFADDIN (1980), incubação a 30°C por 1 a 7 dias e resultados interpretados conforme indicações do autor.

Fermentação de Carboidratos - O teste de fermentação de diversos carboidratos foi realizado de acordo com metodologia descrita por MacFADDIN (1980). As soluções de carboidratos foram esterilizadas por filtração (MILLIPORE) e adicionadas ao meio basal - Phenol Red Agar Base (DIFCO 0092) assépticamente, até concentração final de 1%. As linhagens foram incubadas a 30°C e o resultado foi considerado positivo com 24-48 horas de incubação, negativo com 72 horas.

Crescimento em 15% de Etanol - Etanol absoluto esterilizado por filtração foi assépticamente adicionado a caldo MRS, até concentração final 15%. As culturas foram incubadas a 30°C e o resultado considerado positivo com 24-48 horas de incubação, negativo com 72 horas.

Produção de Dióxido de Carbono - Na verificação da produção de dióxido de carbono a partir de glucose não foi utilizado o replicador, as culturas foram inoculadas com palitos estéreis, dadas as condições especiais exigidas pela prova.

A utilização de caldo MRS para verificar produção do gás a partir de glucose foi indicada por SIMS (1964) e BOUDAREL et RAMIREZ (1984). O meio foi distribuído em tubos de 16 X 150 mm com tampão de algodão e os tubos com o inóculo foram incubados a

30°C, no interior de tubos maiores, de 24,5 X 250 mm, contendo 10 ml de solução saturada de hidróxido de bário. Os tubos maiores foram selados com rolhas de borracha para impedir a introdução de dióxido de carbono atmosférico e a produção do gás foi verificada pela precipitação de carbonato de bário (CURRAN et al., 1933; HAUDDUROY, 1951; OLIVER, 1952). A incubação de alguns tubos livres de inóculo (branco) garantiu a elucidação de dúvidas quando da presença de pequenas quantidades de carbonato de bário nos tubos com cepas não produtoras de dióxido de carbono (cepas homofermentativas).

O resultado foi considerado positivo com 24-48 horas de incubação e negativo com 72 horas.

5. CLASSIFICAÇÃO

A classificação foi feita com base nos critérios descritos no Manual de Bergey (BERGEY'S MANUAL OF SISTEMATIC BACTERIOLOGY), edições de 1984 (Volume I) e 1986 (Volume II).

As chaves utilizadas para a classificação dos cocos Gram positivos, bastonetes Gram positivos e bastonetes Gram negativos encontram-se nas FIGURAS 8, 9 e 10, respectivamente.

As características chave utilizadas na classificação dos cocos Gram positivos foram os caracteres de arranjo das células (pares, tétrades, cachos ou cadeias), a reação de catalase, o tipo metabólico (oxidativo e/ou fermentativo) e os produtos finais do metabolismo fermentativo, particularmente dióxido de carbono (homo ou heterofermentação).

As características chave utilizadas na classificação dos bastonetes Gram positivos foram a capacidade de formação de esporos, a reação de catalase e o tipo metabólico (oxidativo e/ou fermentativo).

Na classificação de bastonetes Gram negativos, as características chave foram o tipo metabólico (oxidativo e/ou fermentativo) e a reação de oxidase.

Todas as cepas identificadas foram classificadas a nível de famílias e/ou gêneros.

As cepas de *Leuconostoc* foram classificadas até o nível de espécies e subespécies. A chave utilizada na classificação de *Leuconostoc* encontra-se na FIGURA 11.

As cepas de *Lactobacillus* foram classificadas até o nível de grupos e, em muitos casos, a nível de espécies. As chaves utilizadas na classificação de *Lactobacillus* encontram-se nas FIGURAS 12 e 13.

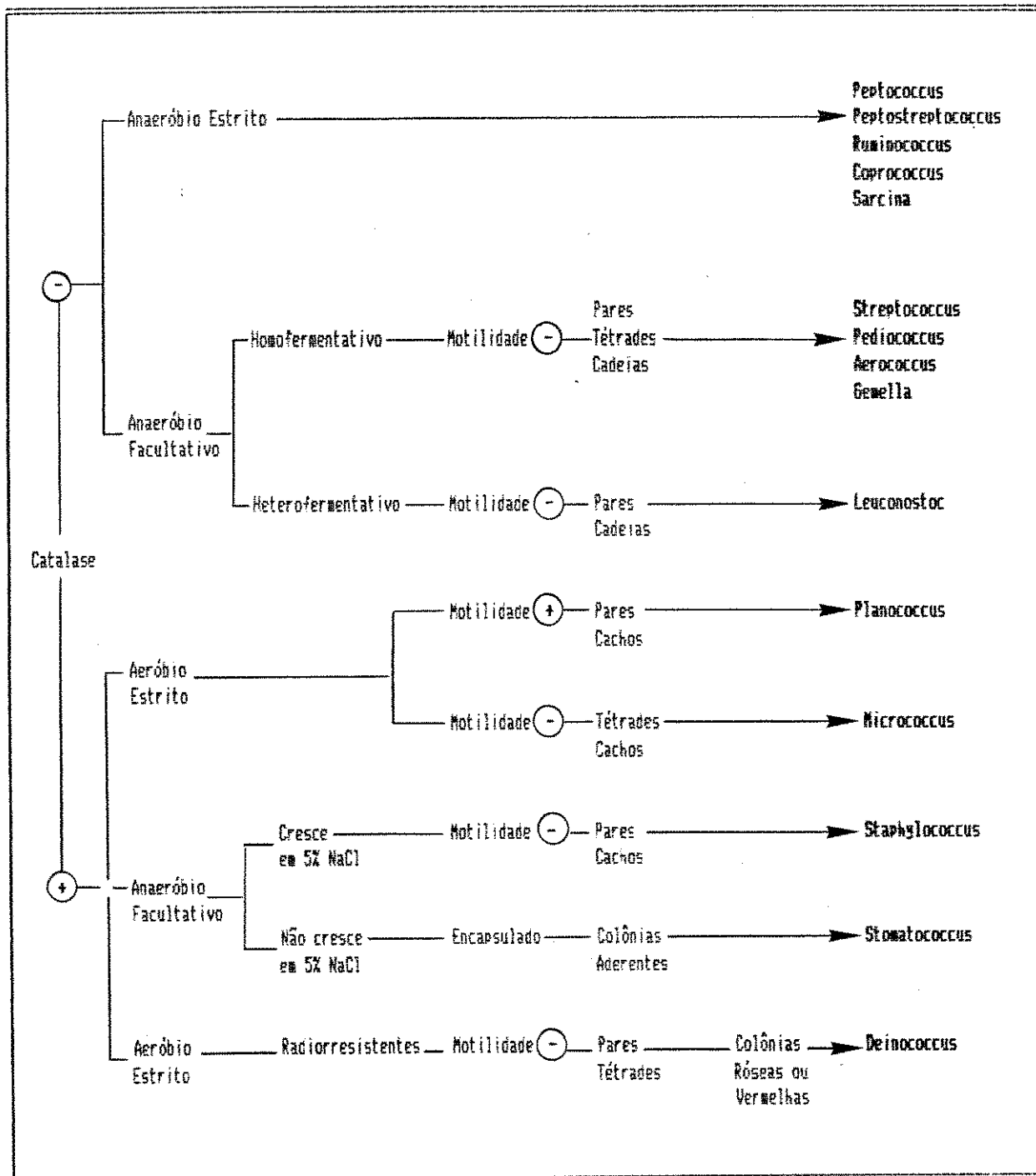


FIGURA 8. Chave para classificação de Cocos Gram Positivos.

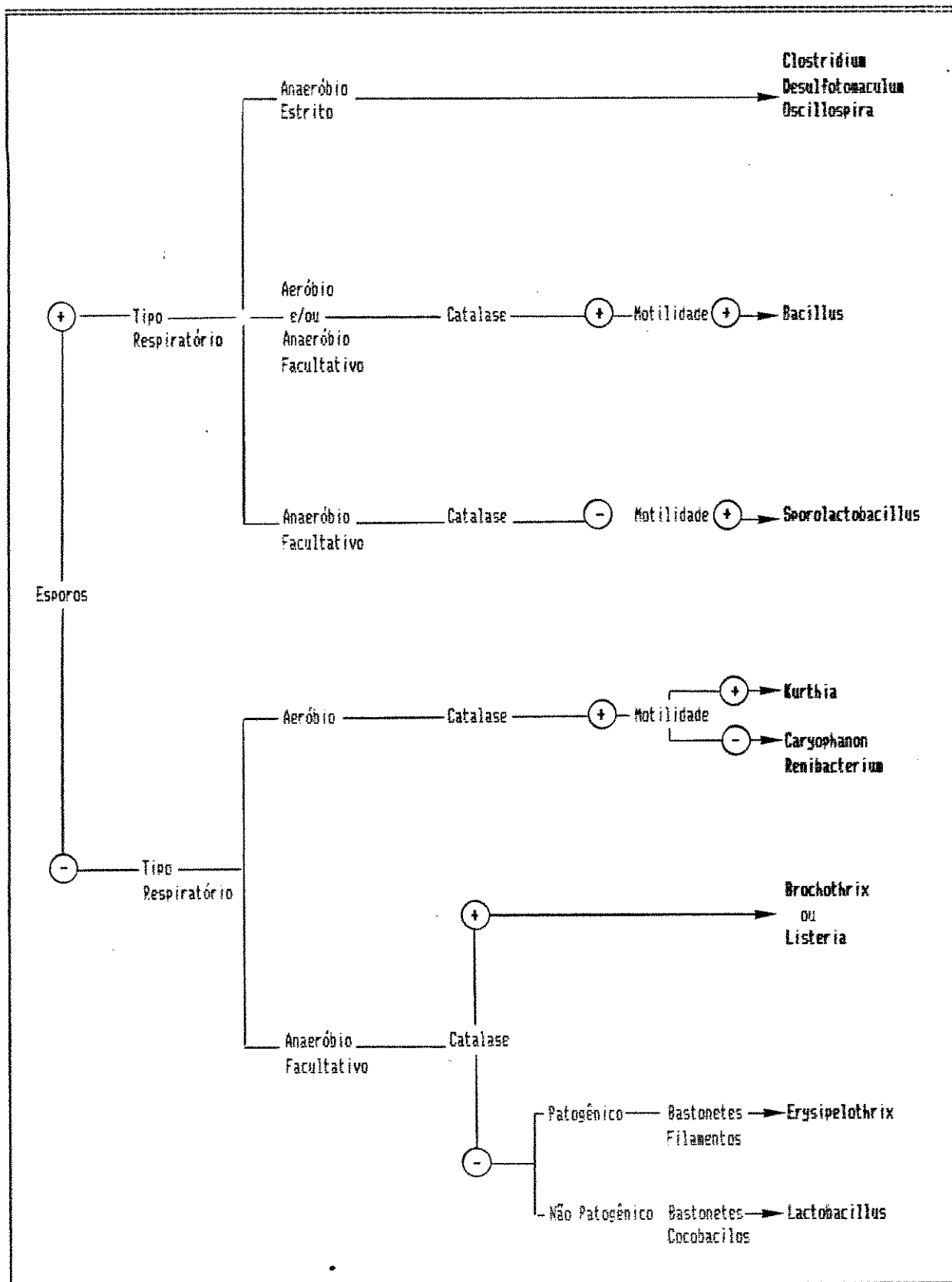


FIGURA 9. Chave para classificação de Bastonetes Regulares Gram Positivos.

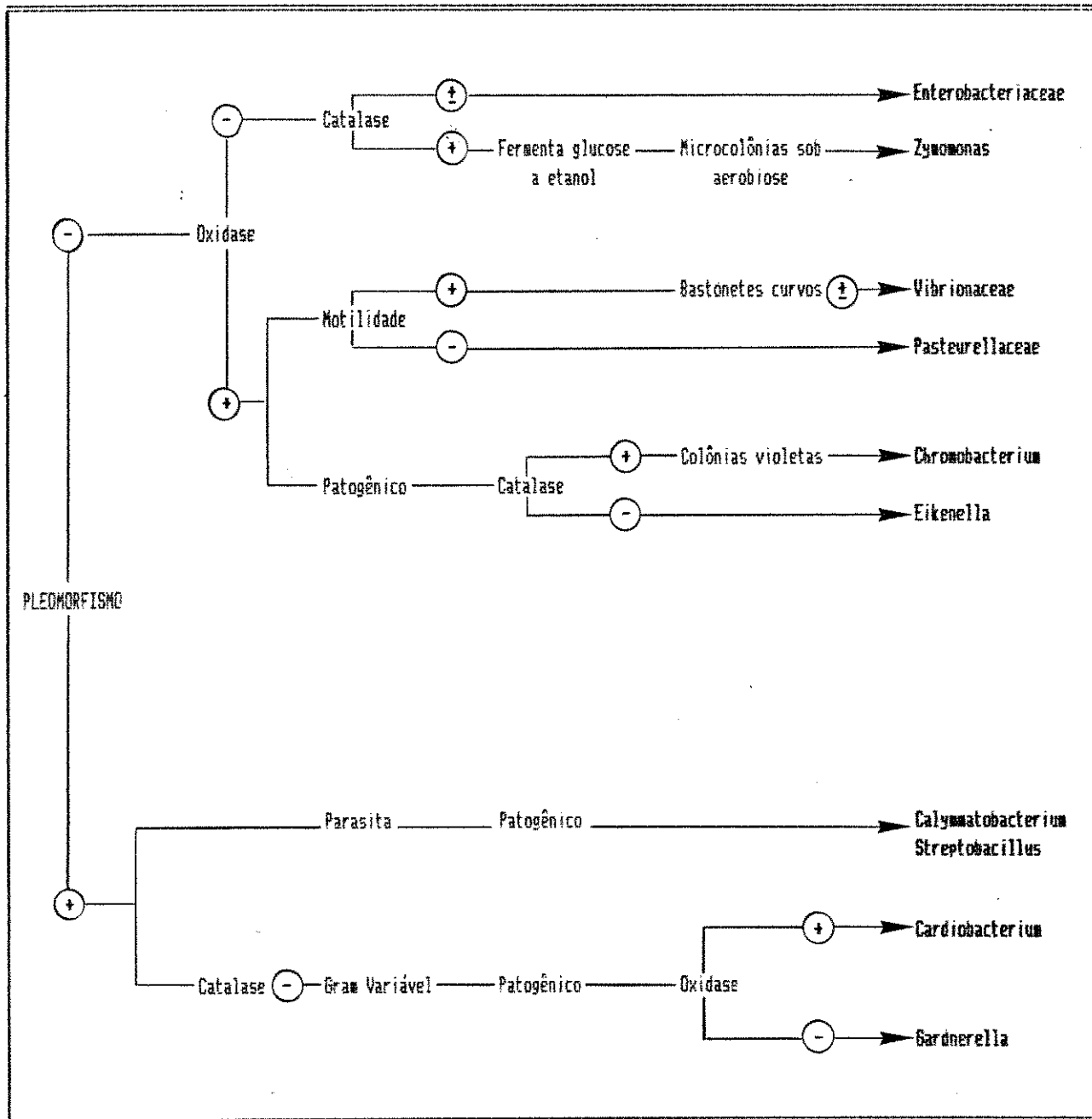


FIGURA 10. Chave para classificação de Bastonetes Gram Negativos Anaeróbios Facultativos.

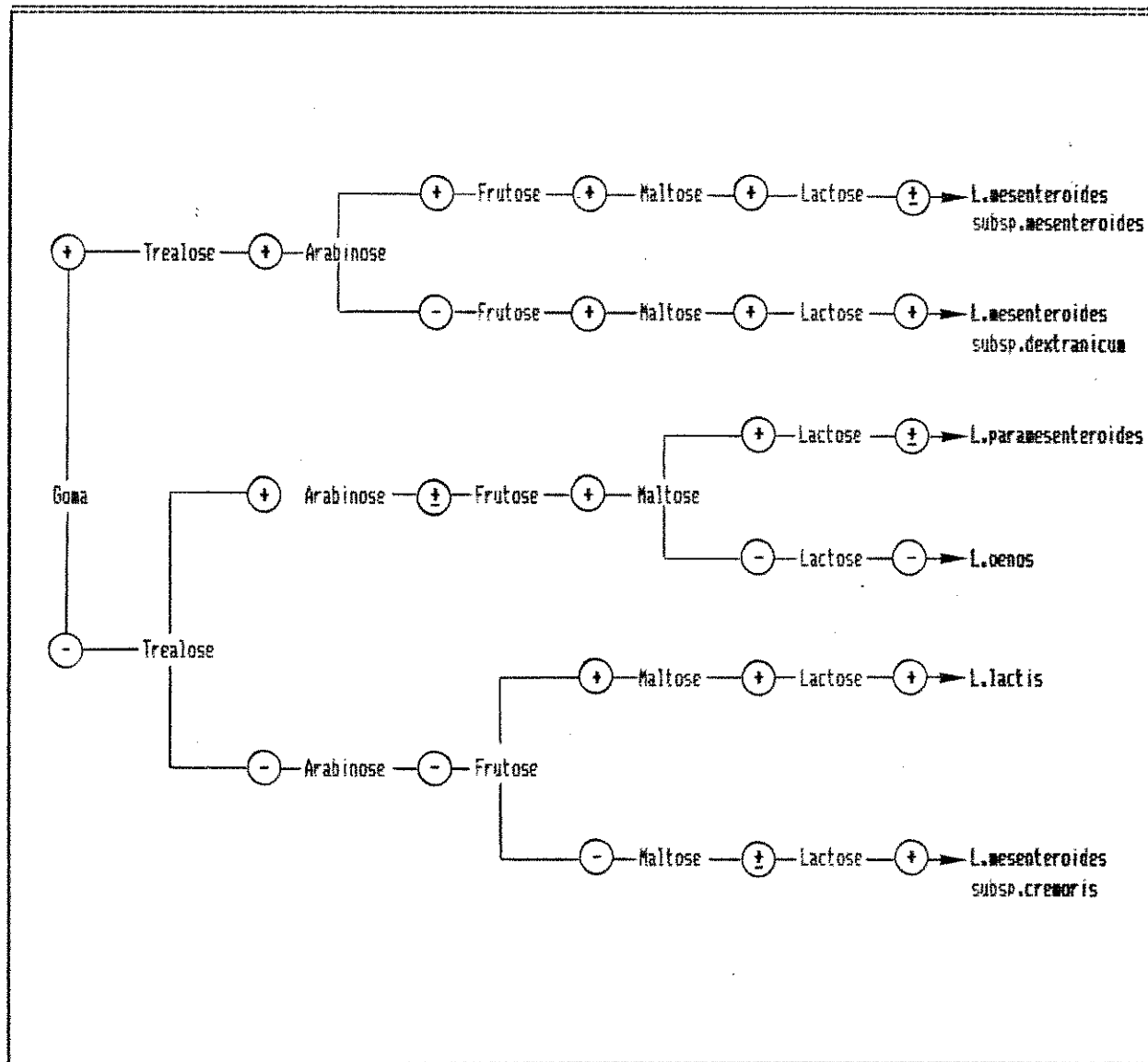


FIGURA 11. Chave para classificação de *Leuconostoc*.

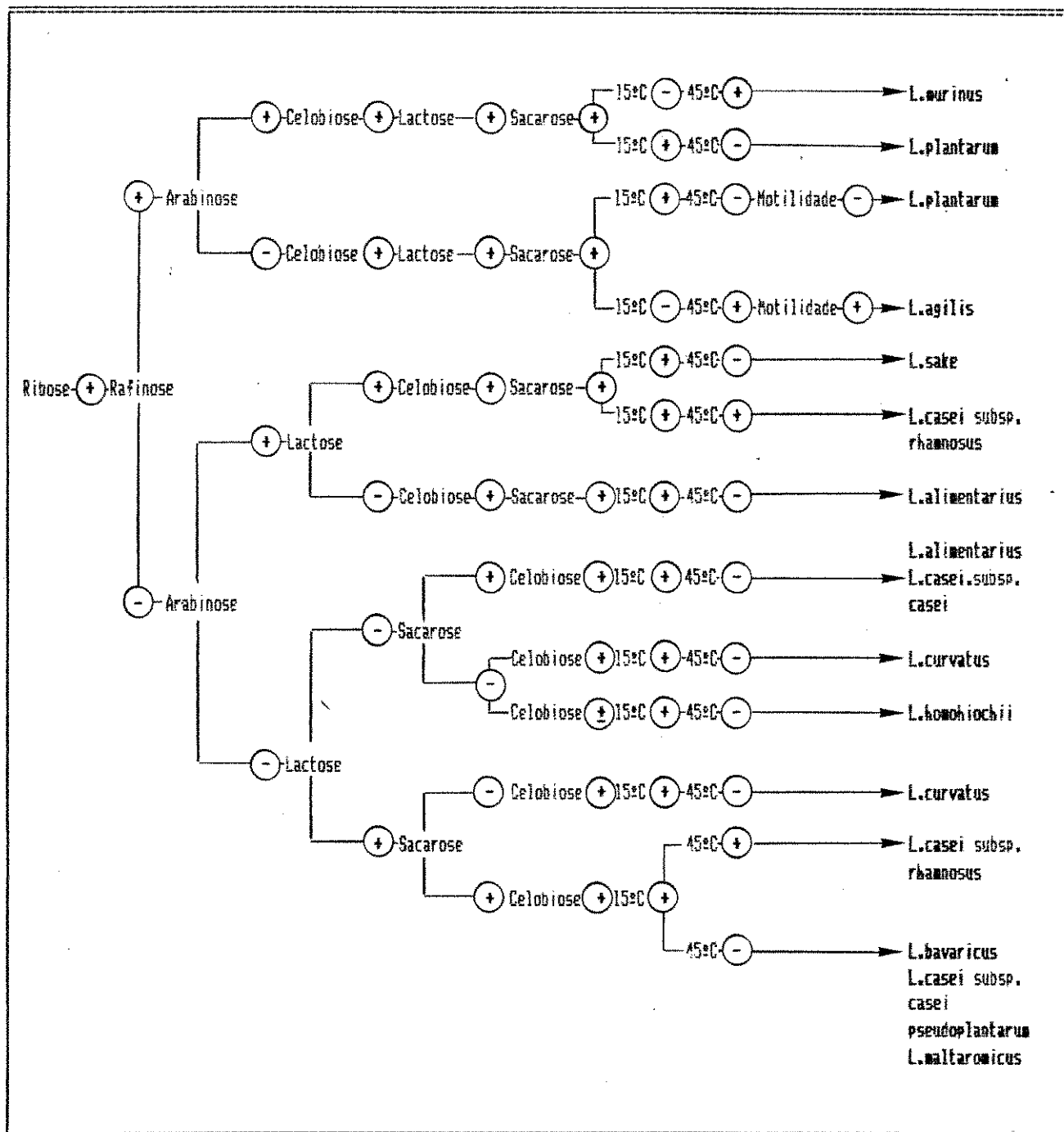


FIGURA 13. Chave para classificação de *Lactobacillus* Heterofermentativos Facultativos (GRUPO II).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ENUMERAÇÃO

Os resultados das contagens microbianas, o pH e a temperatura das amostras examinadas encontram-se descritos na TABELA 1.

A temperatura média das amostras foi de 30,8°C na entrada da torre e de 26,1°C na saída, com uma variação de temperatura média de 4,7°C (sem considerar-se as amostras de 26/11, cujos valores de temperatura não foram determinados).

Tanto as contagens em PCA como as contagens em MRS registraram uma sensível elevação na população contaminante do caldo, da entrada para a saída da torre de resfriamento. A contagem total de aeróbios (PCA) registrou uma elevação média de mais de 30 vezes - de $6,6 \times 10^6$ unidades formadoras de colônia/ml para $2,2 \times 10^8$ ufc/ml e a contagem de bactérias lácticas (MRS) uma elevação de quase 20 vezes - de $6,7 \times 10^6$ ufc/ml para $1,2 \times 10^8$ ufc/ml (FIGURA 14).

A elevação da população microbiana foi, de maneira geral, acompanhada de uma redução no pH das amostras, que baixou em média trinta e cinco décimos - de 5,64 para 5,29 (FIGURA 14).

Usualmente, as maiores variações nas contagens foram acompanhadas das maiores variações no pH - as contagens guardaram uma relação inversa com o pH, amostras mais contaminadas apresentaram menores valores de pH e amostras com menores contagens exibiram maiores valores de pH.

TABELA 1. CONTAGENS MICROBIANAS, pH e TEMPERATURA DAS AMOSTRAS DE CALDO DE CANA.

Data	Contagem Total de Aeróbios - PCA (ufc/ml)						Contagem de Bactérias Láticas - MRS (ufc/ml)					
	Entrada			Saída			Entrada			Saída		
	0	60	Média	0	60	Média	0	60	Média	0	60	Média
26/11	1,3x10 ⁷	5,5x10 ⁶	9,2x10 ⁶	4,5x10 ⁸	1,5x10 ⁷	2,3x10 ⁸	3,5x10 ⁶	4,3x10 ⁶	3,9x10 ⁶	2,3x10 ⁸	6,3x10 ⁶	1,2x10 ⁸
27/11	7,2x10 ⁶	1,1x10 ⁶	4,1x10 ⁶	6,3x10 ⁶	3,9x10 ⁶	5,1x10 ⁶	2,9x10 ⁶	1,7x10 ⁶	2,3x10 ⁶	3,0x10 ⁶	2,0x10 ⁶	2,5x10 ⁶
28/11	1,7x10 ⁶	1,1x10 ⁷	6,3x10 ⁷	7,4x10 ⁸	1,1x10 ⁸	4,2x10 ⁸	1,5x10 ⁷	1,3x10 ⁷	1,4x10 ⁷	1,4x10 ⁸	3,4x10 ⁸	2,4x10 ⁸
Média	7,3x10 ⁶	5,9x10 ⁶	6,6x10 ⁶	4,0x10 ⁸	4,3x10 ⁷	2,2x10 ⁸	7,1x10 ⁶	6,3x10 ⁶	6,7x10 ⁶	1,2x10 ⁸	1,2x10 ⁸	1,2x10 ⁸
Data	Amostras da Entrada						Amostras da Saída					
	0		60		Média		0		60		Média	
	pH	T(°C)	pH	T(°C)	pH	T(°C)	pH	T(°C)	pH	T(°C)	pH	T(°C)
26/11	5,96	-	5,96	-	5,96	-	4,61	-	5,72	-	5,16	-
27/11	5,37	31,0	6,01	30,0	5,69	30,5	5,61	28,0	6,10	28,0	5,85	28,0
28/11	5,20	34,5	5,36	28,0	5,28	31,2	4,42	27,0	5,28	21,5	4,85	24,2
Média	5,51	32,7	5,78	29,0	5,64	30,8	4,88	27,5	5,76	24,7	5,29	26,1

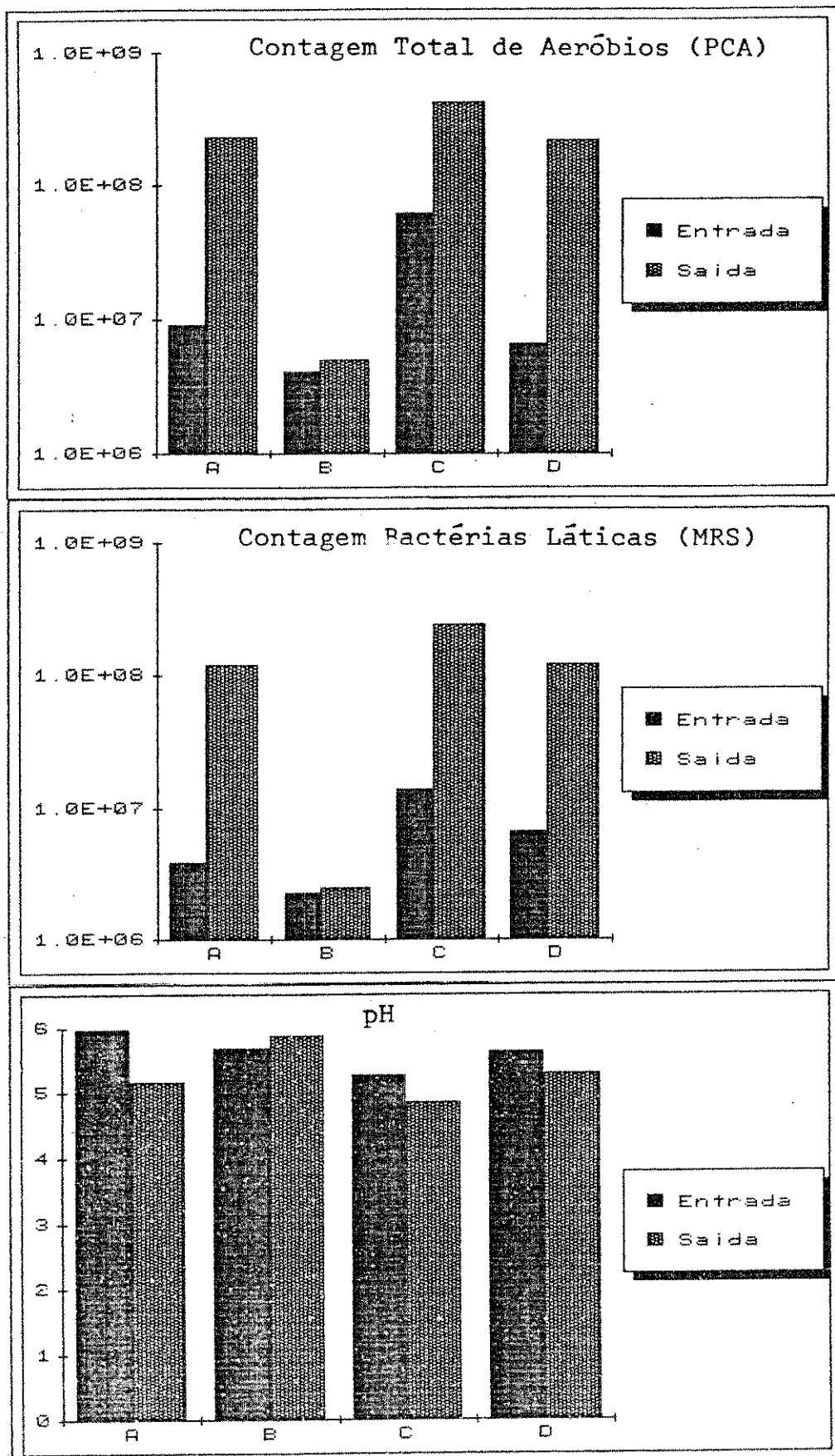


FIGURA 14. Comparação entre as contagens microbianas e pH das amostras examinadas em função do ponto de amostragem.

A - Valores médios das amostras de 26/11/85.

B - Valores médios das amostras de 27/11/85.

C - Valores médios das amostras de 28/11/85.

D - Valores médios de todas as amostras examinadas.

2. CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA

As características morfológicas e bioquímicas e a classificação das cepas isoladas encontram-se descritas no Apêndice (TABELAS 1 e 2 respectivamente).

Dos 217 isolados, 191 foram caracterizados como bactérias e 26 como leveduras (FIGURA 15A).

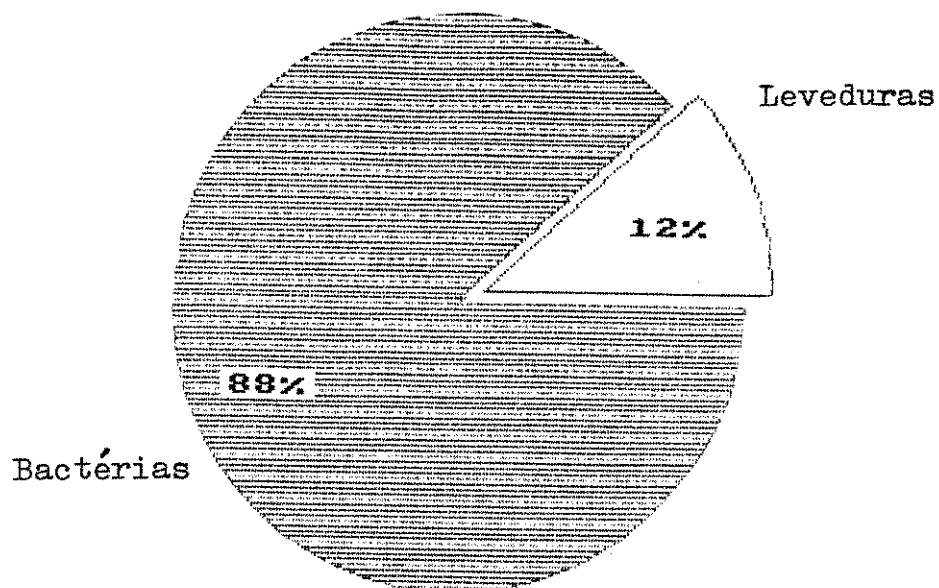
Das 191 bactérias, 109 foram caracterizadas como bastonetes Gram positivos, 80 como cocos Gram positivos e 02 como bastonetes Gram negativos (FIGURA 15B).

Os 80 cocos Gram positivos foram subdivididos em dois grupos, sendo 26 cocos catalase negativos, heterofermentativos classificados como *Leuconostoc* e 49 cocos catalase positivos classificados como pertencentes à família *Micrococcaceae*. Cinco cocos Gram positivos foram perdidos (FIGURA 15C).

Os 109 bastonetes Gram positivos foram subdivididos em dois grupos, sendo 82 bastonetes imóveis, não esporulados, catalase negativos, anaeróbios facultativos classificados como *Lactobacillus* e 7 bastonetes móveis, esporulados, catalase positivos classificados como *Bacillus*. Vinte bastonetes Gram positivos foram perdidos (FIGURA 15D).

15 A

FLORA TOTAL



15 B

BACTERIAS (88%)

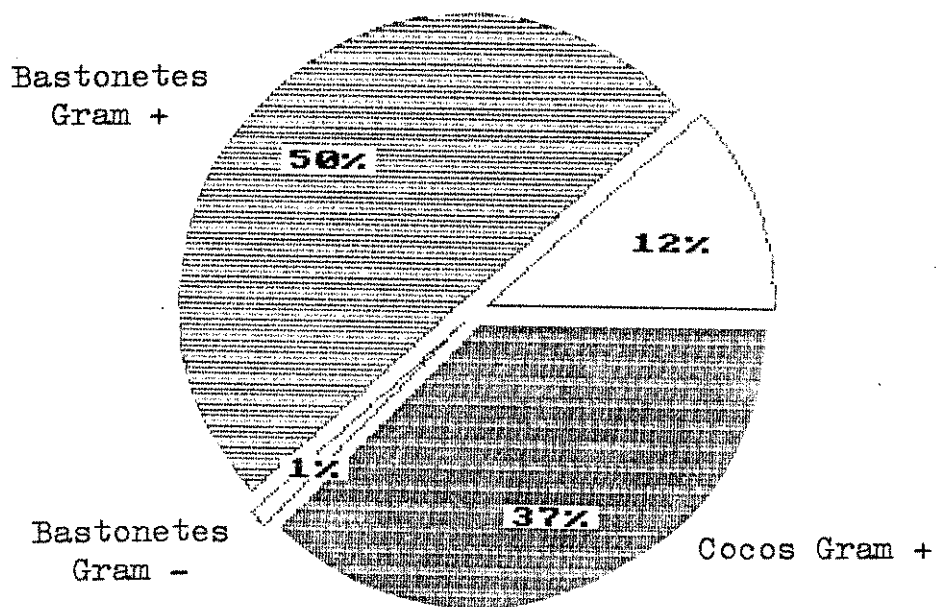
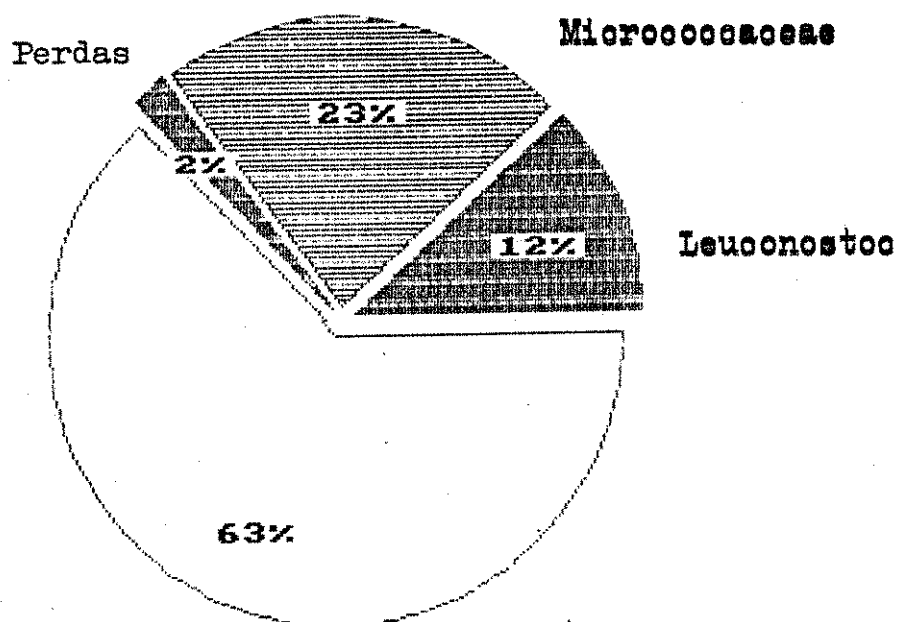


FIGURA 15. Resultados da Caracterização da Microbiota Isolada.

15 C

COCOS GRAM POSITIVOS (37%)



15 D

BASTONETES GRAM POSITIVOS (50%)

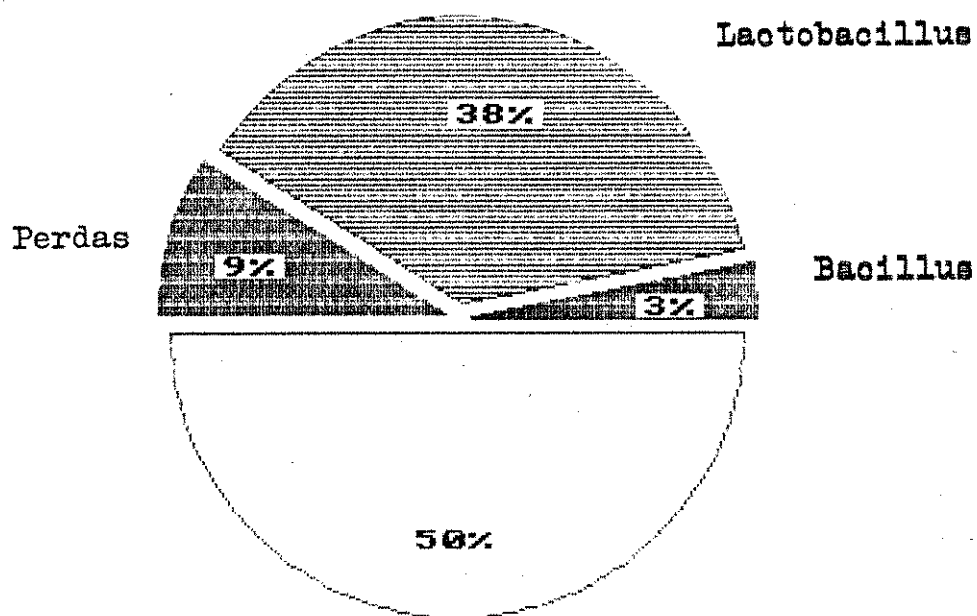


FIGURA 15. Resultados da Caracterização da Microbiota Isolada.

2.1. Características dos cocos Gram positivos

2.1.1. *Leuconostoc* - As 26 cepas apresentaram turbidez uniforme e sedimento liso no crescimento em meio líquido. As colônias em superfície de MRS Agar apresentaram-se puntiformes, lisas e não pigmentadas, com 24 horas de crescimento. Após incubação adicional por 48 horas, apenas 5 cepas desenvolveram colônias ligeiramente maiores do que 1 mm em diâmetro. Esse resultado era esperado, dado *Leuconostoc* crescer lentamente e preferir condições microaerófilas (GARVIE, 1986).

Todos apresentaram células esféricas - 5 cepas com formas ligeiramente alongadas tendendo a bastonetiformes. O arranjo predominante foram pequenas cadeias (17 cepas), geralmente associadas com cocos isolados ou aos pares.

No teste de oxidação/fermentação foi observado metabolismo fermentativo positivo para a maioria das cepas - apenas 4 reagiram lentamente mas com resultado nitidamente positivo com 72 horas de incubação. O fato de algumas cepas reagirem lentamente foi considerado normal pois *Leuconostoc* é muito exigente nutricionalmente e os requerimentos variam entre as linhagens (GARVIE, 1986).

As 26 cepas desenvolveram gás (dióxido de carbono) como produto final de metabolismo, após 24 horas de crescimento em caldo MRS, confirmando o metabolismo heterofermentativo que distingue *Leuconostoc* dos demais cocos Gram positivos catalase negativos.

Em Litmus milk, 16 cepas mostraram-se inativas após 7

dias de incubação a 30°C - apenas 7 desenvolveram acidificação e 3 coagularam o leite. Na realidade, leite é um meio pobre para *Leuconostoc* que usualmente é inativo nesse meio (GARVIE, 1986), além de não reduzir litmus (GARVIE, 1960). Nenhuma cepa hidrolizou amido. O crescimento a 45°C foi negativo para todas as cepas e a maioria cresceu a 15°C - apenas 4 falharam em crescer (117, 173, 200 e 208).

Os resultados da classificação de *Leuconostoc* a nível de espécies encontram-se na FIGURA 16.

AS 26 cepas foram subdivididas em 3 grupos:

Um grupo de 13 cepas formadoras de goma que fermentaram arabinose, classificadas como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. O desenvolvimento de goma por essas cepas foi favorecido pela incubação a 20°C - 6 deixaram de apresentar a característica a 30°C, embora com resultados claramente positivos a 20°C (33, 102, 133, 200, 203, 209).

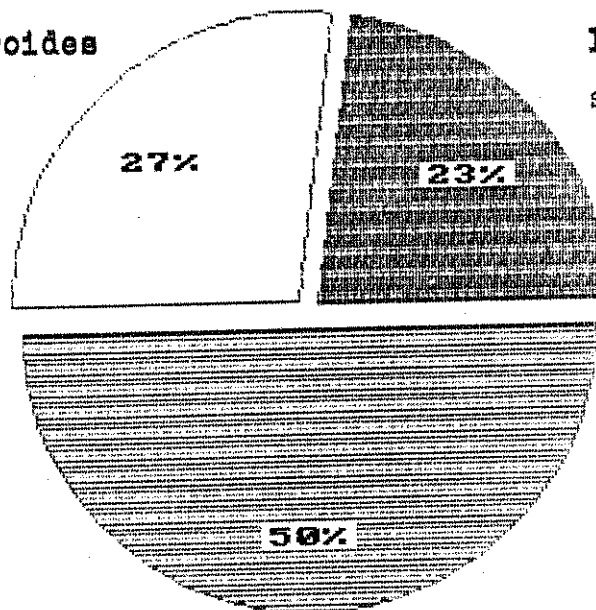
Um grupo de 6 cepas formadoras de goma que não fermentaram arabinose, classificadas como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Todos desenvolveram a goma a 20°C e duas deixaram de apresentá-la a 30°C (36, 211).

Um grupo de 7 cepas não formadoras de goma que fermentaram trealose, classificadas como *Leuconostoc paramesenteroides*. Dessas 7, 4 cresceram em 7,5% de NaCl (nenhuma outra cresceu), o que está de acordo com o fato de *Leuconostoc paramesenteroides* ser caracteristicamente mais resistente a altos teores de NaCl (GARVIE, 1986).

LEUCONOSTOC

L.paramesenteroides

L.mesenteroides
subsp.dextranicum



L.mesenteroides
subsp.mesenteroides

Figura 16. Resultados da Classificação das cepas de Leuconostoc.

2.1.2. Micrococcaceae - As 49 cepas apresentaram células imóveis caracteristicamente arranjadas em cachos irregulares, usualmente associadas a pares e tétrades.

As colônias em PCA apresentaram diâmetros variando de 1,5 a 2,5 mm com 24 horas de incubação a 30°C - circulares, com bordas perfeitas, planas ou ligeiramente elevadas, raramente convexas. Pigmentação foi observada em 19 culturas - coloração laranja pálido desenvolvida com no mínimo 48 horas de incubação em PCA, raramente com 24 horas. A pigmentação deixou de manifestar-se após transferências seriadas em MRS.

Com base no tipo metabólico, 48 cepas que apresentaram metabolismo fermentativo no teste de Oxidação/Fermentação de glucose foram classificadas como **Staphylococcus**. Apenas um dos cocos - Nº 97 - deixou de desenvolver acidificação no meio teste, tanto aeróbia como anaeróbiamente. Na presença de oxigênio essa cepa apresentou reação alcalina que foi também observada em Litmus milk, acompanhada de digestão da caseína. A cepa Nº 97 não foi classificada a nível de gênero.

A maioria das cepas classificadas como **Staphylococcus** cresceu sob incubação anaeróbia, embora mais lentamente do que sob aerobiose, nas mesmas condições. Geralmente o crescimento obtido com 24 horas em presença de oxigênio só foi obtido com 48-72 horas sob anaerobiose. Na realidade, **Staphylococcus** cresce mais rápido sob aerobiose, segundo KLOOS and SCHLEIFER (1986). Todos cresceram em 7,5% de NaCl.

Nenhuma cepa apresentou reação de DNase ou hidrólise de amido. A maioria apresentou reação de lecitinase positiva - 3

cepas mostraram-se negativas e 4 não cresceram no meio de cultura (Baird-Parker Agar + Gema de ovo). A falha em crescer nesse meio não foi considerada extraordinária pois o meio de Baird-Parker é um meio de alta seletividade que pode inibir diversas linhagens de estafilococos (SPECK, 1978). A reação de lecitinase positiva foi considerada confirmativa na diferenciação dos estafilococos pois as linhagens fermentativas de micrococcos (*Micrococcus kristinae*) não possuem lecitinases (KOCUR, 1986a).

Um fato interessante foi observado com relação ao crescimento em Litmus milk - as cepas pigmentadas, na sua maioria, mostraram-se inativas, enquanto as não pigmentadas apresentaram acidificação e coagulação do leite, com redução do litmus.

Um outro fato foi observado com relação ao meio de origem das cepas examinadas - apenas 6 dos 49 cocos classificados como *Micrococcaceae* foram isolados a partir de MRS. Essas 6 cepas, justamente, exibiram algumas características não observadas nas demais: Cinco deixaram de crescer em Baird-Parker Agar (43, 50, 51, 97, 156); uma não cresceu em 7,5% NaCl, permaneceu inativa em OF Basal Medium e não cresceu anaeróbiamente (97); uma apresentou copiosa formação de goma em agar 5% sacarose (171). A formação de goma não é incomum em *Staphylococcus*, diversas linhagens de *Staphylococcus epidermidis*, por exemplo, produzem um muco provavelmente polissacarídico que envolve suas células e acumula-se em superfícies planas (CHRISTENSEN et al., 1982; PETERS et al., 1982).

2.2. Características dos bastonetes Gram positivos

2.2.1. Lactobacillus - Todos apresentaram crescimento lento em superfície de MRS Agar - apenas 31 desenvolveram colônias ligeiramente maiores que 1 mm em diâmetro, com 48 horas de incubação - colônias circulares, com bordas perfeitas, convexas ou ligeiramente elevadas. Nenhuma colônia pigmentada foi observada.

O crescimento em caldo apresentou turbidez uniforme com sedimento liso - apenas 5 cepas exibiram sedimento floculento, exatamente as mesmas que demonstraram arranjo em longas cadeias. O arranjo em cadeia foi observado em apenas 7 cepas, as demais mostraram células isoladas.

Nos esfregaços corados para reação de Gram, a maioria exibiu uma mescla de células coradas, nitidamente Gram positivas com células não coradas, tendendo para Gram negativas. A presença de células Gram indeterminadas é normal em lactobacilos porque, embora todos sejam claramente Gram positivos, as células mortas podem apresentar resultados variáveis (KANDLER and WEISS, 1986).

Apenas duas cepas homofermentativas foram isoladas, as demais desenvolveram abundante quantidade de dióxido de carbono em caldo MRS.

No teste de Oxidação/Fermentação (Glucose), a maioria mostrou-se inativa no meio teste. Na verdade, em vista dos altos requerimentos nutricionais de lactobacilos, Of Basal Medium não foi um bom meio para essa prova, mesmo com a adição de extrato

de levedura. Feitas as devidas alterações, MRS teria sido mais indicado como meio basal para provas bioquímicas do tipo fermentação de carboidratos, conforme observam KANDLER and WEISS (1986). Os resultados do teste de verificação da produção de dióxido de carbono como produto final de metabolismo (homo ou heterofermentação) da glucose, efetuado em caldo MRS, confirmaram esse fato - 80 cepas fermentaram glucose com produção de gás e as duas cepas homofermentativas cresceram copiosamente no meio, embora sem produção do gás.

Também em Litmus milk a maioria dos lactobacilos isolados permaneceu inativo ou desenvolveu leve acidificação - apenas 3, dois deles homofermentativos, coagularam o leite.

Os resultados da classificação de **Lactobacillus** a nível de espécies encontram-se na FIGURA 17.

As 82 cepas foram subdivididas em dois grupos:

Duas cepas homofermentativas que fermentaram a pentose ribose, classificadas como pertencentes ao Grupo II de **Lactobacillus** - Heterofermentativos Facultativos (KANDLER and WEISS, 1986).

Oitenta cepas heterofermentativas, classificadas como pertencentes ao Grupo III de **Lactobacillus** - Heterofermentativos obrigatórios (KANDLER and WEISS, 1986).

Na classificação de **Lactobacillus** a nível de espécies, uma série de dificuldades foram encontradas com respeito aos resultados dos testes de fermentação de carboidratos e/ou crescimento a 15 e 45°C. Com base nesses dados, muitas cepas não puderam ser classificadas a nível de espécies. Por outro lado, as

provas adicionais necessárias para a classificação fugiriam aos propósitos do trabalho, por tratar-se de testes como determinação de moles% de guanina + citosina, hibridização de ácidos nucleicos ou outros métodos quimiotaxônomicos refinados. Dessa forma, quando não foi possível determinar a espécie, as cepas foram reunidas em blocos cuja identidade restringiu-se a um pequeno número de espécies prováveis.

Dos 82 lactobacilos isolados, 27 foram classificados como *Lactobacillus fermentum*, 15 como *L.confusus*, 9 como *L.viridescens* e 2 como *L.plantarum*. Dos demais, 12 ficaram com a identidade provável entre *L.fermentum* e *L.reuteri*, 3 entre *L.brevis* e *L.buchneri*, 6 entre *L.fermentum*, *L.reuteri*, *L.brevis* e *L.buchneri* e 8 não foram identificados.

L.fermentum e *L.reuteri* são espécies estreitamente relacionadas que dificilmente podem ser diferenciadas com base em caracteres fenotípicos. *L.brevis* e *L.buchneri*, da mesma forma, exigem determinações baseadas no genoma para serem distinguidos (KANDLER and WEISS, 1986).

L.fermentum/*L.reuteri* são diferenciados de *L.brevis*/*L.buchneri* com base, particularmente, nos dados de temperaturas máxima e mínima de crescimento, de acordo com KANDLER and WEISS (1986). Entretanto, embora normalmente não cresçam a 45°C, *L.brevis* e *L.buchneri*, segundo SHARPE (1981), ocasionalmente apresentam linhagens termodúricas capazes de crescer a 45°C, facilmente confundidas com *L.fermentum*. Esse erro é particularmente frequente no caso de linhagens arabinose e/ou xilose positivas, porém, as linhagens termodúricas de *L.brevis* e *L.buchneri* usual-

LACTOBACILLUS

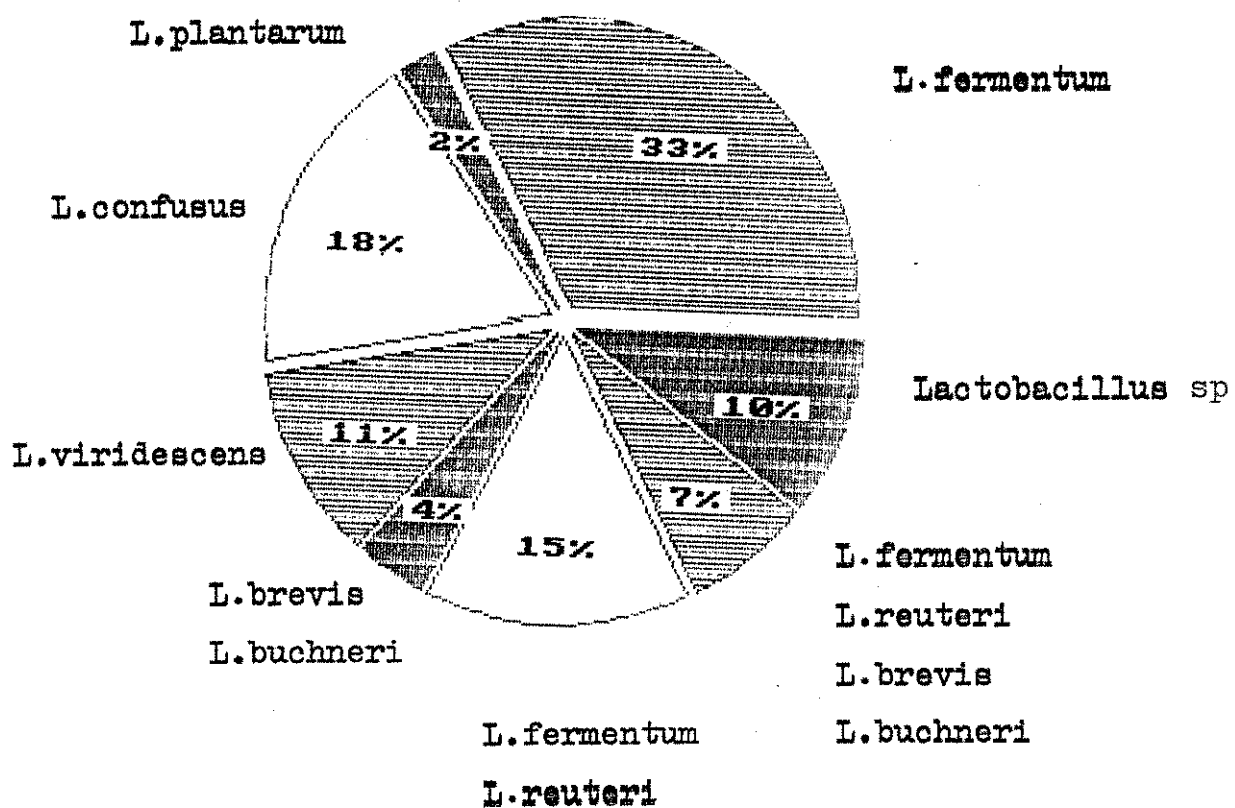


FIGURA 17. Resultados da Classificação das cepas de *Lactobacillus*.

mente crescem a 15°C enquanto *L. fermentum* não cresce, o que permite distinguí-los.

Obedecendo o critério de SHARPE (1981), 12 cepas de *L. fermentum* ou *L. reuteri* que não cresceram a 15°C foram diferenciadas de 3 cepas de *L. brevis* ou *L. buchneri* que cresceram tanto a 15 como a 45°C.

Essa regra, entretanto, não auxiliou na diferenciação de 6 cepas que cresceram a 15 e 45°C, aproximando-se de *L. brevis*/*L. buchneri* termodúricos por esse lado, mas que pelo lado dos resultados dos testes de fermentação de carboidratos aproximaram-se muito mais de *L. fermentum*/*L. reuteri*.

Dificuldades na classificação baseada nas temperaturas máxima e mínima de crescimento eram esperadas pois esses dados, segundo BRYAN-JONES (1975), geralmente são insatisfatórios para lactobacilos isolados de destilarias. Essas linhagens, segundo o mesmo autor, são adaptadas para crescer a temperaturas relativamente altas, selecionadas pelo ambiente severo das destilarias. O autor destaca, particularmente, suas dificuldades e a inutilidade dos testes de crescimento a 15 e 45°C na classificação de cepas *L. fermentum* e *L. brevis* por ele isoladas em destilarias de whisky.

Os resultados obtidos nos testes de fermentação de carboidratos, por sua vez, também apresentaram diversas divergências em relação aos dados de KANDLER and WEISS (1986), constantes do Manual de Bergey. Resultados divergentes foram encontrados, particularmente, nos testes de fermentação de lactose por cepas classificadas como *L. fermentum* ou *L. reuteri*. Uma grande

incidência de cepas lactose negativas (59%) foi observada, embora 90% ou mais linhagens dessas espécies fermentem lactose, segundo os dados de KANDLER and WEISS (1986).

CARR (1975) observa que, embora seja um dado importante na identificação de lactobacilos isolados de leite, a fermentação de lactose é muito menos significativa para aqueles isolados de outras fontes. KANDLER and WEISS (1986) destacam que os plasmídios encontrados em lactobacilos são frequentemente associados à fermentação de lactose e que o único exemplo de mutação genética natural em *Lactobacillus* é justamente a transmissão de um plasmídio que determina o metabolismo de lactose em *L. casei*.

Testes de fermentação de carboidratos para identificação de bactérias lácticas são sempre discutíveis, segundo CARR (1975), porque as condições dos testes, como pH, nutrientes, etc., são raramente especificadas. Variações nos resultados são comuns como decorrência de variações nas condições, como FORNACHON et al. (1940) bem demonstraram. Esses autores relatam as dificuldades em obter fermentação de certos carboidratos por *Lactobacillus hilgardii* a pH 6,8 - 7,0, enquanto esses mesmos carboidratos eram vigorosamente fermentados, nas mesmas condições, alterando-se o pH para 4,5 - 5,5.

Diversas cepas isoladas apresentaram formação de goma em agar 5% Sacarose, em menor ou maior quantidade. Algumas cepas classificadas como *L. fermentum*/*L. reuteri* desenvolveram pequenas quantidades de goma. Outras 17 cepas produziram copiosas quantidades e 15 delas, que desenvolveram colônias grandes, tipicamente mucóides, com 24 horas de incubação, puderam ser classifica-

das como *Lactobacillus confusus*. Duas cepas, semelhantes à *L. confusus* no aspecto das colônias mucóides, não foram classificadas, entretanto, dado às divergências que apresentaram nos resultados de fermentação de carboidratos (145 e 146).

Um fato interessante foi observado com respeito às cepas fortemente produtoras de goma - essas cepas foram predominantemente isoladas de PCA, enquanto as demais o foram predominantemente de MRS.

2.2.2. Bacillus - As 7 cepas apresentaram células isoladas - bastonetes móveis nitidamente Gram positivos.

Todos desenvolveram esporos, observados sob coloração com verde de malaquita, após uma semana de incubação a 30°C em Sporulating Agar.

A maioria apresentou copioso crescimento em MRS Agar, com formação de colônias irregulares e rugosas, espalhadas e desidratadas após 48 horas de incubação. Duas cepas (165 e 167) apresentaram um crescimento mais moderado, com colônias menores e não espalhadas, embora igualmente irregulares e rugosas.

Na realidade, as colônias de *Bacillus* são muito variadas e vários fatores ambientais podem interferir na sua aparência, como a composição do meio, temperatura e tempo de incubação, umidade, bem como alterações decorrentes do próprio crescimento (KNAYS1, 1951; HENNENBERG and MARWITZ, 1963).

A presença de pigmento foi raramente observada - apenas 1 cepa (85) apresentou coloração castanho avermelhada em PCA, característica que deixou de manifestar-se após transferências se-

riadas em MRS. De acordo com CLAUS and BERKELEY (1986), a maioria das linhagens de *Bacillus* não são pigmentadas - variantes pigmentadas têm sido observadas em apenas algumas espécies como *B.licheniformis* (castanho avermelhado), *B.pulvifaciens* (laranja a vermelho), *B.subtilis* (rosa, amarelo, laranja, castanho).

No crescimento em meio líquido, apenas duas cepas provocaram turvação do meio (165 e 167) - as demais cresceram sem turvar o caldo. Três cepas formaram sedimento liso, sem desenvolvimento de película superficial (85 - 165 e 167) - as quatro demais exibiram um sedimento floculento e mucóide, com desenvolvimento de película superficial rugosa e aderente.

Na verificação do tipo metabólico, a maioria das cepas apresentou-se estritamente aeróbia, exibindo metabolismo oxidativo no teste de Oxidação/Fermentação de glucose e falhando em crescer sob anaerobiose. Uma linhagem (85), mostrou-se inativa no teste de OF mas cresceu levemente sob anaerobiose, após 72 horas de incubação. Na realidade, 72 horas de incubação mostrou-se insuficiente para a perfeita avaliação do crescimento anaeróbio - segundo CLAUS and BERKELEY (1986), a incubação anaeróbia deve ser prolongada para no mínimo 7 dias, quando a temperatura de crescimento de *Bacillus* é menor do que 45°C.

Todas as cepas cresceram a 15 e 45°C. O fato não foi considerado extraordinário pois NORRIS et al.(1981) destacaram a habilidade de *Bacillus* para crescer tanto a baixas como a altas temperaturas.

Em Agar 5% Sacarose, uma cepa (85) produziu copiosa quantidade de goma, particularmente sob incubação a 20°C. Segundo

CLAUS and BERKELEY (1986), diversas espécies de *Bacillus* são capazes de produzir levano ou dextrano extracelular a partir de sacarose, como *B.subtilis*, *B.licheniformis* e *B.polymyxa*.

Todas as cepas cresceram em 7,5% de NaCl, hidrolizaram amido e provocaram redução do litmus em Litmus Milk, com digestão da caseína.

2.3. Características dos bastonetes Gram negativos

As duas cepas foram caracterizadas como anaeróbias facultativas - apresentaram metabolismo oxidativo e fermentativo no teste de Oxidação/Fermentação de glucose. Abundante quantidade de gás foi produzida, provocando o deslocamento do meio teste até a borda superior dos tubos utilizados para a realização do teste de O/F. O teste de oxidase resultou negativo para ambas as cepas.

Com base nesses resultados, os dois bastonetes Gram negativos foram classificados como pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

As duas cepas apresentaram células isoladas, com motilidade negativa.

Segundo os dados de BRENNER (1984), apenas alguns poucos membros da família *Enterobacteriaceae* são imóveis, número ainda mais reduzido entre aqueles que produzem gás: *Klebsiella pneumoniae* subsp.*pneumoniae* e algumas linhagens da subsp.*ozaense*; *Klebsiella oxytoca*; algumas linhagens de *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Salmonella pullorum* e *Yersinia*.

No crescimento em PCA e MRS, as duas cepas desenvolveram colônias mucóides, com acúmulo de grande quantidade de goma altamente viscosa e aderente. Em agar 5% Sacarose a produção da goma foi fortemente estimulada, espalhando-se e cobrindo toda a placa em menos de 48 horas de incubação. A formação da goma foi favorecida pela incubação a 20°C.

A formação de colônias mucóides por **Enterobacteriaceae** não é comum, pode ocorrer nos gêneros **Escherichia** (ORSKOV, 1984), **Enterobacter**, particularmente entre as linhagens anaerogênicas (RICHARD, 1984) e em **Klebsiella** (ORSKOV, 1984).

Segundo ORSKOV (1984), **Klebsiella** produz uma cápsula polissacarídica que provoca a formação de colônias tipicamente mucóides, altamente viscosas. O material capsular difunde-se livremente pelo meio de cultura, acumulando-se em colônias bastante elevadas, convexas ou em forma de cúpula. De acordo com o mesmo autor, o desenvolvimento da cápsula é melhor observado em meios ricos em carboidratos.

As duas cepas cresceram a 15°C e em 7,5% de NaCl, hidrolizaram amido e acidificaram o leite, com coagulação, digestão da caseína e redução do litmus em Litmus Milk.

3. COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA DAS AMOSTRAS EXAMINADAS

Os resultados, em porcentagem de incidência, de cada tipo de microrganismo isolado em relação à flora total, encontram-se na TABELA 2.

A microbiota contaminante do caldo de cana das amostras analisadas mostrou-se predominantemente bacteriana (88%) e as cepas Gram positivas constituíram quase que a totalidade das bactérias presentes.

Os resultados demonstram que *Lactobacillus* foi o contaminante mais frequente (38%), seguido de cocos pertencentes à família *Micrococcaceae* (23%), dos quais 22,5% foram classificados como *Staphylococcus*. Em menor incidência seguem *Leuconostoc* (12%) e leveduras (12%). Os esporulados do gênero *Bacillus* foram raramente encontrados (3%) e as bactérias Gram negativas praticamente ausentes (1%).

As cepas predominantes de *Leuconostoc* foram as subespécies produtoras de goma de *L. mesenteroides*, que constituíram 73% do total de *Leuconostoc* isolados.

As cepas de *Lactobacillus* isoladas mostraram-se predominantemente heterofermentativas (98%), termodúricas (79%) e lactose negativas (62%). As cepas fortemente produtoras de goma constituíram 8% do total de lactobacilos isolados.

A frequência na incidência de *Lactobacillus* e *Leuconostoc* atestam um predomínio de bactérias lácticas no caldo das amostras da torre, constituindo 50% da flora total e 56% da flora bacteriana isolada.

TABELA 2. Número e Tipos de Microrganismos Isolados em função do Ponto e Tempo de Amostragem e Meio de Plaqueamento.

Tipo de Isolado		Entrada				Saída				TOTAL	
		PCA		MRS		PCA		MRS			
		0	60	0	60	0	60	0	60		
Leveduras		3	7	7	2	5	2	0	0	26(12%)	
Cocos	Perdas	0	0	4	0	0	1	0	0	5(2%)	80(37%)
Gram	Leuconostoc	0	3	3	1	4	12	2	1	26(12%)	
Positivos	Micrococcaceae	0	19	0	1	5	19	1	4	49(23%)	
Enterobacteriaceae		0	0	0	0	0	0	2	0	2(1%)	
Bastonetes	Perdas	2	0	5	3	1	0	4	5	20(9%)	109(50%)
Gram	Lactobacillus	4	8	27	12	1	4	12	14	82(38%)	
Positivos	Bacillus	1	1	1	0	0	0	4	0	7(3%)	
		10	38	47	19	16	38	25	24		
TOTAL		48	66			54	49			217	
		(22%)	(30%)			(25%)	(23%)				
		114	53%			103	47%				

A predominância de bactérias lácticas e a produção de ácido como produto final de seu metabolismo poderia explicar o já observado paralelismo entre as contagens e o pH das amostras examinadas. A coincidência entre elevação nas contagens e redução no pH sugerem a possibilidade de acompanhar acentuadas elevações na carga microbiana do caldo na torre através de determinações do pH de amostras de caldo. Na realidade, é prática comum nas usinas brasileiras, a verificação rápida do nível de contaminação do caldo através da observação da variação do pH de amostras incubadas por 3-4 horas a 30-34°C.

As cepas fortemente produtoras de goma isoladas, como *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (13), subsp. *dextranicum* (6) e algumas espécies de *Lactobacillus* (17, das quais 15 classificadas como *L.confusus*) constituíram 17% da flora total.

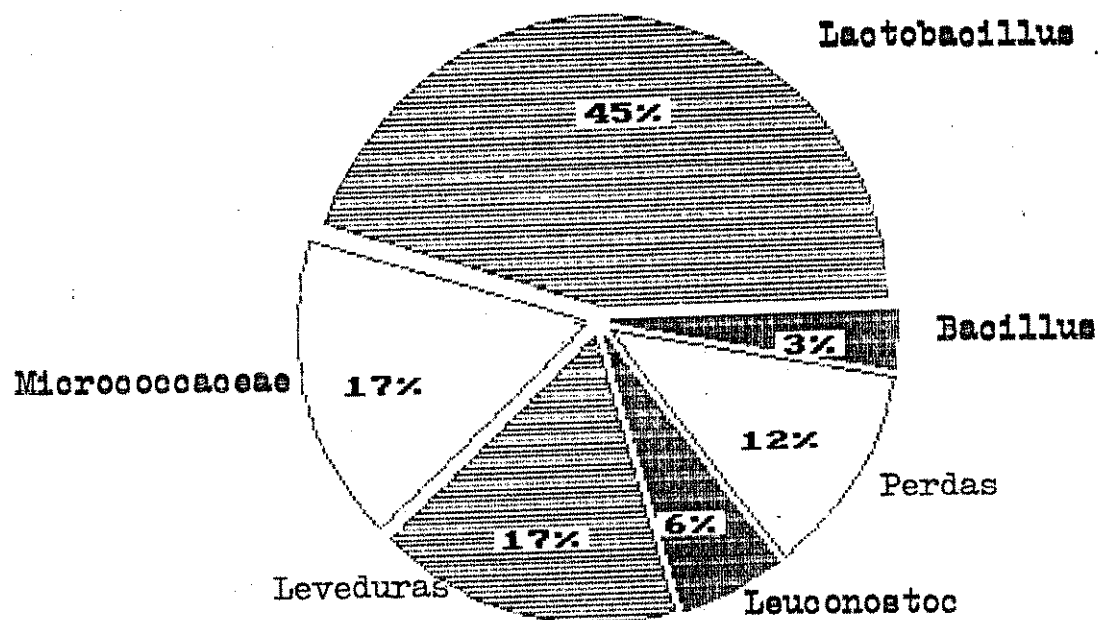
4. VARIAÇÃO NA MICROBIOTA DO CALDO DURANTE O RESFRIAMENTO

Amostras da entrada da torre - De um total de 114 microrganismos isolados das amostras da entrada, 14 foram perdidos, 51 foram classificadas como *Lactobacillus*, 20 como pertencentes à família *Micrococcaceae*, 19 como leveduras, 17 como *Leuconostoc* e 3 como *Bacillus* (FIGURA 18A).

Os resultados demonstram que o caldo das amostras da entrada, proveniente das etapas de moagem, clarificação e tratamento térmico, trouxe consigo uma carga microbiana composta predominantemente de lactobacilos e, em menor extensão, de estafi-

18 A

ENTRADA



18 B

SAIDA

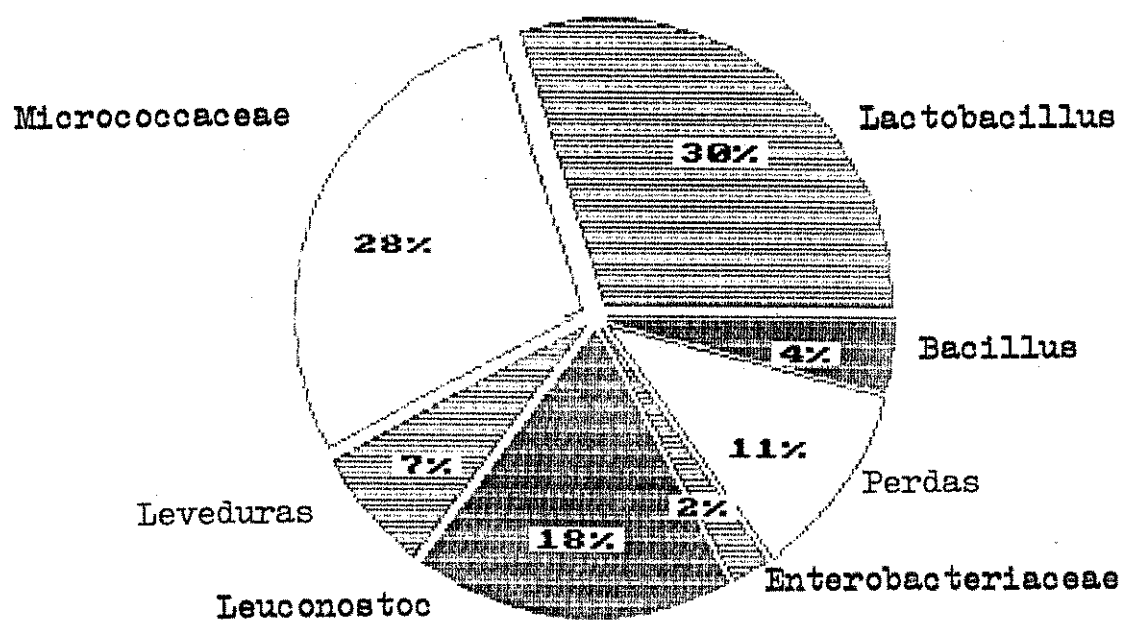


FIGURA 18. Composição da Microbiota das Amostras da Entrada e da Saída da Torre de Resfriamento.

lococos e leveduras. *Leuconostoc* foi raramente encontrado nessas amostras, o que era esperado dado a baixa resistência de *Leuconostoc* ao tratamento térmico (GARVIE, 1986).

Amostras da saída da torre - De um total de 103 microrganismos isolados de amostras da saída, 11 foram perdidos, 31 foram classificados como *Lactobacillus*, 29 como pertencentes à família *Micrococcaceae*, 19 como *Leuconostoc*, 7 como leveduras, 4 como *Bacillus* e 2 como *Enterobacteriaceae* (FIGURA 18B).

De acordo com os resultados, as amostras da saída apresentaram uma incidência comparativamente menor de lactobacilos e uma elevação bastante acentuada do número de cepas de *Leuconostoc*.

Dentre o total de microrganismos isolados e caracterizados, 73% das leveduras, 62% dos lactobacilos e 43% das *Micrococcaceae* encontravam-se já no caldo, antes da passagem pela torre (FIGURA 19). O número de leuconostocos, entretanto, que encontrava-se baixo na entrada, sofreu uma elevação de 46% na porcentagem de incidência, depois que o caldo passou pelo resfriamento na torre (de 27% na entrada para 73% na saída).

Assim, os resultados indicam que a passagem do caldo pelo resfriamento na torre afetou significativamente a distribuição percentual dos tipos de microrganismos presentes no caldo, particularmente as bactérias lácticas, com uma acentuada elevação na contagem de leuconostocos.

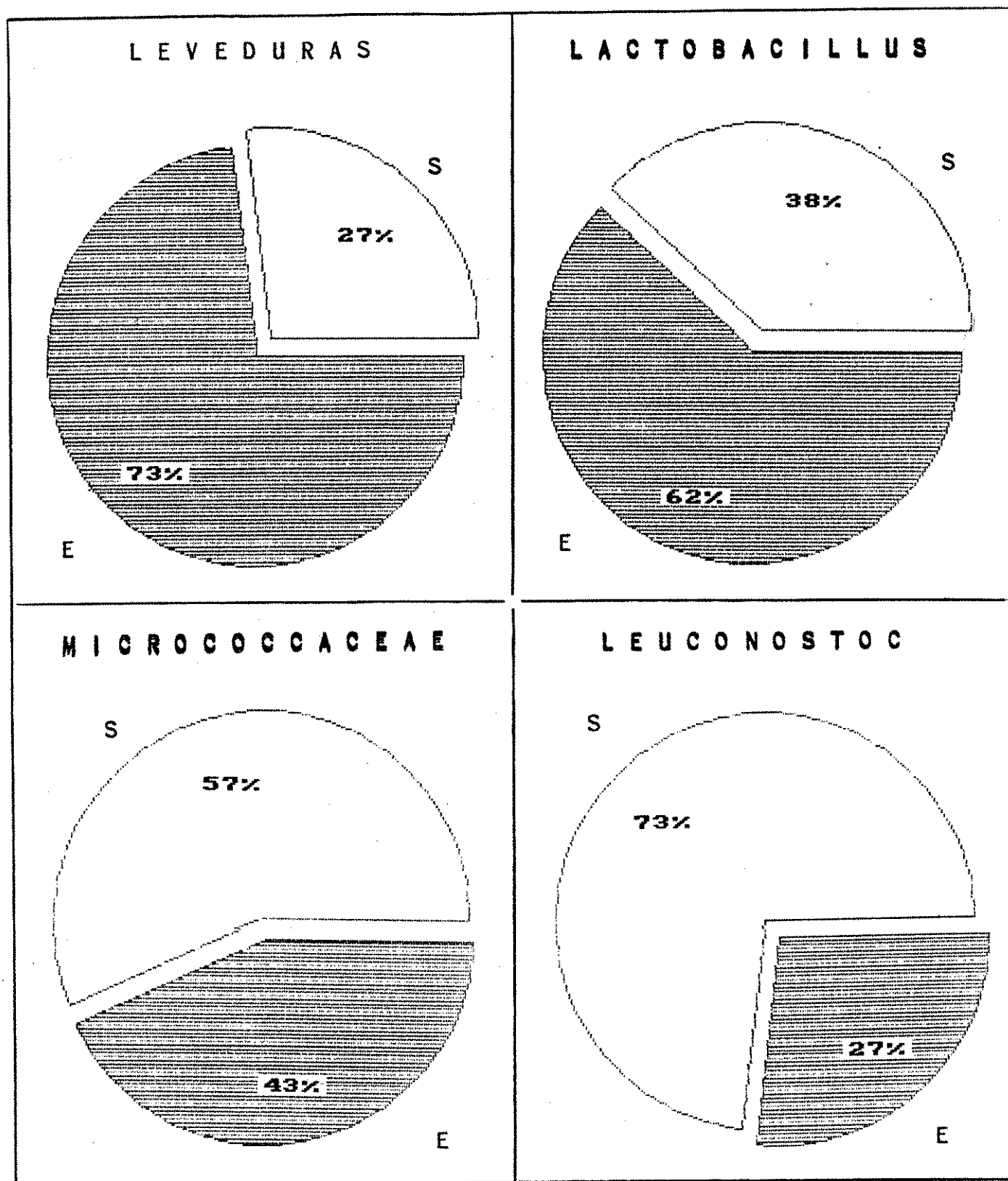


FIGURA 19. Frequência de Incidência de cada tipo de Microorganismo Isolado nas amostras da Entrada (E) e da Saída (S).

O fato de a contagem de leuconostocques elevar-se durante o resfriamento na torre pode indicar a possível presença de focos de contaminação no equipamento, não eliminados durante a sanificação. Dado as cepas de *Leuconostoc* isoladas terem sido predominantemente formadoras de goma, o método de limpeza utilizado na torre provavelmente não foi eficaz para eliminar as bactérias presentes em eventuais focos de contaminação, devido ao material polissacarídico altamente viscoso e aderente que as envolve. Com base nesses dados, é válido supor que a utilização das torres certamente exigirá medidas mais efetivas de sanificação, para eliminar focos de contaminação por bactérias formadoras de goma como *Leuconostoc*, pois uma acentuada elevação na população de leuconostocques no caldo que destina-se diretamente ao preparo do mosto poderá incorrer em sérios problemas de fermentação láctica paralela à fermentação alcoólica. Tratando-se de bactéria formadora de dextrano, o problema pode tornar-se ainda mais grave, devido aos transtornos que a goma altamente viscosa e aderente pode trazer para a turbinação do mosto fermentado e para a limpeza e desinfecção das dornas atingidas.

5. VARIAÇÃO DA MICROBIOTA EM FUNÇÃO DO MEIO DE ISOLAMENTO

Plaqueamento em PCA - De um total de 102 microrganismos isolados a partir de plaqueamento em PCA, 4 foram perdidos, 43 foram classificados como pertencentes à família *Micrococcaceae*, 19 como *Leuconostoc*, 17 como leveduras e 2 como *Bacillus* (FIGURA 20A).

Os resultados demonstram que, do plaqueamento em PCA, foram isolados predominantemente cocos Gram positivos (*Micrococcaceae* e *Leuconostoc*), que constituíram 61% do total de linhagens originárias de PCA.

Plaqueamento em MRS - De um total de 115 microrganismos isolados a partir de MRS, 21 foram perdidos, 65 foram classificados como *Lactobacillus*, 9 como leveduras, 7 como *Leuconostoc*, 6 como pertencentes à família *Micrococcaceae*, 5 como *Bacillus* e 2 como *Enterobacteriaceae* (FIGURA 20B).

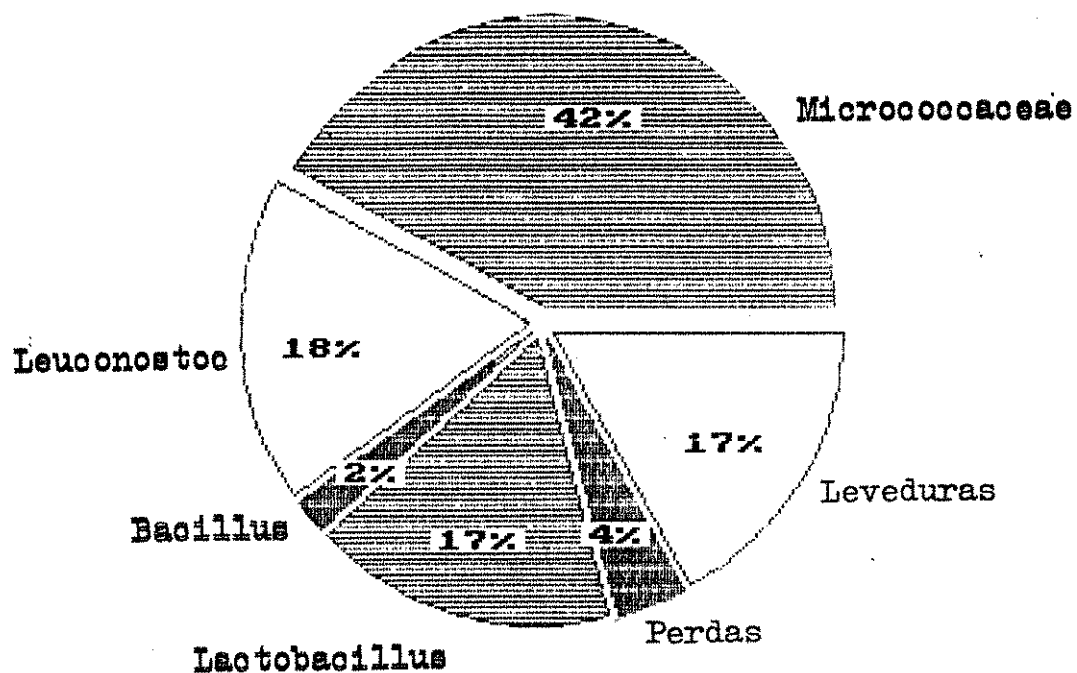
Assim, de MRS foram isolados predominantemente bastonetes Gram positivos (61%) dos quais 57% foram lactobacilos.

A FIGURA 21 mostra que 79% das cepas de lactobacilos foram recuperadas a partir de MRS, enquanto 88% das *Micrococcaceae*, 73% dos leuconostocos e 65% das leveduras o foram a partir de PCA.

De acordo com os resultados, pode-se observar que a contagem em MRS estimou particularmente a população de lactobacilos nas amostras e não a população total de bactérias lácticas, dado *Leuconostoc* ter sido raramente encontrado em placas de MRS.

20 A

PCA



20 B

MRS

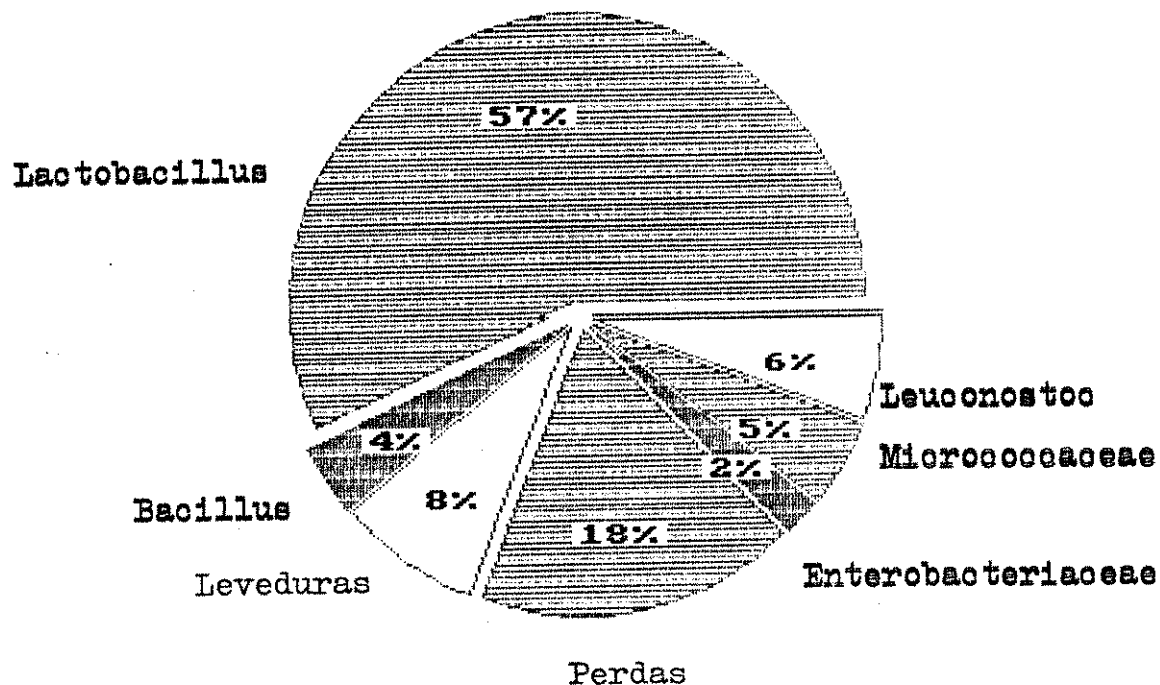


FIGURA 20. Composição da Microbiota Isolada a partir do plaqueamento em PCA e MRS.

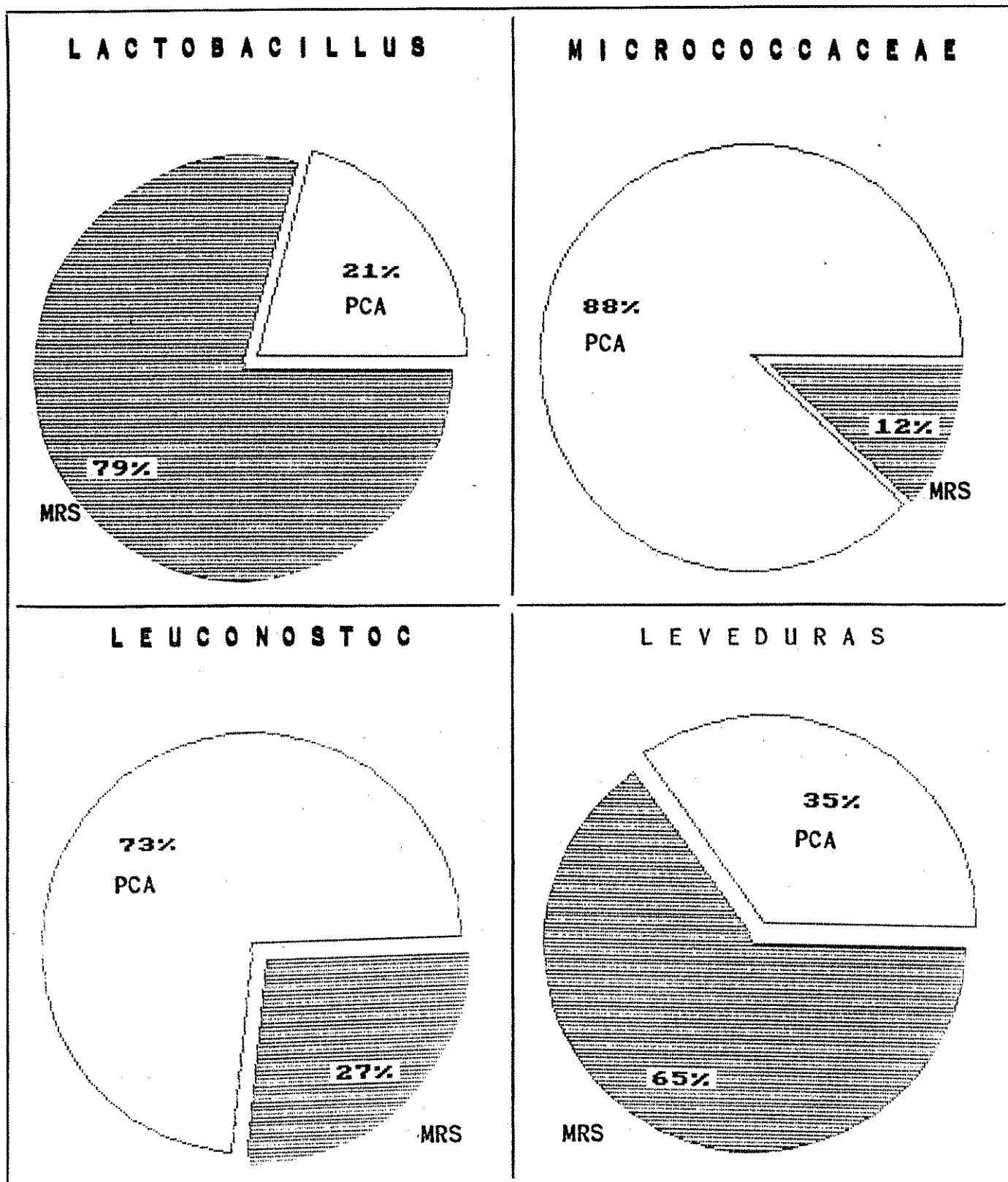


FIGURA 21. Frequência de Incidência de cada tipo de microrganismo isolado em placas de PCA e MRS.

Por outro lado, a contagem em PCA estimou particularmente a população de cocos Gram positivos e leveduras, em detrimento de lactobacilos.

Tais resultados parecem coerentes com o fato de as contagens em PCA terem registrado maiores elevações na população do que as contagens em MRS, pois foram exatamente os cocos Gram positivos e *Leuconostoc* em particular, predominantemente isolados de PCA, que tiveram suas populações elevadas na Torre.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados das análises efetuadas nas amostras de caldo de cana provenientes do resfriamento na torre de resfriamento da Usina MODELO, chegou-se às seguintes conclusões:

1. As contagens microbianas evidenciaram que o resfriamento em torre promoveu uma significativa variação quantitativa na microbiota contaminante do caldo, registrando, da entrada para a saída, elevações médias de 18 vezes nas contagens em MRS e de 33 vezes nas contagens em PCA.

2. A elevação da carga contaminante foi usualmente acompanhada de redução no valor do pH das amostras que apresentaram, em média, valores trinta e cinco décimos menores, da entrada para a saída da torre.

3. O paralelismo entre elevação na carga contaminante e redução no valor do pH sugere a possibilidade de prognosticar significativas variações quantitativas na população do caldo na torre observando-se sensíveis variações no pH.

4. A população microbiana do caldo mostrou-se predominantemente bacteriana (88%), Gram positiva (87%) e lática (50%).

5. O contaminante mais frequente foi *Lactobacillus* (38%), seguido de bactérias pertencentes à família *Micrococcaceae* (23%) das quais 22,5% pertencentes ao gênero *Staphylococcus*. Bactérias pertencentes ao gênero *Leuconostoc* (12%) e leveduras (12%) foram encontrados com menor frequência e cepas pertencentes ao gênero *Bacillus* apresentaram baixa incidência (3%). Bactérias Gram negativas, praticamente ausentes (1%), foram classificadas como pertencente à família *Enterobacteriaceae*.

6. As cepas de lactobacilos isoladas foram predominantemente heterofermentativas (98%), termodúricas (79%) e lactose negativas (62%). As espécies mais frequentes foram *L.fermentum*/ *L.reuteri* (47%) e *L.confusus* (18%), seguidos de *L.viridescens* (11%), *L.brevis* / *L.buchneri* (4%) e *L.plantarum* (2%).

7. As cepas predominantes de *Leuconostoc* foram as subespécies formadoras de goma (73%), *L.mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (50%) e subsp. *dextranicum* (23%), seguidas de *L.paramesenteroides* (27%).

8. Considerando-se as cepas *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, a frequência de bactérias formadoras de goma nas amostras de caldo analisadas foi de 17% do total de isolados.

9. A carga microbiana das amostras da entrada da torre, procedentes das etapas de moagem, clarificação e tratamento térmico, compôs-se predominantemente de **Lactobacillus** (45%) e em menor grau de **Micrococcaceae** (17%). **Leuconostoc** foi raramente encontrado nessas amostras (6%).

10. Durante o resfriamento em torre, entretanto, as amostras sofreram não só uma elevação quantitativa na carga microbiana, como também evidenciou-se uma significativa variação na distribuição percentual dos tipos de microrganismos presentes - a população de lactobacilos caiu em 24% e a de leveduras em 46%, enquanto **Micrococcaceae** elevou-se em 18% e **Leuconostoc** em 46%.

11. Assim, notou-se que a passagem do caldo pelo resfriamento em torre afetou particularmente a população de bactérias lácticas, com uma acentuada elevação na contagem de **Leuconostoc** e consequente alteração na distribuição percentual dos demais contaminantes.

12. Com base em tais resultados é possível diagnosticar a presença de focos de contaminação não eliminados durante a limpeza da torre, provavelmente devido ao material polissacarídico aderente que envolve as células de **Leuconostoc**. Esse fato leva à conclusão de que a utilização das torres certamente exigirá medidas mais eficientes de sanificação - uma acentuada elevação na população de bactérias lácticas formadoras de goma no caldo que destina-se diretamente ao preparo do mosto poderá incorrer em

graves problemas de fermentação láctica paralela à fermentação alcoólica, com acúmulo de goma que redundaria em dificuldades na turbinação do mosto fermentado e na limpeza e desinfecção das dornas atingidas.

13. Considerando-se que os tipos que tiveram suas populações elevadas na torre (os cocos Gram positivos, particularmente *Leuconostoc*) foram isolados predominantemente de PCA (88% das *Micrococcaceae* e 73% dos *Leuconostoc*), parece natural que as contagens em PCA tenham registrado maiores variações quantitativas na carga contaminante das amostras.

14. As contagens em PCA estimaram eficientemente a população de leveduras, *Micrococcaceae* e *Leuconostoc*, parecendo portanto mais indicadas para determinar as variações quantitativas da carga contaminante do caldo durante o resfriamento na torre.

14. As contagens em MRS estimaram particularmente a população de *Lactobacillus* nas amostras, parecendo mais indicadas para a recuperação de lactobacilos a partir do caldo, já que constituíram-se no contaminante mais frequente. MRS, entretanto, não parece indicado para a estimativa da população total de bactérias lácticas no caldo pasteurizado das amostras resfriadas na torre, pois *Leuconostoc* foi raramente recuperado a partir de MRS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-ELNAGA, I.G. and KANDLER, O., 1965. Zur Taxonomie der Gattung *Lactobacillus* Beijerinck. I. Das subgenus *Streptobacterium* Orla-Jensen. Zentralbl. Bakteriologie II Abt. 119, 1-36. Citado por KANDLER and WEISS (1986).
- ALFORD, A. and McCLESKEY, C.S., 1942. Some observation on the bacteria causing slime in cane juice. Proc. La Acad. Sci. 6, 36-42. Citado por TILBURY (1975).
- ALMEIDA, J.R. e LIMA, V.A., 1953. O emprego de Emulsan AL na fermentação alcoólica. Bol. do Inst. Zimotécnico 6, 1-24.
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. e CAMPOS, H., 1981. Infecção, problema sério na produção de álcool. Anais do 2º Congresso Nacional da Sociedade de Técnicos Açucareiros do Brasil, Vol. IV, 158-168.
- AMORIM, H.V. e OLIVEIRA, A.J., 1982. Infecção na fermentação: como evitá-la. Açúcar e Alcool 5, 12-18.
- ANONIMO, 1983a. Manual de Controle Microbiológico da Usina de Açúcar e Alcool. Cadernos Copersucar - Série Industrial, 005. Centro de Tecnologia Copersucar.
- ANONIMO, 1983b. Controle Microbiológico da Usina de Açúcar e Alcool. Boletim Técnico Copersucar 22, 2-17.
- AQUARONE, E., 1958. Ação da tetraciclina em fermentação alcoólica de mosto de melaço. Bol. do Depart. de Química da Escola Politécnica da USP 11, 45-52.

- AQUARONE, E.; BARUFFALDI, R. e NACCO, R., 1968. Emprego de associações de antibióticos na fabricação de álcool por fermentação. Rev. da Faculd. de Farm. e Bioq. da USP 6, 257-308.
- AUCLAIR, J. and ACCOLAS, J.P., 1983. Use of thermophilic lactic starters in the dairy industry. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 49, 313-326.
- BARRETO, A., 1949. Policlorofenóis em fermentação de carboidratos. C. Abst. 43(17), 6782. Cia. Quím. Monsanto, US 2473.630.
- BERGAN, T. and KOCUR, M., 1986. Genus *Stomatococcus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. II, Section 12, 1008-1010. SNEATH et al. eds., Williams & Wilkins, Baltimore.
- BERKWITH, T.D., 1931. The bacteriology of pulp slime. *J. Bacteriology* 22, 15-22.
- BEVAN, D. and BOND, J., 1971. Microorganisms in Field and Mill - a preliminary survey. *Proc. Qd. Soc. Sugar Cane Technol.*, 38th Confer., 137-143.
- BIEDE, S.L.; REINBOLD, G.W. and HAMMOND, E.G., 1976. Influence of *Lactobacillus bulgaricus* on microbiology and chemistry of Swiss cheese. *J. Dairy Sci.* 59, 854-858.
- BOTAZZI, V.M.V. and DELLAGLIO, F., 1973. Microbiology of Grana cheese. IX. Characteristics and distribution of *Lactobacillus helveticus* biotypes in natural whey cheese starter. *Sci. Tech. Latt. casear* 24, 23-39. Citado por KANDLER and WEISS (1986).

- BOUDAREL, M.J. et RAMIREZ, A., 1984. Détermination des différentes souches bactériennes contaminantes du jus de betterave et du mout fermenté en distillerie agricole. Ind. Alim. Agricole 101(1-2), 5-11.
- BRENNER, D.J., 1984. Family **Enterobacteriaceae**. In: Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology, Vol.1, Section 5, 408-420. KRIEG and HOLT eds., Williams & Wilkins, Baltimore.
- BRUIJN, J., 1966a. Deterioration of sugar cane after harvesting - Part I. Changes in juice composition. Int.Sugar Journal, Volume LXVIII, 331-334.
- BRUIJN, J., 1966b. Deterioration of sugar cane after harvesting - Part II. Investigation of the polisaccharide formed. Int. Sugar Journal, Volume LXVIII, 356-358.
- BRYAN-JONES, G., 1975. Lactic acid bacteria in distillery fermentation. In: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food, Section II, 165-175. CARR et al. eds., Academic Press, London.
- CANHOS, V.P., 1980. Microorganisms isolated from sand filtered by water and the proteolytic activity of a **Flavobacterium** isolate. Tese de Doutorado, Oregon State University, USA.
- CARR, J.G. and DAVIES, P.A., 1970. Homofermentative lactobacilli of ciders including **Lactobacillus mali** nov.spec. Journal of Appl.Bact. 33, 768-774.
- CARR, J.G. and DAVIES, P.A., 1972. The ecology and classification of **Lactobacillus collinoides** nov.spec. A bacterium commonly found in fermenting aple juice. J.Appl.Bact. 35, 463-471.

- CARR, J.G., 1975. Lactics in the world unite. In: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food, Section II, 165-175. CARR et al. eds., Academic Press, London.
- CARR, J.G.; CUTTING, C.V. and WHITING, G.C. eds., 1975. Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. Academic Press, London.
- CARR, J.G., 1983. Microbes I have Known: A study of those associated with fermented products. J. Appl Bact. 55, 383-401.
- CARRUTHERS, S.A. and OLDFIELD, J.F.T., 1965. The activity of thermophilic in sugar beet diffusion system. Proc. British Sugar Corporation, 8.
- CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; BISNO, A.L. and BEACHEY, E.H., 1982. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect. Immun. 37, 318-326. Citado por KLOOS and SCHLEIFER (1986).
- CLARK, M.A.; ROBERTS, E.J.; GODSHALL, M.A.; BRANNAN, M.A.; CARPENTER, F.G. and COLL, E.E., 1980. Sucrose loss in the manufacture of cane sugar. Sugar Y Azucar 75(9), 64-68.
- CLAUS, D. and BERKELEY, R.C.W., 1986. Genus *Bacillus*. In: Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology, Vol. II, Section 13, 1105-1139. SNEATH et al. eds., Williams & Wilkins, Baltimore.
- CURRAN, H.R.; ROGERS, L.A. and WHITTIER, E.O., 1933. Journal of Bacteriology 25, 595-621. Citado por SKERMAN, V.B.D. ed., 1969, In: Abstracts of Microbiological Methods, 355.
- DAVIS, J.G., 1975. The microbiology of yoghurt. In: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food, Section IV, 245-263. CARR et al. eds., Academic Press, London.

- DELAPORTE, B., 1964a. Etude comparée de grand spirilles formant des spores: *Sporopirillum* (*Spirillum*) *praeclarum* (COLLIN) n.g., *Sporopirillum gyrini* n.sp. et *Sporopirillum bisporum* n.sp. Ann.Inst.Pasteur (Paris) 107, 246-262. Citado por SNEATH (1986).
- DELAPORTE, B., 1964b. Etude descriptive de bactéries de très grandes dimensions. Ann.Inst.Pasteur (Paris) 107, 845-862. Citado por SNEATH (1986).
- DELAPORTE, B., 1969. Une nouvelle espèce de *Fusosporus*, *Fusosporus minor* n.sp. C.R.Acad.Sci.Paris Ser.D Sci.Nat. 268, 1454-1455. Citado por SNEATH (1986).
- DOORES, S. and WESTHOFF, D.C., 1983. Selective method for the isolation of *Sporolactobacillus* from food and environmental sources. J.Appl.Bact. 54, 273-280.
- DUNCAN, C.L. and COLMER, A.R., 1964. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. Appl.Microbiol. 12, 173-177.
- EDMONDSON, A.S. and COOKE, E.M., 1979. The development and assessment of a bacteriocin typing method for *Klebsiella*. J.Hyg. London 82, 207-223. Citado por ORSKOV (1984).
- EGAN, B.T. and REHBEIN, C.A., 1963. Bacterial deterioration of mechanically harvested cut-up sugar cane during storage over weekends. Proc.Qd.Soc.Sugar Cane Technol., 30th Conf., 11-25.
- EGAN, B.T., 1964. Investigation into the sour storage rot problem. Proc.Qd.Soc.Sugar Cane Technol., 31st Conf., 15-26.
- EGAN, B.T., 1965. The infection process in sour storage rot. Proc.Qd.Soc.Sugar Cane Technol., 33rd Conf., 21-24.

- EGAN, B.T., 1966. Some effects of sour storage rot on cane juice quality. Proc. Qd. Soc. Sugar Cane Technol., 33rd Conf., 1-20.
- EISEMBERG, R.C. and EVANS, J.B., 1963. Can. J. Microb. 9, 633-642. Citado por SKERMAN, V.B.D. ed., 1969, In: Abstracts of Microbiological Methods, 797.
- FAVILLE, L.W., 1947. A study of gum-forming bacteria isolated from cane juice. M.S. Thesis, Louisiana State University. Citado por TILBURY (1975).
- FIELDS, M., 1975. Método para estudo das bactérias termófilas esporulantes com ênfase a solo e esterilização em indústrias de alimentos e saúde. Publicada pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia - Campinas, SP.
- FINGUERUT, J.; LUCREDI, H.A. e ROSSEL, C.E.V., 1983. Fermentação alcoólica em Usinas Cooperadas: Evolução e perspectivas. Boletim Técnico da Copersucar 23, 8-11.
- FORNACHON, J.C.M.; DOUGLAS, H.C. and VAUGHN, R.H., 1940. The pH requirements of some heterofermentative species of *Lactobacillus*. J. Bact. 40, 649-655.
- FORNACHON, J.C.M.; DOUGLAS, H.C. and VAUGHN, R.H., 1949. *Lactobacillus trichodes* nov. sp., a bacterium causing spoilage in appetizer and dessert wines. Hilgardia 19, 119-132. Citado por KANDLER and WEISS (1986).
- FOSTER, D.H., 1969. Sugar processing difficulties. Aust. Sugar J. 60, 529-531.
- FURLETTI, M.E.M.; OLIVEIRA, M.C.F.L. e ANGELIS, D.F., 1981. Perspectivas do uso de biocidas não convencionais na desinfecção da fermentação etanólica. Brasil Açucareiro 3, 65-69.

- GAI, F., 1945. Os antissépticos na fermentação alcoólica. Boletim da Soc. Bras. Agron. (Rio de Janeiro) 8(4), 377-382.
- GALLI, Z.F., 1961. Fermentação do mel final das Usinas de Açúcar. Anais da II Semana de Fermentação Alcoólica, Vol. II, 297-304. Instituto Zimotécnico, Piracicaba - SP.
- GARVIE, E.I., 1960. The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. J. Dairy Res. 27, 283-292.
- GARVIE, E.I., 1972. Some properties of gas-forming lactic acid bacteria and their significance in classification. In: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food, Section VI, 339-349. CARR et al. eds, Academic Press, London.
- GARVIE, E.I., 1986. Genus *Leuconostoc*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. II, Section 12, 1071-1075. SNEATH, P.H.A. et al. eds., Williams & Wilkins, Baltimore.
- GHERNA, R.L., 1981. Preservation. In: Manual of Methods for General Bacteriology, 208-220. GERHARDT, P. ed., American Society for Microbiology, Washington.
- GORDON, R.E.; HAYNES, W.C. and PANG, C.H.N., 1973. The genus *Bacillus*. In: Handbook 427 of U.S. Department of Agriculture, Washington. Citado por CLAUS and BERKELEY, (1986).
- GUICHARD, P., 1896. Microbiologie du distillateur, Cap. X, 261-266. Bailliere et fils éditeurs.
- HARRIGAN, W.F. and McCANCE, M.E., 1966. Laboratory Methods in Microbiology. Academic Press, London/New York.
- HAUDUROY, P., 1951. Techniques Bactériologiques. Masson et Cie. éditeurs, Paris. Citado por SKERMAN, V.B.D. ed., 1969, In: Abs. of Microbiological Methods, 357.

- HENNENBERG, G. and MARWITZ, R., 1963. Über die struktur von Bakterienkolonien. Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. I. Referate 187, 43-68. Citado por CLAUS and BERKELEY (1986).
- IANDOLO, J.J.; ORDAL, Z.J. and WITTER, L.D., 1964. Can. J. Microb. 10, 808-811. Citado por SKERMAN, V.B.D. ed., 1969, In: Abs. of Microbiological Methods, 797.
- KANDLER, O., 1982. Cell wall structures and their phylogenetic implications. Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. C3, 149-160. Citado por SNEATH (1986).
- KANDLER, O. and WEISS, N., 1986. Regular Nonsporing Gram Positive Rods. In: Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology, Vol. II, Section 14, 1208-1234. SNEATH et al. eds., Williams & Wilkins, Baltimore.
- KITAHARA, K. and SUZUKI, J., 1963. *Sporolactobacillus* nov. subgen. J. Gen. Appl. Microb. 9, 59-71.
- KITAHARA, K. and LAI, C.I., 1967. On the spore formation of *Sporolactobaccillus inulinus*. J. Gen. Appl. Microb. 13, 197-203.
- KITAHARA, K. and TOYOTA, L., 1972. Auto-spheroplastization and cell permeation in *Sporolactobacillus inulinus*. J. Gen. Appl. Microb. 18, 99-107.
- KLOOS, W.E. and SCHLEIFER, K.H., 1986. Genus *Staphylococcus*. In: Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology, Vol. II, Section 12, 1013-1035. SNEATH et al. eds., Williams & Wilkins, Baltimore.

- KNAYSI, G., 1951. Elements of bacterial citology. Comstock Publishing Company, Ithaca, N.Y. Citado por CLAUS and BERKELEY (1986).
- KOCUR, M., 1986a. Genus *Micrococcus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. II, Section 12, 1004-1008. SNEATH et al. eds., Williams & Wilkins, Baltimore.
- KOCUR, M., 1986b. Genus *Planococcus*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. II, Section 12, 1011-1013. SNEATH et al. eds., Williams & Wilkins, Baltimore.
- KRIEG, N.R. and HOLT, J.G. eds., 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. II, Williams & Wilkins, Baltimore.
- LIMA, U.A.; GOLDONI, J.S.; CEREDA, M.P. e SOUZA, L.G., 1974. Ocorrência de microorganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. Brasil Açucareiro 4, 337-343.
- MacFADDIN, J.F., 1980. Biochemical Tests For Identification of Medical Bacteria, Second Edition. Williams & Wilkins, Baltimore.
- MacMASTER, L.D. and RAVNO, A.B., 1975. Sucrose loss in diffusion with reference to the thermophilic bacteria and lactic acid. Proc. South African Sugar Technol. Ass. 49, 49-52.
- MacMASTER, L.D. and RAVNO, A.B., 1977. The occurrence of lactic acid and associated microorganisms in sugar cane processing. Anais Int. Symp. Sugar Cane Technol. 3, 2675-2693.
- MAN, J.C. de; ROGOSA, M. and SHARPE, M.E., 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bact. 23, 130-135.

- MARTUCCI, E.T., 1983. Tecnologia do Açúcar de Cana. Editado pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia, Campinas - SP.
- MAYEUX, P.A., 1960. Some studies on the microbial flora of sugar cane. M.S. Thesis, Louisiana State University. Citado por TILBURY (1975).
- MAYEUX, P.A. and COLMER, A.R., 1960. Study on microflora associated with *Saccharum officinarum*. Sugar J. 23(7), 28-30.
- MCCLESKEY, C.S.; FAVILLE, L.W. and BARNETT, R.O., 1947. Characteristics of *Leuconostoc mesenteroides* from cane juice. J. Bact. 54, 697-708.
- MILLSTEIN, C.H.; TOBIN, L. and MCCLESKEY, C.S., 1941. A bacteriological study of the manufacture of raw cane sugar. Sugar J. 3, 13-14.
- MONVOISON, A., 1910. Alcool et Destillerie. Octane Doin et fils éditeurs, Paris.
- MURRAY, R.G.E., 1986. Family *Deinococcaceae*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. II, Section 12, 1035-1043.
- NEVES, L.B., 1938. Tecnologia da fabricação de álcool. Rev. Bras. de Química, Cap. VII, 89-134.
- NIVEN, C.F. Jr. and EVANS, J.B., 1957. *Lactobacillus viridescens* nov. spec. a heterofermentative species that produces a green discoloration of cured meat pigments. J. Bact. 73, 758-759.
- NORRIS, J.R.; BERKELEY, R.C.W.; LOGAN, N.A. and O'DONNELL, A.G., 1981. The Genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: STARR et al. eds. The Prokaryotes - A Handbook on Habitats and Identification of Bacteria, Vol. II, 1711-1742. Springer-Verlag, Berlin.

- OKADA,S.; TOYOTA,T.; KOZAKI,M. and KITAHARA,K.,1976. Studies on the cell wall of *Sporolactobacillus inulinus*. J.Agric.Chem. Soc.of Japan 50,259-263.
- OLIVER,W.H.,1952. J.Gen.Microb.7,329-334.Citado por SKERMAN ed., 1969, In: Abs.of Microbiological Methods, 359.
- ORLA-JENSEN,S.,1919. The Lactic Acid Bacteria. Andr .Fred. Host and Son.,Copenhagen.
- ORSKOV,I.,1984. Genus *Klebsiella*. In: Bergey's Manual of Siste-matic Bacteriology, Vol.1, Section 5, 461-465. KRIEG and HOLT eds.,Williams & Wilkins, Baltimore.
- OWEN,W.L.,1911. A recently discovered bacterial decomposition of sucrose. J.Ind.Eng.Chem.3,481-486.
- OWEN,W.L.,1977. Microbiology of sugar manufacture and refining. In: Cane Sugar Handbook,10th Ed.,405-422. Meade and Chen eds.
- PASTEUR,L.,1873. Etudes sur le vin. Paris.
- PEDERSON,C.S.,1938. A bacteriological study of raw cane sugar plants.J.Bacteriol.35,74-75.
- PEDERSON,C.S. and HUCKER,G.J.,1946. The significance of bacteria in sugar mills.Proc.Assoc.Tech.Azucar.Cuba,20th Mtg.,225-230.
- PELCZAR Jr.,M.J.ed.,1957. Manual of Microbiological Methods. So-ciety of American Bacteriologists, Committee on Bacteriologi-cal Technic. MacGraw Hill Book Company, New York.
- PERQUIM,L.H.C.,1940. On the incidental occurence of rod shaped, dextran-producing bacteria in a beet sugar factory. Antoine van Leeuwenhoek 6,227-249.

- PETERS,G.R.L.and PULVERER,G.,1982. Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surface of intravenous catheters. J.Inf.Dis.146, 479-482. Citado por KLOOS and SCHLEIFER (1986).
- RICHARD,C.,1984. Genus *Enterobacter*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.I,Section 5,465-469. KRIEG and HOLT eds., Williams & Wilkins, Baltimore.
- SATO,S.; BRAZZACH,M.L.e AQUARONE,E.,1980. Estudo comparativo entre vários desinfetantes para controle de contaminações nas fermentações alcoólicas e mostos de melão de cana. Rev.da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP 16(1/2),133-144.
- SCARR,M.P.,1968. Thermophiles in sugar. J.Appl.Bact.31,66.
- SCHLEIFER,K.H.,1986. Gram Positive Cocci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.II, Section 12, 999-1008. SNEATH et al.eds., Williams & Wilkins, Baltimore.
- SERRA,G.E.; CEREDA,M.P.; PERES,R.J.F.; BERTOZO,M.T. e VICENTE,A.T., 1979. Contaminação da fermentação alcoólica - floculação do fermento. Brasil Açucareiro, Vol.XCIII,6.
- SHARPE,M.E.,1962.Taxonomy of the lactobacilli. Dairy Sci.Abs.24, 109-118.
- SHARPE,M.E.; GARVIE,E.I. and TILBURY,R.H.,1972. Some slime forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. Appl.Microbiol. 23, 389-397.
- SHARPE,M.E.,1981. *Lactobacillus*. In:The Prokaryotes - A Handbook on Habitats and Identification of Bacteria, Vol.II,1653-1679. STARR et al.eds., Springer-Verlag, Berlin.

- SHEHATA, A.M.E., 1960. Yeasts isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardente de cana. *Appl. Microbiol.* 8, 73-75.
- SILLIKER, J.H. and ELLIOTT, R.P. eds., 1980. *Microbial Ecology of Foods, Vol. II, Food Commodities. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods of International Association of Microbiological Societies.* Academic Press, New York.
- SIMS, W., 1964. *J. Path. Bact.* 87, 99-105. Citado por SKERMAN, V.B.D. ed., 1969, In: *Abs. of Microbiological Methods*, 361.
- SKERMAN, V.B.D. ed., 1969. *Abstracts on Microbiological Methods.* Wiley-Interscience / John Wiley & Sons Inc., New York.
- SLOPEK, S. and MAREZ-BABCZYSZYN, J., 1967. A working scheme for typing *Klebsiella* bacilli by means of pneumocins. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 15, 525-529. Citado por ORSKOV (1984).
- SMIEBERT, R.M. and KRIEG, N.R., 1981. General Characterization. In: *Manual of Methods for General Bacteriology*, Cap. 20, 409-449. GERHARDT, P. ed., American Society for Microbiology, Washington.
- SNEATH, P.H.A., 1986. Endospore-forming Gram Positive Rods and Cocci. In: *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology, Vol. II, Section 13*, 1104-1105. SNEATH et al. eds., Williams & Wilkins, Baltimore.
- SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. and HOLT, J.G. eds, 1986. *Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology, Vol. II.* Williams & Wilkins, Baltimore.

- SPECK, M.L., 1978. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington.
- STACKEBRANDT, E. and WOESE, C.R., 1981. The evolution of prokaryotes. In: Molecular and Cellular Aspects of Microbial Evolution, 1-31. CARLILE *et al.* eds., Cambridge University Press, Cambridge.
- STARR, M.P.; STOLP, H.; TRUPER, H.G.; BALOWS, A. and SCHLEGEL, H.G. eds., 1981. The Prokaryotes - A Handbook on Habitats and Identification of Bacteria. Springer-Verlag, Berlin
- TILBURY, R.H., 1967. In: Tate and Lyle Ltd. Res. Center, Annual Report for 1967.
- TILBURY, R.H., 1968. Biodeterioration of harvested sugar cane. In: Biodeterioration of Materials, 717-730. WALTERS and ELPHICK eds., Elsevier, Amsterdam.
- TILBURY, R.H., 1970. Biodeterioration of harvested sugar cane in Jamaica. PH.D. Thesis. University of Aston in Birmingham. Cited by TILBURY (1975).
- TILBURY, R.H., 1975. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in sugar industry. In: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food, Section II, 177-191. CARR *et al.* eds., Academic Press, London.
- van KERKEN, A.E. and KANDLER, O., 1966. Die Laktobazillenflora des Tilsiterkases. *Milchwissenschaft* 21, 436-440. Cited by KANDLER and WEISS (1986).

APENDICE

TABELA 1. Características morfológicas e bioquímicas das cepas isoladas.^a

^a Símbolos utilizados:

+ = positivo; - = negativo; (+) = fracamente positivo; ++ = fortemente positivo; 0 = não verificado.

Data da Amostragem - 26 = 26/11/85; 27 = 27/11/85; 28 = 28/11/85.

Ponto de Amostragem - E = Entrada da torre de resfriamento; S = Saída da torre de resfriamento.

Crescimento em meio líquido - S = Sedimento liso; F = Sedimento floculento; T = Turbidez uniforme; P = Película

Características das colônias:

- Forma - P = Puntiforme; C = Circular; F = Filamentosa; I = Irregular.

- Elevação - F = Plana; R = Elevada; C = Convexa; P = Pulvinada; U = Umbonada.

- Margem - E = Perfeita; U = Ondulada; I = Irregular.

Pigmentação (verificada em PCA) - Am = Amarela; La = Laranja; Ro = Rosea; Ca = Castanha.

Morfologia - B = Bastonete; C = Coco; Cb = Cocobacilo; Lev = Levedura.

Arranjo - I = Isolado; P = Pares; T = Tétrades; C = Cachos; Cd = Cadeias.

O/F Glucose - O = Oxidativo; F = Fermentativo; A = Alcalino; G = Gás; I = Inerte; () Reação lenta.

Teste de Litmus milk - A = Acidificação; C = Coagulação; R = Redução; D = Digestão; Alk = Alcalinização.

^b Reação alcalina em presença de oxigênio.

TABELA 1. Características morfológicas e bioquímicas das cepas isoladas.

Número da Cultura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Data da Amostragem	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
Ponto de Amostragem	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	S	S	S
Tempo de Amostragem	0	0	0	0	0	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Temper. da Amostra (°C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PH da Amostra	5,97	5,97	5,97	5,97	5,97	5,96	5,96	5,96	5,96	5,96	5,96	5,96	5,96	5,96	5,96	5,96	5,96	5,72	5,72	5,72
Meio de Plaqueamento	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	NRS	NRS
Cresc. em Meio Liq.	S	ST	F	ST	ST	ST	ST	ST	SRT	ST	ST	S	ST	ST	ST	ST	S	F	SRT	ST
Carac. das Colônias	CPE	P	P	P	P	P	CCE	P	0	0	P	0	CRE	CRE	P	CFE	CRE	P	0	CFE
Pigmentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	La	La	-	-	-	-	-	La
Gram	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+
Morfologia	Lev	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	C	C	B	C	Lev	B	B	C
Arranjo	I	I	Cd	I	I	I	I	I	I	I	I	I	IPTC	IPTC	I	PTC	I	Cd	I	IPTC
Motilidade	/	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	/	-	-	-	-	/	-	/	-
Esporos	/	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	/	-	-	-	-	/	-	/	-
Reação de Catalase	/	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	/	+	+	-	+	/	-	/	+
Reação de Oxidase	/	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	/	0	0	0	0	/	0	/	0
O/F Glucose	/	(F)	(F)	(F)	I	I	F	(F)	/	/	(F)	/	OF	OF	I	OF	/	I	/	OF
Gás de Glucose (CO ₂)	/	+	+	+	+	+	+	+	/	/	+	/	+	+	+	+	/	+	/	+
Rafinose	/	+	+	-	+	+	-	-	/	/	0	/	0	0	-	0	/	+	/	0
Celobiose	/	-	-	-	-	-	-	-	/	/	+	/	0	0	-	0	/	+	/	0
Trealose	/	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	/	0	0	0	0	/	0	/	0
Arabinose	/	+	-	+	-	+	+	+	/	/	+	/	0	0	-	0	/	-	/	0
Frutose	/	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	/	0	0	0	0	/	0	/	0
Lactose	/	+	+	-	+	-	+	-	/	/	-	/	0	0	-	0	/	+	/	0
Sacarose	/	+	+	+	+	+	+	+	/	/	-	/	0	0	-	0	/	+	/	0
Maltose	/	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	/	0	0	0	0	/	0	/	0
Ribose	/	+	+	0	+	+	0	0	/	/	+	/	0	0	+	0	/	+	/	0
Cresc. a 45°C	/	+	+	+	+	+	-	+	/	/	-	/	0	0	-	0	/	+	/	0
20°C	/	-	-	+	-	-	+	+	/	/	+	/	+	+	+	+	/	-	/	+
15°C	/	-	-	+	-	-	+	+	/	/	+	/	+	-	(+)	+	/	-	/	+
6,5% NaCl	/	-	-	+	-	-	+	+	/	/	-	/	+	+	+	+	/	-	/	+
7,5% NaCl	/	-	-	-	-	-	+	-	/	/	-	/	+	+	-	+	/	-	/	+
15% Etanol	/	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	/	0	0	-	0	/	-	/	0
Baird Parker	/	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	/	+	+	0	+	/	0	/	+
Anaerobiose	/	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	/	+	-	0	-	/	0	/	+
Goma 5% Sacarose 20°C	/	-	-	++	-	-	++	++	/	/	-	/	-	-	-	-	/	-	/	-
30°C	/	+	+	++	+	-	++	++	/	/	-	/	-	-	-	-	/	-	/	-
Hidrólise de Amido	/	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	/	-	-	-	-	/	-	/	-
Reação de DNase	/	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	/	-	-	0	-	/	0	/	-
Reação de Lecitinase	/	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	/	+	-	0	+	/	0	/	+
Litmus Milk Teste	/	I	I	A	I	I	I	A	/	/	A	/	I	ACR	A	ACR	/	I	/	I

TABELA 1. Continuação.

Número da Cultura	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Data da Amostragem	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26
Ponto de Amostragem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	E	E	E	E	E	S	S
Tempo de Amostragem	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Temper. da Amostra (°C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PH da Amostra	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,96	5,96	5,96	5,96	5,96	5,72	5,72
Meio de Plaqueamento	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	NRS	NRS
Cresc. em Meio Liq.	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Carac. das Colônias	CFE	CFE	CFE	CFE	CFE	CRE	CRE	CFE	CFE	CRE	CRE	CRE	CRE	P	CRE	CRE	P	CRE	CRE	CCE
Pigmentação	La	La	La	La	-	La	La	-	-	La	La	La	-	-	-	-	-	-	Am	-
Gran	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morfologia	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	Cb	C	C	B
Arranjo	PTC	IPC	IPC	IPC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	IPC	IPC	I	PTC	PTC	I
Motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-
Reação de Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	-
Reação de Oxidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0
O/F Glucose	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	F	OF	OF	F	(OF)	OF	I
Gás de Glucose (CO ₂)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+
Rafinose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	+
Celobiose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	-
Trealose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	+	0	/	0
Arabinose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	-	0	/	+
Frutose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	+	0	/	0
Lactose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	+	0	/	+
Sacarose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	+
Maltose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	+	0	/	0
Ribose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	+
Cresc. a 45°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	-	0	/	+
20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	-
15°C	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	-
6,5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	-
7,5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	-
15% Etanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	-
Baird Parker	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	/	0
Anaerobiose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	(+)	0	+	/	0
Goma 5% Sacarose 20°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	/	-
30°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-
Hidrólise de Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-
Reação de DNase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	-	-	0	-	/	0
Reação de Lecitinas	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	+	/	0
Litmus Milk Teste	I	I	I	I	ACR	I	I	ACR	ACR	I	I	I	I	A	ACR	ACR	I	ACR	ACR	I

TABELA 1. Continuação.

Nº da Cultura	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Data da Amostragem	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	27	27	27	27	27	27	27	27
Ponto de Amostragem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	E	E	E	E	E	E	E	E
Tempo de Amostragem	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	0	0	0	0	0	0	0	0
Temper. da Amostra (°C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0
PH da Amostra	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,72	5,37	5,37	5,37	5,37	5,37	5,37	5,37	5,37
Meio de Plaqueamento	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	PCA	PCA	PCA	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS
Cresc. em meio Liq.	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	P	S	ST	ST	STF	ST	ST	S
Carac. das Colônias	CCE	CCE	CCE	CCE	P	P	P	P	P	CCE	CCE	CCE	0	0	P	P	0	P	P	0
Pigmentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gran	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morfologia	B	B	C	B	B	B	B	B	B	C	C	B	B	B	B	B	B	B	B	C
Arranjo	I	I	PTC	I	I	I	I	I	I	IPTC	PTC	I	I	I	I	I	I	I	I	PCd
Motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-	/
Esporos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-	/
Reação de Catalase	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	/	/	-	-	/	-	-	/
Reação de Oxidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	0	/	0	0	/
O/F Glucose	I	F	OF	AF ^b	(F)	I	F	I	AI ^b	OF	OF	I	/	/	I	I	/	I	AI ^b	/
Gás de Glucose (CO ₂)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	/	/	+	+	/	+	+	/
Rafinose	+	+	0	+	+	+	-	+	+	0	0	+	/	/	+	+	/	+	+	/
Celobiose	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	0	-	/	/	-	-	/	-	+	/
Trealose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	0	/	0	0	/
Arabinose	-	-	0	+	+	-	+	-	+	0	0	-	/	/	-	+	/	+	+	/
Frutose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	0	/	0	0	/
Lactose	-	+	0	+	+	-	-	+	+	0	0	-	/	/	-	-	/	-	+	/
Sacarose	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	/	/	+	+	/	+	+	/
Maltose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	0	/	0	0	/
Ribose	+	+	0	+	+	+	0	+	+	0	0	+	/	/	+	+	/	+	+	/
Cresc. 45°C	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0	0	+	/	/	+	+	/	+	+	/
20°C	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	/	/	-	-	/	-	+	/
15°C	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	/	/	-	-	/	-	-	/
6,5% NaCl	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	/	/	+	-	/	-	+	/
7,5% NaCl	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	/	/	-	-	/	-	-	/
15% Etanol	-	-	0	-	-	-	-	-	-	0	0	-	/	/	-	-	/	-	-	/
Baird Parker	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	-	0	/	/	0	0	/	0	0	/
Anaerobiose	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+	+	0	/	/	0	0	/	0	0	/
Boma 5% Sacarose 20°C	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-	/
30°C	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-	/
Hidrólise de Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-	/
Reação de DNase	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	-	0	/	/	0	0	/	0	0	/
Reação de Lecitinase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	0	/	0	0	/
Litmus Milk Teste	A	I	ACR	I	I	I	A	I	I	ACRD	ACR	I	/	/	I	I	/	I	I	/

TABELA 1. Continuação.

Nº da Cultura	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Data da Amostragem	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
Ponto de Amostragem	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	S	S	S	S	S	S	S	S
Tempo de Amostragem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Temper. da Amostra (°C)	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	31,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0
PH da Amostra	5,37	5,37	5,37	5,37	5,37	5,37	5,37	5,37	5,37	5,37	5,37	5,37	5,37	5,61	5,61	5,61	5,61	5,61	5,61	5,61
Meio de Plaqueamento	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA
Cresc. em meio Liq.	SF	F	ST	S	ST	SP	ST	ST	ST	S	S	F	S	S	S	ST	ST	S	S	S
Carac. das Colônias	0	CCE	CRE	CCE	P	IUU	CCE	CCE	0	IUU	0	CCE	CRE	CRE	CRE	P	P	CCE	CCE	0
Pigmentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gran	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0	+	+	0	0	+
Morfologia	C	B	B	Lev	B	B	B	B	Ch	Lev	C	C	Lev	Lev	Lev	Ch	B	Lev	Lev	B
Arranjo	PCd	Cd	Cd	I	I	I	I	I	PCd	I	Cd	Cd	I	I	I	Cd	I	I	I	I
Motilidade	/	-	-	/	-	+	-	-	/	/	/	-	/	/	/	-	-	/	/	/
Esporos	/	-	-	/	-	+	-	-	/	/	/	-	/	/	/	-	-	/	/	/
Reação de Catalase	/	-	-	/	-	+	-	-	/	/	/	-	/	/	/	-	-	/	/	/
Reação de Oxidase	/	0	0	/	0	0	0	0	/	/	/	0	/	/	/	0	0	/	/	/
O/F Glucose	/	I	I	/	(F)	0	I	I	/	/	/	I	/	/	/	F	(F)	/	/	/
Gás de Glucose (CO ₂)	/	+	+	/	+	+	+	+	/	/	/	+	/	/	/	+	+	/	/	/
Rafinose	/	+	-	/	0	0	+	+	/	/	/	+	/	/	/	0	-	/	/	/
Celobiose	/	-	-	/	+	0	-	-	/	/	/	-	/	/	/	0	-	/	/	/
Trealose	/	0	0	/	0	0	0	0	/	/	/	0	/	/	/	+	0	/	/	/
Arabinose	/	-	-	/	+	0	-	-	/	/	/	-	/	/	/	+	-	/	/	/
Frutose	/	0	0	/	0	0	0	0	/	/	/	0	/	/	/	+	0	/	/	/
Lactose	/	-	-	/	-	0	-	-	/	/	/	-	/	/	/	+	+	/	/	/
Sacarose	/	+	-	/	-	0	+	+	/	/	/	+	/	/	/	0	+	/	/	/
Maltose	/	0	0	/	0	0	0	0	/	/	/	0	/	/	/	+	0	/	/	/
Ribose	/	+	+	/	+	0	+	+	/	/	/	+	/	/	/	0	+	/	/	/
Cresc. 45°C	/	+	-	/	-	+	+	+	/	/	/	+	/	/	/	-	-	/	/	/
20°C	/	-	+	/	+	+	-	-	/	/	/	-	/	/	/	+	+	/	/	/
15°C	/	-	+	/	+	+	-	-	/	/	/	-	/	/	/	+	+	/	/	/
6,5% NaCl	/	-	-	/	-	+	-	+	/	/	/	-	/	/	/	+	+	/	/	/
7,5% NaCl	/	-	-	/	-	+	-	-	/	/	/	-	/	/	/	-	-	/	/	/
15% Etanol	/	-	-	/	-	0	-	-	/	/	/	-	/	/	/	0	-	/	/	/
Baird Parker	/	0	0	/	0	0	0	0	/	/	/	0	/	/	/	-	0	/	/	/
Anaerobiose	/	0	0	/	0	-	0	0	/	/	/	0	/	/	/	0	0	/	/	/
Goma 5% Sacarose 20°C	/	-	-	/	-	-	-	-	/	/	/	-	/	/	/	++	++	/	/	/
30°C	/	+	-	/	-	-	+	-	/	/	/	-	/	/	/	++	++	/	/	/
Hidrólise de Amido	/	-	-	/	-	+	-	-	/	/	/	-	/	/	/	-	-	/	/	/
Reação de DNase	/	0	0	/	0	0	0	0	/	/	/	0	/	/	/	0	0	/	/	/
Reação de Lecitinasase	/	0	0	/	0	0	0	0	/	/	/	0	/	/	/	0	0	/	/	/
Litmus Milk Teste	/	I	I	/	A	DR	I	A	/	/	/	I	/	/	/	I	I	/	/	/

TABELA 1. Continuação.

Nº da Cultura	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Data da Amostragem	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
Ponto de Amostragem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	E	E	E	E	E	E	E	E	E
Tempo de Amostragem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Temper. da Amostra (°C)	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
PH da Amostra	5,61	5,61	5,61	5,61	5,61	5,61	5,61	5,61	5,61	5,61	5,61	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01
Meio de Plaqueamento	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS
Cresc. em meio Liq.	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	SP	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Carac. das Colônias	0	P	P	0	IUU	P	P	CCE	0	P	IUU	P	CRE	CCE	CRE	P	CCE	CPE	P	CCE
Pigmentação	-	-	-	-	Ca	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+
Morfologia	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	C	C	Lev	B	B
Arranjo	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	Ch	PCd	IPC	I	I	I
Notilidade	/	-	-	/	+	-	-	-	/	-	+	-	-	-	-	-	-	/	-	-
Esporos	/	-	-	/	+	-	-	-	/	-	+	-	-	-	-	-	-	/	-	-
Reação de Catalase	/	-	-	/	+	-	-	-	/	-	+	-	-	-	-	-	+	/	-	-
Reação de Oxidase	/	0	0	/	0	0	0	0	/	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	0
O/F Glucose	/	I	I	/	I	I	I	I	/	I	D	I	I	I	I	F	AI ^b	/	I	F
Gás de Glucose (CO ₂)	/	+	+	/	+	+	+	+	/	+	+	+	+	+	+	+	0	/	+	-
Rafinose	/	+	+	/	0	+	+	+	/	-	0	+	+	+	-	0	0	/	+	+
Celobiose	/	-	+	/	0	+	-	-	/	-	0	-	-	-	-	0	0	/	+	+
Trealose	/	0	0	/	0	0	0	0	/	0	0	0	0	0	0	+	0	/	0	0
Arabinose	/	-	-	/	0	+	+	-	/	-	0	+	+	+	-	-	0	/	+	+
Frutose	/	0	0	/	0	0	0	0	/	0	0	0	0	0	0	+	0	/	0	0
Lactose	/	-	+	/	0	-	-	-	/	-	0	-	-	+	-	-	0	/	+	+
Sacarose	/	-	+	/	0	+	+	+	/	-	0	+	+	+	-	0	0	/	+	+
Maltose	/	0	0	/	0	0	0	0	/	0	0	0	0	0	0	+	0	/	0	0
Ribose	/	+	+	/	0	+	+	+	/	+	0	+	+	+	+	0	0	/	+	+
Cresc. 45°C	/	+	+	/	+	+	+	+	/	-	+	+	+	+	-	-	0	/	+	+
20°C	/	-	+	/	+	-	-	-	/	+	+	-	-	-	+	+	0	/	-	+
15°C	/	-	+	/	0	-	-	-	/	+	+	-	-	-	+	+	-	/	-	+
6,5% NaCl	/	+	+	/	+	-	-	-	/	+	+	-	+	+	-	+	+	/	+	+
7,5% NaCl	/	-	-	/	+	-	-	-	/	-	+	-	-	-	-	-	-	/	-	+
15% Etanol	/	-	-	/	0	-	-	-	/	-	0	-	-	-	-	0	0	/	-	+
Baird Parker	/	0	0	/	0	0	0	0	/	0	0	0	0	0	0	-	-	/	0	0
Anaerobiose	/	0	0	/	(+)	0	0	0	/	0	-	0	0	0	0	0	-	/	0	0
Goma 5% Sacarose 20°C	/	-	-	/	++	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-
30°C	/	-	-	/	+	-	-	-	/	-	-	-	-	+	-	-	-	/	-	-
Hidrólise de Amido	/	-	-	/	+	-	-	-	/	-	+	-	-	-	-	-	-	/	-	-
Reação de DNase	/	0	0	/	0	0	0	0	/	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	0
Reação de Lecitinase	/	0	0	/	0	0	0	0	/	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	0
Litmus Milk Teste	/	I	I	/	DR	I	I	I	/	A	DR	I	I	I	I	I	AIkr	/	I	ACR

TABELA 1. Continuação.

Nº da Cultura	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Data da Amostragem	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27
Ponto de Amostragem	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	S	S	S	S
Tempo de Amostragem	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	0	60	60	60
Temper. da Amostra (°C)	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	28,0	28,0	28,0	28,0
PH da Amostra	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	5,61	6,10	6,10	6,10
Meio de Plaqueamento	NRS	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	NRS	NRS	NRS	NRS
Cresc. em meio Liq.	ST	ST	S	S	S	ST	ST	SP	S	S	ST	ST	ST	S	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Carac. das Colônias	CCE	P	CCE	CCE	CCE	P	P	IUU	CCE	CCE	P	P	P	CRE	P	P	P	0	CRE	P
Pigmentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gran	+	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+
Morfologia	B	C	Lev	Lev	Lev	B	B	B	Lev	Lev	B	B	B	Lev	B	B	Cb	B	B	B
Arranjo	I	Cd	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
Motilidade	-	-	/	/	/	-	-	+	/	/	-	-	-	/	-	-	-	/	-	-
Esporos	-	-	/	/	/	-	-	+	/	/	-	-	-	/	-	-	-	/	-	-
Reação de Catalase	-	-	/	/	/	-	-	+	/	/	-	-	-	/	-	-	-	/	-	-
Reação de Oxidase	0	0	/	/	/	0	0	0	/	/	0	0	0	/	0	0	0	/	0	0
O/F Glucose	I	F	/	/	/	F	F	0	/	/	I	F	F	/	F	F	F	/	F	(F)
Gás de Glucose (CO ₂)	+	+	/	/	/	+	+	+	/	/	+	+	+	/	+	+	+	/	+	+
Rafinose	+	0	/	/	/	+	-	0	/	/	-	-	-	/	-	-	0	/	+	+
Celobiose	-	0	/	/	/	+	-	0	/	/	-	-	-	/	-	-	0	/	-	-
Trealose	0	+	/	/	/	0	0	0	/	/	0	0	0	/	0	0	+	/	0	0
Arabinose	-	+	/	/	/	-	+	0	/	/	-	+	+	/	+	+	+	/	-	+
Frutose	0	+	/	/	/	0	0	0	/	/	0	0	0	/	0	0	+	/	0	0
Lactose	-	+	/	/	/	-	-	0	/	/	-	-	-	/	-	-	+	/	-	-
Sacarose	+	0	/	/	/	+	+	0	/	/	-	+	+	/	+	+	0	/	+	+
Maltose	0	+	/	/	/	0	0	0	/	/	0	0	0	/	0	0	+	/	0	0
Ribose	+	0	/	/	/	+	0	0	/	/	+	0	0	/	0	0	0	/	+	+
Cresc. 45°C	+	-	/	/	/	+	+	+	/	/	-	+	+	/	+	+	-	/	+	+
20°C	+	+	/	/	/	-	+	+	/	/	+	+	+	/	+	+	+	/	-	-
15°C	-	+	/	/	/	-	+	+	/	/	+	+	+	/	+	+	-	/	-	-
6,5% NaCl	-	+	/	/	/	-	+	+	/	/	+	+	+	/	+	+	+	/	+	-
7,5% NaCl	-	-	/	/	/	-	-	+	/	/	-	-	-	/	-	-	-	/	-	-
15% Etanol	-	0	/	/	/	-	-	0	/	/	-	-	-	/	-	-	0	/	-	-
Baird Parker	0	-	/	/	/	0	0	0	/	/	0	0	0	/	0	0	-	/	0	0
Anaerobiose	0	0	/	/	/	0	0	-	/	/	0	0	0	/	0	0	0	/	0	0
Gema 5% Sacarose 20°C	+	+	/	/	/	-	++	-	/	/	-	++	++	/	++	++	++	/	-	-
30°C	+	-	/	/	/	+	++	-	/	/	-	++	++	/	++	++	++	/	-	-
Hidrólise de Amido	-	-	/	/	/	-	-	+	/	/	-	-	-	/	-	-	-	/	-	-
Reação de DNase	0	0	/	/	/	0	0	0	/	/	0	0	0	/	0	0	0	/	0	0
Reação de Lecitinase	0	0	/	/	/	0	0	0	/	/	0	0	0	/	0	0	0	/	0	0
Litmus Milk Teste	I	A	/	/	/	I	A	DR	/	/	A	A	A	/	A	A	I	/	I	I

TABELA 1. Continuação.

Nº da Cultura	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
Data da Amostragem	27	27	27	27	27	27	27	27	27	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
Ponto de Amostragem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
Tempo de Amostragem	60	60	60	60	60	60	60	60	60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Temper. da Amostra (°C)	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5
pH da Amostra	6,10	6,10	6,10	6,10	6,10	6,10	6,10	6,10	6,10	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20
Meio de Plaqueamento	NRS	NRS	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS
Cresc. em meio Liq.	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	S	S	ST	ST
Carac. das Colônias	0	P	CPE	P	P	P	P	P	P	0	CCE	CPE	CPE	CCE	CCE	0	CPE	CPE	CCE	CCE
Pigmentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0	0	+	+
Morfologia	B	B	B	B	Ch	C	Ch	B	B	B	B	Lev	C	B	B	B	Lev	Lev	B	B
Arranjo	I	I	I	I	Pcd	Pcd	Pcd	I	I	I	I	I	Cd	I	I	Cd	I	I	I	I
Motilidade	/	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/	-	-	-	/	/	/	-	-
Esporos	/	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/	-	-	-	/	/	/	-	-
Reação de Catalase	/	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/	-	-	-	/	/	/	-	-
Reação de Oxidase	/	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	/	0	0	0	/	/	/	0	0
O/F Glucose	/	F	F	F	(F)	F	F	F	F	/	F	/	F	F	F	/	/	/	(F)	I
Gás de Glucose (CO ₂)	/	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	/	+	+	-	/	/	/	+	+
Rafinose	/	+	+	+	0	0	0	-	-	/	0	/	0	+	+	/	/	/	+	+
Celobiose	/	-	+	+	0	0	0	-	-	/	+	/	0	+	+	/	/	/	+	+
Trealose	/	0	0	0	+	+	+	0	0	/	0	/	+	0	0	/	/	/	0	0
Arabinose	/	-	+	+	-	-	-	+	+	/	+	/	+	-	+	/	/	/	+	+
Frutose	/	0	0	0	+	+	+	0	0	/	0	/	+	0	0	/	/	/	0	0
Lactose	/	+	+	+	+	+	+	-	-	/	-	/	+	+	-	/	/	/	+	+
Sacarose	/	+	+	+	0	0	0	+	+	/	-	/	0	+	+	/	/	/	+	+
Maltose	/	0	0	0	+	+	+	0	0	/	0	/	+	0	0	/	/	/	0	0
Ribose	/	+	+	+	0	0	0	0	0	/	+	/	0	+	+	/	/	/	+	+
Cresc. 45°C	/	+	+	+	-	-	-	+	+	/	+	/	-	+	-	/	/	/	+	+
20°C	/	-	+	+	+	+	+	+	+	/	+	/	+	+	+	/	/	/	-	-
15°C	/	-	+	+	+	+	+	+	+	/	+	/	+	+	+	/	/	/	-	-
6,5% NaCl	/	-	+	+	+	+	+	+	+	/	+	/	+	+	+	/	/	/	+	+
7,5% NaCl	/	-	+	+	-	-	-	-	-	/	+	/	-	+	-	/	/	/	-	-
15% Etanol	/	-	-	-	0	0	0	-	-	/	-	/	0	-	-	/	/	/	-	-
Baird Parker	/	0	0	0	-	-	-	0	0	/	0	/	-	0	0	/	/	/	0	0
Anaerobiose	/	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	/	0	0	0	/	/	/	0	0
Goma 5% Sacarose 20°C	/	-	-	-	-	+	+	++	++	/	-	/	+	-	-	/	/	/	-	-
30°C	/	-	-	-	-	++	++	++	++	/	-	/	-	-	-	/	/	/	-	+
Hidrólise de Amido	/	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/	-	-	-	/	/	/	-	-
Reação de DNase	/	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	/	0	0	0	/	/	/	0	0
Reação de Lecitinase	/	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	/	0	0	0	/	/	/	0	0
Litmus Milk Teste	/	I	A	A	A	I	I	A	A	/	A	/	I	A	ACR	/	/	/	I	I

TABELA 1. Continuação.

Nº da Cultura	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
Data da Amostragem	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
Ponto de Amostragem	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	S	S	S	S	S	S	S
Tempo de Amostragem	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Temper.da Amostra (°C)	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0
PH da Amostra	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	4,42	4,42	4,42	4,42	4,42	4,42	4,42
Meio de Plaqueamento	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS
Cresc.em meio Liq.	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	S	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Carac.das Colônias	CCE	CPE	P	P	CCE	P	CCE	CCE	0	P	CCE	0	P	P	0	CCE	P	CCE	P	CCE
Pigmentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gran	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morfologia	B	C	B	B	B	B	B	Lev	B	B	B	B	C	C	B	C	B	C	B	B
Arranjo	I	Cd	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	PCd	PT	I	PTC	I	PCd	I	I
Motilidade	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-	-
Esporos	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-	-
Reação de Catalase	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-	/	+	-	-	-	-
Reação de Oxidase	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	0	/	0	0	/	0	0	0	0	0
O/F Glucose	F	F	F	I	F	I	F	/	/	I	(F)	/	F	F	/	OF	I	F	(F)	I
Gás de Glucose (CO ₂)	+	+	+	+	+	+	+	/	/	+	+	/	+	+	/	+	+	+	+	+
Rafinose	+	0	-	+	+	+	-	/	/	-	+	/	0	0	/	0	+	0	-	+
Celobiose	+	0	-	-	+	-	-	/	/	-	+	/	0	0	/	0	-	0	-	-
Trealose	0	-	0	0	0	0	0	/	/	0	0	/	-	-	/	0	0	+	0	0
Arabinose	-	+	+	-	+	-	+	/	/	-	+	/	+	+	/	0	+	-	+	-
Frutose	0	+	0	0	0	0	0	/	/	0	0	/	+	+	/	0	0	+	0	0
Lactose	+	+	-	-	+	-	+	/	/	-	+	/	+	+	/	0	-	(+)	-	-
Sacarose	+	0	+	+	+	+	+	/	/	-	+	/	0	0	/	0	+	0	-	+
Maltose	0	+	0	0	0	0	0	/	/	0	0	/	+	+	/	0	0	-	0	0
Ribose	+	0	0	+	+	+	0	/	/	+	+	/	0	0	/	0	+	0	-	+
Cresc.45°C	+	-	+	+	+	+	-	/	/	-	+	/	-	-	/	0	+	-	+	+
20°C	+	+	+	+	+	+	+	/	/	+	-	/	+	+	/	+	-	+	+	+
15°C	+	+	+	-	+	+	+	/	/	+	-	/	+	+	/	+	-	+	+	-
6,5% NaCl	+	+	+	-	+	-	+	/	/	+	+	/	+	+	/	+	+	+	+	-
7,5% NaCl	+	-	-	-	+	-	+	/	/	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-	-
15% Etanol	-	0	-	-	-	-	-	/	/	-	-	/	0	0	/	0	-	0	-	-
Baird Parker	0	-	0	0	0	0	0	/	/	0	0	/	-	-	/	-	0	-	0	0
Anaerobiose	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	0	/	0	0	/	+	0	0	0	0
Goma 5% Sacarose 20°C	-	+	++	-	++	-	++	/	/	-	-	/	+	+	/	-	-	+	-	-
30°C	-	+	++	+	++	++	++	/	/	-	-	/	+	+	/	-	-	+	-	+
Hidrólise de Amido	-	-	-	-	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-	/	-	-	-	-	-
Reação de DNase	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	0	/	0	0	/	-	0	0	0	0
Reação de Lecitinase	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	0	/	0	0	/	0	0	0	0	0
Litmus Milk Teste	A	A	A	ACR	A	A	I	/	/	A	I	/	I	A	/	ACR	I	A	A	I

TABELA 1. Continuação.

Nº da Cultura	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
Data da Amostragem	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
Ponto de Amostragem	S	S	S	S	S	S	S	E	E	E	S	S	S	E	E	E	E	E	E	E
Tempo de Amostragem	0	0	0	0	0	0	0	60	60	60	60	60	60	0	0	0	0	0	0	0
Temper. da Amostra (°C)	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	28,0	28,0	28,0	21,5	21,5	21,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5	34,5
PH da Amostra	4,42	4,42	4,42	4,42	4,42	4,42	4,42	5,36	5,36	5,36	5,28	5,28	5,28	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20	5,20
Meio de Plaqueamento	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	NRS	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA
Cresc. em meio Liq.	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	S	F	ST	ST	ST	ST	S	ST	SP	S	S	ST	ST
Carac. das Colônias	P	P	CCE	CCE	IUU	P	IUU	CPE	CRE	P	CRE	0	CCE	CCE	CCE	IUU	CRE	CCE	P	P
Pigmentação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Ro	-	-	-
Gran	+	+	-	-	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+
Morfologia	B	B	B	B	B	B	B	Lev	B	B	C	B	C	Lev	B	B	Lev	Lev	B	B
Arranjo	I	I	I	I	I	I	I	Cd	I	PTC	I	PT	I	I	I	I	I	I	I	I
Motilidade	-	-	-	-	+	-	+	/	-	-	-	/	-	/	-	+	/	/	-	-
Esporos	-	-	-	-	+	-	+	/	-	-	-	/	-	/	-	+	/	/	-	-
Reação de Catalase	-	-	+	+	+	-	+	/	-	-	+	/	-	/	-	+	/	/	-	-
Reação de Oxidase	0	0	-	-	0	0	0	/	0	0	0	/	0	/	0	0	/	/	0	0
D/F Glucose	I	I	OFF	OFF	0	I	0	/	F	(F)	OF	/	F	/	F	0	/	/	F	I
Gás de Glucose (CO ₂)	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	+	/	+	/	+	+	/	/	+	+
Rafinose	-	-	0	0	0	-	0	/	+	+	0	/	0	/	-	0	/	/	+	-
Celobiose	-	-	0	0	0	-	0	/	-	+	0	/	0	/	-	0	/	/	+	-
Trealose	0	0	0	0	0	0	0	/	0	0	0	/	+	/	0	0	/	/	0	0
Arabinose	-	-	0	0	0	-	0	/	+	-	0	/	+	/	+	0	/	/	+	+
Frutose	0	0	0	0	0	0	0	/	0	0	0	/	+	/	0	0	/	/	0	0
Lactose	-	-	0	0	0	-	0	/	-	+	0	/	+	/	+	0	/	/	+	-
Sacarose	-	-	0	0	0	-	0	/	-	-	0	/	0	/	+	0	/	/	+	+
Maltose	0	0	0	0	0	0	0	/	0	0	0	/	+	/	0	0	/	/	0	0
Ribose	+	+	0	0	0	+	0	/	-	+	0	/	0	/	0	0	/	/	-	+
Cresc. 45°C	-	-	0	0	+	-	+	/	+	+	0	/	-	/	-	+	/	/	-	+
20°C	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	+	/	+	/	+	+	/	/	+	+
15°C	+	(+)	+	+	+	+	+	/	+	-	+	/	-	/	+	+	/	/	+	+
6,5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	+	/	+	/	+	+	/	/	+	+
7,5% NaCl	-	-	+	+	+	-	+	/	-	-	+	/	+	/	+	+	/	/	-	-
15% Etanol	-	-	0	0	0	-	0	/	-	-	0	/	0	/	-	0	/	/	-	-
Baird Parker	0	0	0	0	0	0	0	/	0	0	+	/	-	/	0	0	/	/	0	0
Anaerobiose	0	0	+	+	-	0	-	/	0	0	+	/	0	/	0	-	/	/	0	0
Goma 5% Sacarose 20°C	-	-	++	++	-	-	-	/	-	-	++	/	-	/	++	-	/	/	-	-
30°C	-	-	-	+	-	-	-	/	+	-	-	/	-	/	++	-	/	/	-	-
Hidrólise de Amido	-	-	+	+	+	-	+	/	-	-	-	/	-	/	-	+	/	/	-	-
Reação de DNase	0	0	0	0	0	0	0	/	0	0	-	/	0	/	0	0	/	/	0	0
Reação de Lecitinase	0	0	0	0	0	0	0	/	0	0	+	/	0	/	0	0	/	/	0	0
Litmus Milk Teste	A	A	ARCD	ARCD	DR	A	DR	/	I	I	ACR	/	AC	/	I	DR	/	/	A	A

TABELA 1. Continuação.

Nº da Cultura	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200
Data da Amostragem	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
Ponto de Amostragem	S	S	S	S	S	S	S	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	S
Tempo de Amostragem	0	0	0	0	0	0	0	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Temper. da Amostra (°C)	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	27,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	28,0	21,5
PH da Amostra	4,42	4,42	4,42	4,42	4,42	4,42	4,42	5,36	5,36	5,36	5,36	5,36	5,36	5,36	5,36	5,36	5,36	5,36	5,36	5,28
Meio de Plaqueamento	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA
Cresc. em meio Liq.	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
Carac. das Colônias	CCE	CCE	P	CCE	CCE	CCE	CCE	CCE	CCE	CCE	CCE	CCE	CCE	CCE	CCE	CCE	CCE	CCE	CCE	P
Pigmentação	La	-	-	-	-	-	La	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	La	-
Gran	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morfologia	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Arranjo	PTC	PCd	PCd	IPC	PTC	PTC	PC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PTC	PC	PTC	PTC	IPTC	PT
Motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esporos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reação de Catalase	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Reação de Oxidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
O/F Glucose	OF	F	F	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	OF	(F)
Gás de Glucose (CO ₂)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Celobiose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Treose	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Arabinose	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Frutose	0	+	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Lactose	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Sacarose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Maltose	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Ribose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cresc. 45°C	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
20°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	-	+	-
6,5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7,5% NaCl	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15% Etanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Baird Parker	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Anaerobiose	+	0	0	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	(+)	+	+	-	(+)	(+)	+	0
Goma 5% Sacarose 20°C	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
30°C	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise de Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Reação de DNase	-	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Reação de Lecitinase	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0
Litmus Milk Teste	Alk	A	I	ACR	ACR	ACR	I	ACR	ACR	ACR	ACR	ACR	ACR	ACR	ACR	ACR	ACR	ACR	I	AC

TABELA 1. Continuação.

Nº da Cultura	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217
Data da Amostragem	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
Ponto de Amostragem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tempo de Amostragem	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
Temper. da Amostra (°C)	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5
PH da Amostra	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28	5,28
Meio de Plaqueamento	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA
Cresc. em meio Liq.	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	S
Carac. das Colônias	0	P	P	P	P	CRE	CRE	P	P	P	P	CRE	CRE	CRE	CCE	CRE	CCE
Pigmentação	-	-	-	-	-	La	-	-	-	-	-	-	La	La	-	La	-
Gran	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	0
Morfologia	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	Lev	C	Lev
Arranjo	PCd	PT	PCd	PCd	PCd	PTC	PC	PT	PT	PTC	IPCd	IPC	PTC	PTC	I	PTC	I
Motilidade	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/
Esporos	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/
Reação de Catalase	/	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	/	+	/
Reação de Oxidase	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	/
O/F Glucose	/	(F)	F	F	F	OF	OF	F	F	F	F	OF	OF	OF	/	OF	/
Gás de Glucose (CO ₂)	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	/
Rafinose	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	/
Celobiose	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	/
Trealose	/	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	/	0	/
Arabinose	/	-	+	+	+	0	0	+	+	+	-	0	0	0	/	0	/
Frutose	/	+	+	+	+	0	0	+	+	+	+	0	0	0	/	0	/
Lactose	/	+	+	+	+	0	0	+	-	-	+	0	0	0	/	0	/
Sacarose	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	/
Maltose	/	+	+	+	+	0	0	+	-	-	+	0	0	0	/	0	/
Ribose	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	/
Cresc. 45°C	/	-	-	-	-	0	0	-	-	-	-	0	0	0	/	0	/
20°C	/	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	/
15°C	/	+	+	+	+	+	(+)	-	+	+	+	-	+	+	/	+	/
6,5% NaCl	/	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	/
7,5% NaCl	/	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	/	+	/
15% Etanol	/	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	/	0	/
Baird Parker	/	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	/	+	/
Anaerobiose	/	0	0	0	0	+	(+)	0	0	0	0	(+)	+	+	/	+	/
Goma 5% Sacarose 20°C	/	++	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	/	-	/
30°C	/	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/
Hidrólise de Amido	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	/
Reação de DNase	/	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	-	-	-	/	-	/
Reação de Lecitinase	/	0	0	-	-	-	+	-	0	0	0	+	+	-	/	+	/
Litmus Milk Teste	/	I	I	I	I	alk	ACR	AC	I	I	I	ACR	I	R	/	I	/

TABELA 2. Classificação das Cepas Isoladas.

=====	
Nº	CLASSIFICAÇÃO
=====	
1	Levedura
2	Lactobacillus fermentum / Lactobacillus reuteri
3	Lactobacillus fermentum
4	Lactobacillus confusus
5	Lactobacillus fermentum
6	Lactobacillus fermentum / Lactobacillus reuteri
7	Lactobacillus confusus
8	Lactobacillus confusus
9	Bastonete Gram positivo (perdido)
10	Bastonete Gram positivo (perdido)
11	Lactobacillus sp
12	Bastonete Gram positivo (perdido)
13	Staphylococcus sp
14	Staphylococcus sp
15	Lactobacillus viridescens
16	Staphylococcus sp
17	Levedura
18	Lactobacillus fermentum
19	Bastonete Gram positivo (perdido)
20	Staphylococcus sp
21	Staphylococcus sp
22	Staphylococcus sp
23	Staphylococcus sp
24	Staphylococcus sp
25	Staphylococcus sp
26	Staphylococcus sp
27	Staphylococcus sp
28	Staphylococcus sp
29	Staphylococcus sp
30	Staphylococcus sp
31	Staphylococcus sp
32	Staphylococcus sp
33	Leuconostoc mesenteroides subsp.mesenteroides
34	Staphylococcus sp
35	Staphylococcus sp
36	Leuconostoc mesenteroides subsp.dextranicum
37	Staphylococcus sp
38	Staphylococcus sp
39	Bastonete Gram positivo (perdido)
40	Lactobacillus fermentum / Lactobacillus reuteri
=====	

TABELA 2. Continuação.

Nº	Classificação
41	<i>Lactobacillus fermentum</i>
42	<i>Lactobacillus fermentum</i>
43	<i>Staphylococcus</i> sp
44	<i>Lactobacillus brevis</i> / <i>Lactobacillus buchneri</i>
45	<i>Lactobacillus fermentum</i> / <i>Lactobacillus reuteri</i>
46	<i>Lactobacillus fermentum</i>
47	<i>Lactobacillus confusus</i>
48	<i>Lactobacillus fermentum</i>
49	<i>Lactobacillus brevis</i> / <i>Lactobacillus buchneri</i>
50	<i>Staphylococcus</i> sp
51	<i>Staphylococcus</i> sp
52	<i>Lactobacillus fermentum</i>
53	Bastonete Gram positivo (perdido)
54	Bastonete Gram positivo (perdido)
55	<i>Lactobacillus fermentum</i>
56	<i>Lactobacillus fermentum</i> / <i>Lactobacillus reuteri</i>
57	Bastonete Gram positivo (perdido)
58	<i>Lactobacillus fermentum</i> / <i>Lactobacillus reuteri</i>
59	<i>Lactobacillus fermentum</i>
60	Coco Gram positivo (perdido)
61	Coco Gram positivo (perdido)
62	<i>Lactobacillus fermentum</i>
63	<i>Lactobacillus viridescens</i>
64	Levedura
65	<i>Lactobacillus</i> sp
66	<i>Bacillus</i> sp
67	<i>Lactobacillus fermentum</i>
68	<i>Lactobacillus fermentum</i>
69	Cocobacilo Gram positivo (perdido)
70	Levedura
71	Coco Gram positivo (perdido)
72	<i>Lactobacillus fermentum</i>
73	Levedura
74	Levedura
75	Levedura
76	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
77	<i>Lactobacillus confusus</i>
78	Levedura
79	Levedura
80	Bastonete Gram positivo (perdido)

TABELA 2. Continuação.

Nº	Classificação
=====	
81	Bastonete Gram positivo (perdido)
82	<i>Lactobacillus</i> sp
83	<i>Lactobacillus fermentum</i> /L.reuteri/L.brevis/L.buchneri
84	Bastonete Gram positivo (perdido)
85	<i>Bacillus</i> sp
86	<i>Lactobacillus fermentum</i>
87	<i>Lactobacillus fermentum</i> / <i>Lactobacillus reuteri</i>
88	<i>Lactobacillus fermentum</i>
89	Bastonete Gram positivo (perdido)
90	<i>Lactobacillus viridescens</i>
91	<i>Bacillus</i> sp
92	<i>Lactobacillus fermentum</i> / <i>Lactobacillus reuteri</i>
93	<i>Lactobacillus fermentum</i> / <i>Lactobacillus reuteri</i>
94	<i>Lactobacillus fermentum</i> / <i>Lactobacillus reuteri</i>
95	<i>Lactobacillus viridescens</i>
96	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
97	Micrococcaceae
98	Levedura
99	<i>Lactobacillus fermentum</i>
100	<i>Lactobacillus plantarum</i>
101	<i>Lactobacillus fermentum</i>
102	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.mesenteroides
103	Levedura
104	Levedura
105	Levedura
106	<i>Lactobacillus fermentum</i>
107	<i>Lactobacillus confusus</i>
108	<i>Bacillus</i> sp
109	Levedura
110	Levedura
111	<i>Lactobacillus viridescens</i>
112	<i>Lactobacillus confusus</i>
113	<i>Lactobacillus confusus</i>
114	Levedura
115	<i>Lactobacillus confusus</i>
116	<i>Lactobacillus confusus</i>
117	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.mesenteroides
118	Bastonete Gram positivo (perdido)
119	<i>Lactobacillus fermentum</i>
120	<i>Lactobacillus fermentum</i> / <i>Lactobacillus reuteri</i>
=====	

TABELA 2. Continuação.

Nº	Classificação
121	Bastonete Gram positivo (perdido)
122	<i>Lactobacillus fermentum</i>
123	<i>Lactobacillus fermentum</i> /L.reuteri/L.brevis/L.buchneri
124	<i>Lactobacillus fermentum</i> /L.reuteri/L.brevis/L.buchneri
125	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
126	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.dextranicum
127	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.dextranicum
128	<i>Lactobacillus confusus</i>
129	<i>Lactobacillus confusus</i>
130	Bastonete Gram positivo (perdido)
131	<i>Lactobacillus</i> sp
132	Levedura
133	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.mesenteroides
134	<i>Lactobacillus fermentum</i> /L.reuteri/L.brevis/L.buchneri
135	<i>Lactobacillus plantarum</i>
136	Bastonete Gram positivo (perdido)
137	Levedura
138	Levedura
139	<i>Lactobacillus fermentum</i>
140	<i>Lactobacillus fermentum</i>
141	<i>Lactobacillus fermentum</i> /L.reuteri/L.brevis/L.buchneri
142	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.mesenteroides
143	<i>Lactobacillus confusus</i>
144	<i>Lactobacillus fermentum</i>
145	<i>Lactobacillus</i> sp
146	<i>Lactobacillus</i> sp
147	<i>Lactobacillus confusus</i>
148	Levedura
149	Bastonete Gram positivo (perdido)
150	<i>Lactobacillus viridescens</i>
151	<i>Lactobacillus fermentum</i>
152	Bastonete Gram positivo (perdido)
153	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.mesenteroides
154	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.mesenteroides
155	Bastonete Gram positivo (perdido)
156	<i>Staphylococcus</i> sp
157	<i>Lactobacillus fermentum</i> / <i>Lactobacillus reuteri</i>
158	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.dextranicum
159	<i>Lactobacillus</i> sp
160	<i>Lactobacillus fermentum</i>

TABELA 2. Continuação.

Nº	Classificação
161	<i>Lactobacillus viridescens</i>
162	<i>Lactobacillus viridescens</i>
163	Enterobacteriaceae
164	Enterobacteriaceae
165	<i>Bacillus</i> sp
166	<i>Lactobacillus viridescens</i>
167	<i>Bacillus</i> sp
168	Levedura
169	<i>Lactobacillus</i> sp
170	<i>Lactobacillus fermentum</i>
171	<i>Staphylococcus</i> sp
172	Bastonete Gram positivo (perdido)
173	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
174	Levedura
175	<i>Lactobacillus confusus</i>
176	<i>Bacillus</i> sp
177	Levedura
178	Levedura
179	<i>Lactobacillus fermentum</i> /L.reuteri/L.brevis/L.buchneri
180	<i>Lactobacillus brevis</i> / <i>Lactobacillus buchneri</i>
181	<i>Staphylococcus</i> sp
182	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.mesenteroides
183	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.mesenteroides
184	<i>Staphylococcus</i> sp
185	<i>Staphylococcus</i> sp
186	<i>Staphylococcus</i> sp
187	<i>Staphylococcus</i> sp
188	<i>Staphylococcus</i> sp
189	<i>Staphylococcus</i> sp
190	<i>Staphylococcus</i> sp
191	<i>Staphylococcus</i> sp
192	<i>Staphylococcus</i> sp
193	<i>Staphylococcus</i> sp
194	<i>Staphylococcus</i> sp
195	<i>Staphylococcus</i> sp
196	<i>Staphylococcus</i> sp
197	<i>Staphylococcus</i> sp
198	<i>Staphylococcus</i> sp
199	<i>Staphylococcus</i> sp
200	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.mesenteroides

TABELA 2. Continuação.

=====	
Nº	Classificação
=====	
201	Coco Gram positivo (perdido)
202	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
203	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
204	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
205	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
206	<i>Staphylococcus</i> sp
207	<i>Staphylococcus</i> sp
208	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
209	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>
210	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
211	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
212	<i>Staphylococcus</i> sp
213	<i>Staphylococcus</i> sp
214	<i>Staphylococcus</i> sp
215	Levedura
216	<i>Staphylococcus</i> sp
217	Levedura
=====	