

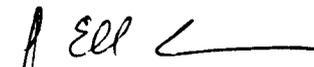
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS NA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA ATRAVÉS DO CONSUMO DE
AÇÚCAR POR BACTÉRIAS CONTAMINANTES**

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por CIBELE TOSIN STROPPA aprovada pela Comissão Julgadora em 13 de fevereiro de 1998.

Campinas, 13 de fevereiro de 1998.

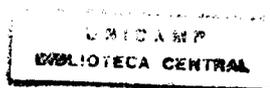

Prof. Dr. GIL EDUARDO SERRA
Presidente da Banca

Cibele Tosin Stroppa
Bióloga, UNESP/S. J. Rio Preto, 1985

Prof. Gil Eduardo Serra
Orientador

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

CAMPINAS
FEVEREIRO/1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Es
T. Nº 80	33455
PREC.	395/98
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	14/04/98
N.º CPD	

CM-00109042-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

St89a

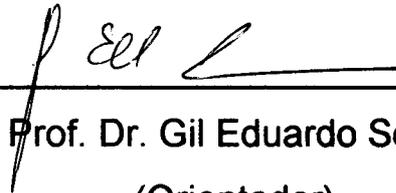
Stroppa, Cibele Tosin

Avaliação da ação de antibióticos utilizados na fermentação alcoólica através do consumo de açúcar por bactérias contaminantes / Cibele Tosin Stroppa. – Campinas, SP: [s.n.], 1998.

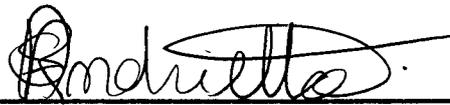
Orientador: Gil Eduardo Serra
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Fermentação. 2.Álcool. 3.Bacillus (Bacteria). 4.Lactobacilo
5.Açúcar – Consumo. 5.Antibióticos. I.Serra, Gil Eduardo.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
(Orientador)



Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta
(Membro)



Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant
(Membro)

Prof. Dr. José Paulo Stupiello
(Membro-suplente)

Campinas, 13 de fevereiro de 1998.

Para Felipe e Marina

AGRADECIMENTOS

À minha família: João Carlos, marido, Carlos e Sonia, pais e às irmãs Heloisa, Cristiane, Milena e Larissa pelo apoio incondicional prestado. Ao cunhado Neville Wile pela versão em inglês do resumo.

Ao Professor Dr. Gil Eduardo Serra pela orientação e apoio a mim dedicados.

Aos Professores Drs. Lúcia Regina Durrant e José Paulo Stupiello pela atenciosa revisão desta tese.

Ao Professor Dr. Silvio Roberto Andrietta pela revisão da tese e sobretudo pelas valiosas sugestões e apoio prestados durante toda a realização deste trabalho.

À Maria da Graça Andrietta, companheira dedicada em todas as etapas de elaboração deste trabalho, cujos ensinamentos foram fundamentais para sua realização.

Aos amigos Cláudia Steckeborg e Valmir Alcarde pelo apoio e ajuda técnica.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de estudos.

À FAPESP pelo financiamento do projeto.

À FERMENTEC/ESALQ pela doação das culturas.

Aos funcionários do CPQBA/UNICAMP, especialmente à Milene e Lídia, pelo apoio.

Aos colegas, funcionários e professores da Faculdade de Engenharia de Alimentos, que contribuíram para realização deste trabalho.

ÍNDICE

RESUMO.....	i
SUMMARY.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Os Contaminantes.....	03
2.1.1 Matéria-Prima (Cana-de-açúcar).....	03
2.1.2 O Armazenamento e Lavagem da Cana.....	04
2.1.3 A Extração e Tratamento do Caldo.....	05
2.1.4 A Fermentação Alcoólica.....	06
2.2. As Conseqüências da Contaminação da Fermentação.....	08
2.2.1 O Rendimento Fermentativo.....	09
2.2.2 A Produção de Metabólitos Bacterianos.....	09
2.2.3 Distúrbios Operacionais.....	11
2.3. Agentes Antimicrobianos.....	12
2.4. Metodologias de Avaliação do Efeito Antimicrobiano.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1. Preparo do Material Estéril.....	18
3.2. Bactérias.....	18
3.3. Antibióticos.....	19
3.4. Meio de Cultivo.....	20
3.4.1 Fermentação.....	20
3.4.2 Plaqueamento.....	21

3.5. Padronização do Inóculo.....	21
3.5.1 <i>Lactobacillus</i>	22
3.5.2 <i>Bacillus</i>	23
3.6. Condução dos Ensaios de Fermentação.....	24
3.7. Metodologia Analítica.....	26
3.7.1 Contagem de Microrganismos.....	26
3.7.2 Teor de Açúcar.....	26
3.7.3 pH.....	27
3.8. Delineamento Experimental.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. <i>Lactobacillus fermentum</i>	28
4.2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	33
4.3. <i>Lactobacillus buchneri</i>	38
4.4. <i>Bacillus coagulans</i>	42
4.5. <i>Bacillus megaterium</i>	47
4.6. <i>Bacillus subtilis</i>	52
4.7. Crescimento Bacteriano X Consumo de Glicose.....	57
5. CONCLUSÕES.....	59
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

RESUMO

Este trabalho avaliou antibióticos utilizados na fermentação alcoólica industrial através do consumo de açúcar por bactérias contaminantes, associado ao crescimento bacteriano.

Para a realização dos testes foram utilizadas 6 linhagens de bactérias isoladas de fermentação industrial: *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, *Bacillus coagulans*, *B. megaterium* e *B. subtilis*.

As bactérias foram inoculadas em meio de cultivo à base de glicose e submetidas à dosagem recomendada dos antibióticos, e também ao dobro e à metade, para cada um dos dois produtos testados: Biopen 450®, que tem penicilina como princípio ativo, e Kamoran WP®, cujo princípio ativo é a monensina. As amostras para análises foram retiradas nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas de ensaio e submetidas aos seguintes testes: contagem de microrganismos, concentração de glicose e pH.

Nenhuma das dosagens utilizadas dos dois antibióticos permitiu o crescimento bacteriano ou detecção do consumo de glicose durante as 48 horas de ensaio. O crescimento bacteriano e o consumo de glicose só puderam ser observados para os tratamentos controle. A relação consumo de açúcar/crescimento celular apresentou diferenças consideráveis entre as cepas e foi determinada como 1,61 a 4,97 e 1,01 a 1,56 g/ciclo logarítmico para os *Bacillus* e *Lactobacillus*, respectivamente.

Mesmo as menores dosagens estudadas dos dois produtos reduziram as populações nas primeiras seis horas de ensaio. Porém, houve sinais de crescimento ao final do ensaio (48 horas) para quatro das seis bactérias estudadas nas fermentações com o produto à base de penicilina (Biopen), pelo menos nas menores dosagens. Este fato pode estar associado à resistência bacteriana, já que a penicilina vem sendo utilizada pela indústria alcooleira desde a década de 50.

Em geral, o produto Biopen atuou mais rapidamente na redução das populações enquanto que o produto Kamoran foi mais eficiente em tratamento prolongado.

SUMMARY

This work analyses antibiotics used in alcohol industrial fermentation through the consumption of sugar by contaminating bacteria, associated with bacterial growth.

Six strains of isolated industrial fermentation bacteria were used in the experiments: *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, *Bacillus coagulans*, *B. megaterium* and *B. subtilis*.

These bacteria were inoculated in a glucose based defined broth medium and submitted to the recommended concentration. They were also submitted to double and half the recommended concentration, for each of the two tested products: Biopen 450®, which has penicilin as the active principle, and Kamoran WP®, whose active principle is monensin. The samples for the analyses were harvested in 0, 6, 24 and 48 hours assay time and submitted to the following tests: counting of microorganisms, and assessing the concentration of glucose and the pH level.

None of the utilised concentrations permitted bacterial growth or the determination of glucose consumption during the 48 assay hours. The bacterial growth and glucose consumption could only be observed in the control treatments. The ratio glucose consumption/cellular growth presented considerable differences between the six bacterial strains and was determined from 1.61 to 4.97, and from 1.01 to 1.56 logarithm grams/cycle, for the *Bacillus* and *Lactobacillus*, respectively.

Even in the smaller doses of the two products studied the bacterial population was reduced in the first six assay hours. However, there were signs of growth at the end of the assay (48 hours) for four of the six bacteria used, in the fermentation using the penicilin based product (Biopen), at least in the smaller concentrations. This fact could be associated with bacterial resistance, since penicilin has been used by the alcohol industry from the 1950s.

In general, the product Biopen acted more rapidly in reducing the bacterial population, while the product Kamoran was more efficient in a prolonged treatment.

1. INTRODUÇÃO

A indústria da cana-de-açúcar no Brasil vem ocupando posição de destaque no cenário econômico desde a sua implantação. A partir da década de 70, com a instalação do Proálcool (Programa Nacional do Álcool), na busca de uma solução para a crise do petróleo, o Brasil tornou-se pioneiro na produção em larga escala de um combustível alternativo em substituição à gasolina (BERTELLI, 1992).

Nos últimos 20 anos assistiu-se ao crescimento da atividade sucroalcooleira com a implantação de novas destilarias de álcool e concomitante aprimoramento dos processos industriais de fermentação alcoólica, e desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de melhorar o seu rendimento e produtividade.

Grandes esforços têm sido feitos no sentido de isolar, caracterizar e controlar a microflora contaminante dos processos de fermentação alcoólica, uma vez que ela é reconhecidamente causadora de problemas, tais como: consumo de açúcar e etanol, queda da viabilidade das leveduras pela produção de metabólitos extracelulares (ALTERTHUM *et al.*, 1984; CHIN & INGLEDEW, 1994), floculação das leveduras ocasionando perda de células pelo fundo de dorna ou na centrifugação, e queda de rendimento alcoólico (AMORIM & OLIVEIRA, 1982).

Vários trabalhos de identificação da microflora contaminante da fermentação alcoólica têm sido realizados (RODINI, 1985; ROSALES, 1989; GALLO, 1989; OLIVA-NETO, 1990) e destacam o predomínio das bactérias Gram-positivas e, dentre estas, dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*.

O amplo conhecimento da flora contaminante da fermentação tem contribuído na busca por produtos eficientes para o seu controle. Pesquisas de avaliação da atividade de agentes antimicrobianos têm sido realizadas (CRUZ *et al.*, 1985; BOURDAREL & RAMIREZ, 1986; BRAUNBECK, 1988; RODINI, 1989; ROSALES, 1989; STUPIELLO, 1993; ALCARDE, 1995; OLIVA-NETO, 1995; HYNES *et al.*,

1997) no sentido de orientar uma utilização racional destes produtos permitindo a melhoria do desempenho industrial.

Esses trabalhos, conduzidos em laboratório, contribuíram para a avaliação dos produtos utilizados na indústria, mas nenhum deles relacionou sua eficiência à queda do consumo de açúcar pelas bactérias. A eficácia dos produtos para controle da infecção tem sido relacionada à sua capacidade em diminuir a população contaminante. O consumo de açúcar, juntamente com outros efeitos como a produção de metabólitos inibidores, é apontado como um dos principais prejuízos causados pelos contaminantes da fermentação.

Este trabalho teve como objetivo estudar a ação de antibióticos sobre linhagens de bactérias consideradas contaminantes da fermentação alcoólica. O estudo avaliou a atividade de antibióticos utilizados na indústria alcooleira introduzindo o parâmetro consumo de açúcar como instrumento dessa avaliação, associado ao crescimento celular bacteriano.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Os Contaminantes

2.1.1. Matéria-Prima (Cana-de-Açúcar)

Na indústria alcooleira, a cana-de-açúcar e seu caldo passam por sucessivas etapas de processamento. O caldo extraído da cana-de-açúcar é submetido, ao longo da linha industrial, a variações em suas condições físico-químicas como temperatura, pH, presença de substâncias inibidoras no substrato, concentração de oxigênio, etc. Esses fatores atuam diretamente na seleção dos microrganismos presentes. Segundo GALLO (1989) as condições peculiares de cada etapa do processo selecionam o desenvolvimento de determinados microrganismos.

O caldo da cana-de-açúcar favorece o crescimento de uma flora microbiana diversificada graças a sua composição em nutrientes orgânicos e inorgânicos (TILBURY, 1975; MacMASTER & RAVNO, 1977), alta atividade de água, pH e temperatura favoráveis (GALLO, 1989). DUNCAN & COLMER (1964) encontraram níveis de 10^4 a 10^8 bactérias e de 10^3 a 10^4 fungos por grama de cana saudável. Os autores isolaram 198 microrganismos de partes diferentes da cana-de-açúcar, do caldo e de plantas de idades distintas, encontrando os coliformes *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* e *A. cloacae*.

BEVAN & BOND (1971) isolaram 50 microrganismos diferentes de cana-de-açúcar sadia, encontrando as bactérias *Leuconostoc*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*. As leveduras isoladas foram *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia*. Os autores isolaram grande número de *Actinomyces* e também *Penicillium* e outros fungos.

A queima da cana visa reduzir as impurezas vegetais e facilitar o corte (RIGHI, 1975). Porém, essa prática destrói a cera protetora que envolve o colmo deixando a

planta mais susceptível ao ataque de microrganismos. Testes indicaram que certos componentes da cera têm alguma ação bacteriostática, já que sua remoção por aquecimento da cana durante a queima permite que os microrganismos cresçam mais livremente utilizando o caldo exsudado (BEVAN & BOND, 1971). Os autores afirmam que as temperaturas alcançadas durante a queima não afetam todos os microrganismos encontrados na cana verde. Esses autores isolaram 17 microrganismos diferentes da superfície cana queimada, alguns 10 minutos após a queima. Destes últimos, a maioria eram bastonetes, dos quais 5 foram extremamente resistentes ao calor e 2 eram formadores de esporos. Dois outros microrganismos isolados eram produtores de dextrana. Do total dos isolados alguns foram identificados como: *Leuconostoc*, *Xanthomonas*, *Bacterium*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Torula*, *Rhodotorula* e *Candida*. TILBURY (1975) citando MAYEUX¹ afirma que microrganismos podem crescer livremente em cana queimada podendo alcançar valores de 10⁹ unidades por grama de exsudado nos colmos quentes e úmidos.

Alguns estudos evidenciaram a relação entre tipo de corte e a contaminação microbiana da cana-de-açúcar (EGAN, 1965; 1968). Segundo TILBURY (1968) a contaminação pode ocorrer por ferramentas de corte.

KAJI & CANHOS (1989) pesquisando a flora microbiana da cana-de-açúcar após cerca de uma hora e meia do corte mecanizado, isolaram principalmente *Leuconostoc*, *Xanthomonas* e *Aerobacter*.

2.1.2. O Armazenamento e Lavagem da Cana

O tempo de armazenamento da cana após a queima é um fator importante na contaminação da mesma. HES (1952), EGAN (1965; 1966; 1968) e BRUJIN (1966) verificaram a deterioração da cana quando armazenada. TILBURY (1975) estudou o efeito da estocagem de cana sobre o crescimento de bactérias lácticas, que alcançaram valores de 10⁷ a 10⁸ unidades/ml até o quarto dia de armazenamento,

4

¹ MAYEUX, P. A. **Some studies on the microbial flora of sugar cane.** 1960. M. S. Thesis - Louisiana State University.

com predominância de *Leuconostoc mesenteroides* e *L. dextranicum*. Além do quinto dia observou-se a predominância de prováveis *Lactobacillus*, devido à queda do pH.

O processo de lavagem da cana, dependendo da qualidade microbiológica da água empregada, pode representar um foco de contaminação da matéria-prima. SERRA *et al.* (1979) verificaram que a população microbiana da água de lavagem de cana era 10 a 20 vezes maior em indústrias que utilizavam recirculação da água de lavagem. STUPIELLO (1982) afirma que a população microbiana da água de lavagem recirculada pode atingir níveis acima de 10^8 células/ml. Para o autor, o pH da água de lavagem determina o nível de sua contaminação, que diminui em pH 10 a 11, e aumenta em pH próximo da neutralidade.

2.1.3. A Extração e Tratamento do Caldo

Segundo TILBURY *et al.* (1977), durante a operação de extração do caldo da cana pela moenda, a perda da sacarose recuperável é de cerca de 1,0 a 2,5kg/tonelada de cana, variando segundo a limpeza e a eficiência da unidade. Os estudos laboratoriais indicaram que 62% da perda total de sacarose estão associados ao crescimento microbiano e 38% à inversão química e enzimática.

GANOU-PARFAIT *et al.* (1989) afirmam que a flora aeróbica é abundante na indústria da cana-de-açúcar até o início da fermentação. Os grupos isolados dos meios à base de caldo de cana-de-açúcar compreendem *Corynebacterium* aeróbicos, *Micrococcus* aeróbicos ou de metabolismo misto, *Pseudomonas*, *Enterobacterium*, *Bacillus* lácticos microaerófilos e *Clostridium* esporulados anaeróbios estritos.

Para YOKOYA (1989) a linha de processamento da cana e do caldo proporciona o crescimento microbiano que geralmente deriva na formação de gomas nas tubulações, calhas, peneiras e paredes de reservatórios. Dentre os microrganismos encontrados na linha de caldo estão *Leuconostoc*, algumas bactérias Gram-negativas como *Klebsiella* e *Enterobacter* (habitantes naturais das plantas),

Acetobacter (presentes em locais de aeração intensa) e *Bacillus*. Muitas espécies de *Klebsiella* e *Acetobacter* são produtoras de biopolímeros de natureza gomosa.

MAEDA (1997) isolou e identificou 32 linhagens de *Acetobacter* a partir de amostras de usina de açúcar e álcool. Das linhagens isoladas, a maioria foi obtida do caldo de cana-de-açúcar recém peneirado (46,87%), seguindo-se da peneira "cush-cush" (34,37%), da parede do tanque de coleta de caldo peneirado (9,38%) e da parede do decantador de caldo (9,38%).

O caldo misto, sob o ponto de vista de suas características físico-químicas, como pH entre 5 e 6, brix entre 10 e 18, temperatura entre 25 e 30°C, composição em aminoácidos e sais, é um excelente meio para o crescimento de uma grande variedade de microrganismos (RODINI, 1985).

LIMA *et al.* (1974) destacaram como principais contaminantes do caldo misto *Leuconostoc citrovorum*, *L. dextranicum*, *L. mesenteroides*, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus coagulans*, *B. circulans*, *B. megaterium*, *Pseudomonas incognita*, etc. Para McMASTER & RAVNO (1975) as bactérias lácticas são as mais adaptadas ao caldo misto, especialmente *Leuconostoc mesenteroides*.

A clarificação do caldo misto é uma etapa importante no controle e seleção dos contaminantes do caldo de cana, já que atua na eliminação de células vegetativas (SKOLE *et al.*, 1977) selecionando formas esporuladas e bactérias produtoras de dextrana, que permanecem viáveis em caldo tratado a 115°C (LUCREDI *et al.*, 1984).

SILVA & CANHOS (1990) avaliaram a contaminação microbiológica de amostras de caldo de cana-de-açúcar clarificado e pasteurizado em um processo não convencional, que utiliza torre de resfriamento para o caldo. As amostras foram coletadas na entrada e saída da torre de resfriamento. Os autores observaram uma elevação média de 10 vezes no número de contaminantes totais do caldo durante a passagem pela torre. A microbiota isolada mostrou-se predominantemente bacteriana (88%) e Gram positiva (87%), sendo *Lactobacillus* o contaminante mais freqüente (38%), seguido de *Staphylococcus* (23%), *Leuconostoc* (12%), *Bacillus*

(3%) e *Klebsiella* (1%). As cepas de *Lactobacillus* identificadas foram *L. fermentum* (33%), *L. confusus* (18%), *L. viridescens* (11%) e *L. plantarum* (2%). As cepas de *Leuconostoc* identificadas foram *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (50%), *L. paramesenteroides* (27%) e *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (23%).

2.1.4. A Fermentação Alcoólica

Alguns dos contaminantes da indústria de produção de álcool são selecionados ao longo do processo e merecedores de atenção especial por serem acidófilos como *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (BEVAN & BOND, 1971; SHARPER, *et al.*, 1972; TILBURY, 1975), ou por resistirem à combinação de pH baixo e altas temperaturas como *Bacillus* (McMASTER & RAVNO, 1975) e *Clostridium* (CLARKE *et al.*, 1980).

O melão, subproduto da produção de sacarose, tem alto teor desse açúcar e pode ser utilizado na composição do mosto para a fermentação na produção de álcool. SOUZA *et al.* (1977) detectaram a presença de 102 e 513 microrganismos por grama do melão proveniente da fabricação de açúcares cristal e demerara (bruto), respectivamente.

AMORIM & OLIVEIRA (1982) citam como principais contaminantes da fermentação alcoólica *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*.

Estudos mais recentes apontam um predomínio de bactérias Gram-positivas (65,1%) no ambiente fermentativo, das quais 62,1% são *Bacillus*, 3% *Lactobacillus* e 1,5% *Leuconostoc* (RONDINI, 1985).

PILON & BERTOLINI (1989) isolaram *Bacillus*, *Listeria*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* de diferentes pontos do processo de fermentação alcoólica.

ROSALES (1989) identificou, entre 222 culturas isoladas de fermentação alcoólica, *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis*, *L. confusus*, *L. plantarum*, *L. vacinostercus*, *L. minor*, *L. fructivorans*, *L. delbrueckii*, *Bacillus coagulans*, *B. firmus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *Sporolactobacillus* sp, *Leuconostoc mesenteroides mesenteroides*, *L.*

mesenteroides dextranicum, *L. mesenteroides*, *Micrococcus varians*, *Staphylococcus* sp, *Acetobacter* sp, *Xantobacter* sp, *Pseudomonas* sp, *Citrobacter* sp, *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter cloacae*, *E. intermedius* e *E. aerogenes*. O autor cita os gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc* como predominantes em variedade e número, e em número, respectivamente.

GALLO (1989) isolou e identificou 334 culturas microbianas amostradas de diferentes pontos do processo fermentativo. A microbiota era composta de 98,52% de bactérias Gram-positivas, das quais 87,76% eram bastonetes, dentre eles 73,95% bastonetes não esporulados. O autor identificou as culturas como: 59,75% de *Lactobacillus*, entre eles *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. animalis*, *L. buchneri*, *L. acidophilus*, *L. vitulinus*, *L. viridescens*, *L. amylophilus*, *L. agilis*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. murinus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. coryniformis* subsp. *torquens* e *L. sake*; 26,58% de *Bacillus*, entre eles *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. lentus*, *B. pasteurii*; 8,76% de *Staphylococcus*; 1,56% de *Micrococcus*; 1,48% de representantes da família Enterobacteriaceae; 1,26% de *Pediococcus* e 0,70% de *Streptococcus*.

A presença de *Leuconostoc* como contaminante da fermentação alcoólica não causa distúrbios significativos dada sua baixa resistência ao etanol. Ao final de fermentação mista simulada associando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* às bactérias *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides mesenteroides*, apenas os *Lactobacillus* foram recuperados. A morte das bactérias do gênero *Leuconostoc* foi atribuída ao efeito inibitório do etanol, que em concentrações de 3% reduziu em 50% a velocidade específica máxima de crescimento e em concentrações superiores a 6% interrompeu totalmente o crescimento (KAJI, 1989). Segundo GANOU-PARFAIT *et al.* (1989) a anaerobiose relativa provocada pela fermentação causa a diminuição da população de *Leuconostoc*.

OLIVA-NETO (1990) analisando amostras de "leite de levedura" sem tratamento ácido isolou: 62% de *Lactobacillus fermentum*, 9% de *L. murinus*, 9% de *L. vaccinoferus*, 2% de *L. plantarum* e 2% de *Leuconostoc*. Entre as cepas

isoladas, 95-100% mostraram-se resistentes a concentrações de 7 % v/v de etanol e 43-73 % do total resistiram a concentrações de 10 % de etanol.

2.2. As Conseqüências da Contaminação da Fermentação

Diversos autores que estudam o efeito de bactérias contaminantes apontam que a presença e crescimento das mesmas na fermentação alcoólica provoca perda de açúcar, que não é utilizado na produção de etanol, mas para a síntese de outros produtos. Estes produtos representam prejuízos no rendimento em etanol e podem causar problemas operacionais bem como a inibição da atividade da levedura.

2.2.1. O Rendimento Fermentativo

SERRA *et al.* (1979) analisando amostras de usina de açúcar e álcool, relataram queda de 15% no rendimento fermentativo devido a contaminantes promotores da floculação do fermento. ALTERTHUM *et al.* (1984) observaram a queda no rendimento alcoólico, variando de 14 a 90% do valor teórico, quando a concentração de bactérias atinge 10^8 a 10^9 células/ml, em ensaios fermentativos artificialmente contaminados conduzidos em laboratório. CRUZ *et al.* (1985), também em ensaios laboratoriais, obtiveram quedas de rendimento alcoólico de até 98,0% em fermentações sucessivas contaminadas com bactérias em níveis de até 10^9 células/ml, quando verificou-se a inibição da fermentação pelas leveduras.

AMORIM *et al.* (1981) estabeleceram uma correlação inversa entre a acidez fixa do vinho e o rendimento alcoólico. Os menores rendimentos observados (60 %) acompanhavam uma acidez do vinho entre 5 e 6 g/l de ácido sulfúrico.

Em estudo da fermentação alcoólica com leveduras em associação com *Lactobacillus fermentum*, observou-se uma diminuição de até 46,7 % no rendimento fermentativo, em relação ao teórico, e queda de até 53,5 % na produtividade de etanol, devido a elevação da acidez. Os níveis máximos de acidez observados coincidiram a menor taxa de consumo de açúcar, 59,7% de ART, devido a diminuição da velocidade de consumo pela levedura (OLIVA-NETO, 1990).

2.2.2. A Produção de Metabólitos Bacterianos

Muitos estudos focalizaram a produção de metabólitos pelas bactérias contaminantes, e seus efeitos deletérios sobre a fermentação alcoólica (NEVES, 1938; ALMEIDA, 1940; SAMSON *et al.*, 1955; GALLI, 1961; AMORIM & OLIVEIRA, 1982).

MAIORELLA *et al.* (1983) determinaram os níveis de inibição de vários produtos de fermentação secundária durante a fermentação alcoólica contínua com *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo os autores, os ácidos acético, fórmico e láctico, e o butanodiol inibem leveduras nas concentrações de 0,9g/l, 1,2g/l, 17g/l e 55g/l, respectivamente.

ESSIA NGANG *et al.* (1989) citam o ácido láctico como o composto de maior importância dentre os metabólitos produzidos por bactérias lácticas durante a fermentação alcoólica por leveduras, utilizando melão de beterraba. O principal efeito deletério do ácido láctico observado foi a diminuição da taxa de crescimento específica das leveduras. A ação inibitória do ácido láctico foi potencializada pelo aumento da pressão osmótica do meio, especialmente aquela exercida pelos compostos não fermentescíveis.

ESSIA NGANG *et al.* (1990) observaram um mecanismo alternativo utilizado por uma bactéria láctica homofermentativa (*Lactobacillus casei*) durante a fermentação alcoólica de melão de beterraba por leveduras. Essas bactérias passam a produzir no meio, além do ácido láctico, outros produtos, especialmente ácido acético. Os autores sustentam que a inibição da fermentação observada não é causada pela competição por nutrientes do meio, uma vez que o *L. casei* em cultura pura consumiu apenas 12g.l⁻¹ de sacarose, em 48 horas. A inibição das leveduras é consequência da produção de metabólitos, que têm sua ação aumentada por outros componentes do meio e também de interações entre células viáveis de leveduras e *Lactobacillus*. Observou-se uma queda na taxa de crescimento das leveduras da ordem de 50%, causada pela produção de 2,5 g.l⁻¹ de ácido láctico pelas bactérias. Para que a mesma queda fosse observada, foi necessária a adição de cerca de

10g.l⁻¹ de ácido láctico ao meio. Entretanto, o ácido láctico produzido pelo contaminante foi somente responsável por cerca de 25% da inibição total observada.

Para ESSIA NGANG *et al.* (1992) a presença de monossacarídeos (glicose e frutose), liberados durante a hidrólise da sacarose pelas leveduras, é o maior fator estimulante do desenvolvimento das bactérias lácticas, uma vez que esses açúcares são facilmente assimiláveis.

CHIN & INGLEDEW (1994) relataram que a fermentação alcoólica de trigo contaminada com altos níveis de *Lactobacillus delbrueckii* provoca uma queda da viabilidade celular de leveduras superior a 60%. Essa diminuição foi causada pela alta concentração de ácido láctico (14g/l) produzido por este microrganismo. Entretanto, o rendimento fermentativo não foi afetado.

HUANG *et al.* (1996) testaram algumas cepas de bactérias lácticas isoladas de vinhos comerciais para uma atividade antagônica sobre *Saccharomyces cerevisiae* e *S. bayanus*. Três das cepas testadas provocaram fermentações alcoólicas lentas, e uma delas causou a inibição das duas leveduras testadas obtendo-se, como produto final, vinhos de acidez elevada.

2.2.3. Distúrbios Operacionais

Alguns estudos têm relacionado problemas operacionais da indústria à presença de gomas de origem bacteriana (TILBURY, 1968; 1971; 1975; BEVAN & BOND, 1971).

A produção de polissacarídeos como a dextrana, pode causar a floculação do fermento e, conseqüentemente, a perda de eficiência das centrífugas separadoras. JOLLY & PRAKASH (1987) avaliaram que 50% da goma produzida não é eliminada pelo processo de clarificação.

A floculação do fermento pode estar associada à presença de bactérias contaminantes ou de leveduras selvagens floculantes (YOKOYA, 1989).

O fermento floculado causa alguns distúrbios ao processo fermentativo, tais como: entupimento de tubulações e centrífugas separadoras; queda na taxa de eliminação

dos contaminantes da fermentação pela centrifugação (eles retornam ao sistema presos aos flocos de fermento) provocando um aumento no consumo de ácido sulfúrico e desinfetantes; perda de fermento nas centrífugas e fundo de dornas e redução da superfície de contato entre a célula de levedura e o substrato provocando a diminuição da velocidade de fermentação (AMORIM & OLIVEIRA, 1982; JOLLY & PRAKASH, 1987; YOKOYA & OLIVA-NETO, 1991).

SERRA *et al.* (1979) associaram a floculação de leveduras à presença de bactérias do gênero *Sporolactobacillus*, que mostraram-se capazes de causar a adesão entre as células de leveduras e a adesão de si mesmas às leveduras. Esse fenômeno ocorre pela produção de uma capa protéica de natureza gelatinosa. *Bacillus* também promoveu a floculação do fermento, porém mostrou-se sensível ao tratamento ácido ao contrário de *Sporolactobacillus* que resistiu a pH de 1,9 a 2,0.

ROSALES *et al.* (1989) associaram a floculação de *Saccharomyces carlbergensis* à presença de diferentes bactérias, com conseqüente produção de flocos com variações em tamanho, em grau de sedimentação e em dissociação com tratamento ácido. As bactérias envolvidas foram identificadas como *Leuconostoc mesenteroides mesenteroides*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus confusus* e *Aerobacter aerogenes*.

YOKOYA & OLIVA-NETO (1991) comprovaram a capacidade de certas linhagens de *Lactobacillus fermentum* em promover a floculação do fermento. A capacidade floculadora requereu a presença de íons cálcio e foi eliminada pelo tratamento térmico ou pela ação de proteases. Os autores estabeleceram a relação entre as massas de leveduras e bactérias e a faixa de pH necessários à ocorrência da floculação.

BROMBERG (1994) estudou o mecanismo de floculação de *Saccharomyces cerevisiae* provocado por *Lactobacillus fermentum* e observou uma condição máxima de floculação quando as concentrações de células de bactérias e levedura atingiam valores de 0,16 e 3,39 g/l (massa seca), respectivamente. Os íons Ba^{+2} , Ca^{+2} , Sr^{+2} , Mg^{+2} , K^+ e Na^+ ($8,0 \times 10^{-4}$ M) promoveram a floculação e a concentração mínima de

cálcio requerida foi igual ou superior a 2×10^{-4} M. Os íons sódio e cálcio em concentrações de $4,0$ e $8,0 \times 10^{-4}$ M, respectivamente, apresentaram efeito sinérgico na inibição da floculação.

2.3. Agentes Antimicrobianos

As principais categorias de antimicrobianos químicos utilizados pela indústria sucroalcooleira e seu modo de ação são descritos à seguir:

1. Compostos fenólicos - Em altas concentrações agem penetrando e rompendo a parede celular do microrganismo provocando a precipitação das proteínas protoplasmáticas. Em concentrações baixas estes compostos agem promovendo a inativação de enzimas essenciais à manutenção da célula (EGUCHI, 1989).

2. Compostos clorados - Seu modo de ação tem sido objeto de muitas teorias, das quais LAWRENCE & BLOCK (1968) descrevem algumas: a) liberação de oxigênio nascente que combina-se com componentes do protoplasma celular destruindo o microrganismo; b) combinação do cloro com proteínas da membrana celular formando N-cloro, que interfere no metabolismo celular levando o microrganismo à morte; c) modificação da membrana celular pelo cloro permitindo a difusão do conteúdo celular interno para o meio externo e d) inibição de enzimas fundamentais para a ocorrência das reações celulares.

Várias outras teorias tentam explicar o mecanismo de ação dos compostos clorados, e todas relatam uma ação rápida, que ocorre logo após sua adição ao meio.

3. Quaternários de amônio - EGUCHI (1989) descreveu como formas de ação destes compostos, entre outras: desnaturação de proteínas, interferência na glicólise e danos à membrana.

4. Aldeídos - São geralmente utilizados na forma de formaldeído e glutaraldeído. O formaldeído parece provocar o crescimento desbalanceado da célula causado pelo bloqueio de funções específicas, tais como, síntese da parede celular ou acúmulo de substância celular, que inibe a formação da metionina vital para a célula. Já o glutaraldeído tem atuação sobre as proteínas superficiais da célula (EGUCHI, 1989).

5. Antibióticos - Segundo EGUCHI (1989) os antibióticos são agentes quimioterapêuticos especiais, geralmente obtidos a partir de metabólitos de microrganismos que, em quantidades muito pequenas, podem matar ou inibir outros microrganismos. O termo antibióticos engloba uma grande diversidade de substâncias que podem ser classificadas segundo seu mecanismo de ação. O autor cita como antibióticos mais utilizados na fermentação alcoólica a tetraciclina, cloranfenicol, penicilina e virginiamicina.

Nas décadas de 50 e 60 foram realizados vários estudos sobre a utilização da penicilina, como desinfetante da fermentação alcoólica, resultando no uso industrial desses produtos em meios de origem amilácea (DAY et al., 1954 ; BORZANI, 1957) e em mosto de cana-de-açúcar (BORZANI & AQUARONE, 1957).

Estudos de avaliação do uso individual de outros antibióticos também foram realizados para tetraciclina (AQUARONE, 1950), cloranfenicol (AQUARONE, 1959; AQUARONE & BRAZZACH, 1960 e 1963) e clorotetraciclina (TORLONI, 1958). Estes produtos não obtiveram o mesmo sucesso do emprego industrial da penicilina.

AQUARONE (1959) estudou a influência da penicilina e tetraciclina na fermentação de mosto de melão concluindo que: a) concentrações de 15mg/ml de tetraciclina parecem inibir a contaminação por *Leuconostoc*; b) concentrações de até 30mg/l de tetraciclina não afetam a fermentação nem a multiplicação do fermento; c) concentrações de penicilina de até 5.000.000 U/l no mosto não influenciam a fermentação e d) a utilização de penicilina em fermentação alcoólica pelo processo clássico traz grandes vantagens econômicas para a indústria.

AQUARONE *et al.* (1966) compararam o desempenho de ácido sulfúrico e penicilina G potássica sobre contaminantes da fermentação e concluíram que o uso da penicilina (500 U/l) é mais vantajoso, principalmente se utilizada em todo o processo, ou seja na fermentação e pré-fermentação (tratamento do fermento).

AQUARONE *et al.* (1968) estudando o uso associado de penicilina e cloranfenicol na fermentação alcoólica concluiu que 250 unidades de penicilina/l combinadas com

diferentes quantidades de cloranfenicol apresentaram menor poder antimicrobiano do que concentrações inferiores dos antibióticos utilizados isoladamente. A associação de 125 unidades de penicilina com 125mg de cloranfenicol foi a mais econômica dentre as estudadas. O emprego de penicilina e cloranfenicol, associados ou isolados, como desinfetantes em processo MELLE BOINOT resultou num maior rendimento em álcool, vinho de menor acidez e ainda um menor tempo de fermentação. O autor destaca como vantagens o baixo custo e produção local de penicilina e, para o cloranfenicol, a produção local, a estabilidade ao calor e o fato de ser estimulante da fermentação.

FRANCO (1978) aconselha o uso de 1,5 a 2,0g de penicilina ácida por m³ de mosto no tratamento de choque dos contaminantes da fermentação alcoólica.

SATTO *et al.* (1980) realizando estudo comparativo do efeito de sais de lucensomicina e sulfato de aminosidina e de penicilina como controladores de contaminantes da fermentação alcoólica de melaço de cana-de-açúcar, concluíram pelo uso da penicilina.

Uma das sérias limitações ao uso contínuo de antibióticos na indústria é o desenvolvimento de seletividade das bactérias, que tornam-se cada vez menos sensíveis à sua ação, e também a alteração do equilíbrio natural da microflora contaminante, já que as bactérias Gram-negativas, em geral, não são afetadas. CRUZ *et al.* (1985) recuperou uma das duas linhagens de bactérias Gram-positivas isoladas de indústrias de álcool quando submetidas à ação de 500 U/l de penicilina V ácida. Apenas a linhagem de forma cocóide pôde ser controlada.

RODINI (1989) verificou a ação de penicilina e pentaclorofenol sobre bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*. *Acinetobacter* cresceu em concentrações de até 400ppm de penicilina e 100ppm de pentaclorofenol. As bactérias dos 3 últimos gêneros testados mostraram-se resistentes a 400ppm de penicilina e foram eliminadas a 40ppm de pentaclorofenol.

STUPIELLO (1993) avaliou as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de cloranfenicol, fermacol®, penicilina V potássica, quaternário de amônio e

virginiamicina sobre as bactérias *Lactobacillus buchneri*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus brevis*, *B. megaterium*, *B. coagulans* e *B. subtilis*. Os valores de CIM para quaternário de amônio (10 ppm) foram os únicos que não variaram entre os microrganismos testados.

OLIVA-NETO (1995) avaliou a concentração inibitória mínima (CIM) de *Lactobacillus fermentum* e *Leuconostoc mesenteroides* frente à atuação de alguns produtos, obtendo os seguintes resultados: clindamicina (0,05 - 0,40 µg/ml), penicilina V ácida (0,05 - 0,20 µg/ml), sulfito de sódio (10,0 - 40,0 µg/ml) e formaldeído (11,5 - 23,0 µg/ml)

ALCARDE (1995) avaliou a ação de virginiamicina, penicilina V potássica, Kamoran HJ, tetraciclina e os quaternários de amônio Bactol Q e Adesol sobre suspensões de esporos ativados de *Bacillus subtilis*, *B. coagulans*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus* e *Sporolactobacillus* sp., que são microrganismos encontrados no caldo de cana após o tratamento térmico. O produto Bactol Q foi o mais eficaz no controle de todas as bactérias testadas.

HYNES *et al.* (1997) investigaram a ação de virginiamicina sobre o crescimento e produção de ácido láctico por sete cepas de *Lactobacillus*, algumas isoladas de fermentação alcoólica, durante a fermentação alcoólica de vinho de trigo por leveduras. Segundo os autores, a menor concentração testada (0,5 mg.Kg⁻¹) foi efetiva no controle das bactérias, exceto para *Lactobacillus plantarum*. O uso de virginiamicina preveniu ou reduziu perdas potenciais de rendimento de mais de 11% na produção de etanol. O estudo mostra ainda uma redução na efetividade de virginiamicina sob incubação prolongada, especialmente na ausência de leveduras.

A Elanco Química Ltda produtora do antibiótico Kamoran®, que tem se mostrado eficaz contra as principais bactérias da fermentação alcoólica, recomenda sua dosagem em 1,0 a 3,0 ppm; especifica que o antibiótico interfere na habilidade da membrana plasmática em transportar nutrientes para dentro da célula bacteriana causando sua desnutrição (ANTIBIÓTICO HJ - Elanco, 1994).

2.4. Metodologias de Avaliação do Efeito Antimicrobiano

Algumas metodologias para avaliação dos antimicrobianos utilizados na indústria alcooleira têm sido sugeridas. CEREDA *et al.* (1981) e OLIVEIRA *et al.* (1993) propuseram métodos de avaliação de antimicrobianos através da variação da densidade ótica, determinada por espectrofotometria, de culturas de bactérias isoladas da indústria sucroalcooleira em meio líquido com diferentes doses do produto a ser testado.

CEREDA *et al.* (1981) propõem a utilização de *Leuconostoc* sp. isolado de moenda como microrganismo teste na avaliação de antimicrobianos utilizados no setor açucareiro. Já STUPIELLO (1993) recomenda a utilização de *Lactobacillus plantarum* como microrganismo teste, já que foi a cepa mais resistente frente a todos os produtos testados em fermentação alcoólica.

OLIVEIRA *et al.* (1987) apresentaram duas técnicas de avaliação de antimicrobianos em trabalho que propõe sua normatização. Um dos métodos, baseado na técnica de Lederberg & Lederberg, utiliza meio sólido e o outro utiliza meio líquido contendo simultaneamente 5 gêneros de bactérias submetidas a diferentes concentrações de antimicrobiano, com um tempo de contato de 6 horas.

STUPIELLO (1993) utilizou dois métodos para a obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) de agentes antimicrobianos. O método que utiliza meio sólido apresentou vantagens em relação ao que utiliza meio líquido, principalmente a possibilidade de testar maior número de microrganismos por placa de cultivo.

ALCARDE (1995) testou suspensões de esporos ativados de bactérias isoladas de fermentação alcoólica frente a diferentes doses de antimicrobianos em meio líquido, com tempos de contato de 3 e 6 horas.

OLIVA-NETO (1995) determinou a concentração inibitória mínima (CIM) de vários produtos utilizando método adaptado de outro autor baseado na macrodiluição em caldo através da variação na densidade ótica do meio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparo do Material Estéril

Toda vidraria, ou seja, pipetas graduadas e placas de Petri, foi esterilizada em estufa a 170°C por 2 horas, acondicionada em recipientes apropriados de aço inoxidável ou alumínio.

Os meios de cultivo, água, estojo com ponteiras e tubos para diluição serial foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos.

3.2. Bactérias

As bactérias utilizadas foram obtidas junto à coleção de culturas da FERMENTEC/ESALQ. Todas as linhagens foram isoladas de fermentação alcoólica industrial. A Tabela 1 mostra as bactérias utilizadas.

Tabela 1 - Linhagens de bactérias utilizadas e sua identificação junto à coleção de origem.

Microrganismos	Identificação
<i>Lactobacillus fermentum</i>	FT 017 B
<i>Lactobacillus plantarum</i>	FT 043 B
<i>Lactobacillus buchneri</i>	FT 041 B
<i>Bacillus coagulans</i>	FT 026 B
<i>Bacillus megaterium</i>	FT 022 B
<i>Bacillus subtilis</i>	FT 014 B

FT= Fermentec, Piracicaba, S.P.

As culturas foram obtidas liofilizadas. As linhagens foram reativadas em tubos contendo 10ml de MRS caldo (DIFCO 0881-17-5) e incubadas a 32°C, por 48 ± 2 horas. Depois de crescidas, 0,2ml das culturas foram transferidos para tubos de ensaio contendo 2ml de Litmus Milk (DIFCO 0107-17-3), que foram imediatamente congelados (-18°C). Foram produzidos 20 tubos para cada uma das bactérias estudadas. A Figura 1 esquematiza o método realizado para obtenção das culturas congeladas.

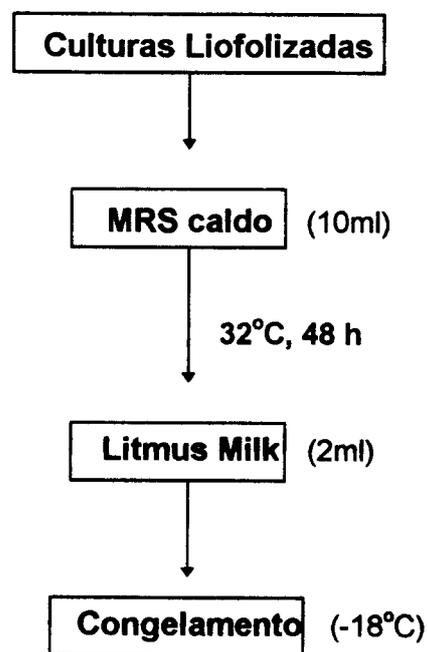


Figura 1 - Esquema de produção e manutenção das culturas de bactérias.

Para a realização de cada experimento, dois tubos da cultura congelada em Litmus milk foram descongelados e incubados a 32°C por 48 ± 2 horas.

3.3. Antibióticos

Os antibióticos utilizados são produtos de uso em escala industrial na fermentação alcoólica, sendo eles: Biopen 450® (92% de pureza mínima, BetzDearborn, Brasil), com penicilina V potássica como princípio ativo, e Kamoran WP® (100% de pureza, Eli Lilly do Brasil, Divisão Elanco) declarado como antibiótico, porém de princípio ativo não especificado; contudo consultas realizadas indicam tratar-se de monensina, antibiótico produzido pela Lilly. As dosagens utilizadas dos produtos foram as recomendadas pelos fabricantes. Foram testadas ainda o dobro e a metade das concentrações indicadas. A Tabela 2 mostra as concentrações usadas para cada um dos antibióticos testados.

Tabela 2 - Antibióticos e doses utilizadas nos ensaios.

Antibiótico	Concentração (ppm)
Biopen	1,0 - 2,0* - 4,0
Kamoran	1,5 - 3,0* - 6,0

*Dose recomendada pelo fabricante.

Os produtos foram dosados diretamente no meio de fermentação a partir de solução estoque em concentração de 100ppm. As soluções estoque foram preparadas por dissolução dos antibióticos em água destilada estéril, em frascos erlenmeyer previamente aferidos.

3.4. Meio de Cultivo

3.4.1. Fermentação

Foi utilizado um meio de fermentação sintético (ANDRIETTA & RODRIGUES, 1996). A glicose foi escolhida como fonte de carbono, pois ela é assimilada por todas as bactérias utilizadas. A opção por um meio sintético, à base de glicose, objetivou também facilitar as análises de açúcar consumido. Com esta prática eliminou-se o risco da presença de substâncias interferentes e/ou a necessidade de inversão prévia da sacarose. Como fonte de nitrogênio optou-se pelo uso do extrato de levedura, baseado nas observações de OLIVA-NETO (1995). Segundo o autor, o extrato de levedura é um estimulante do crescimento de bactérias lácticas durante a fermentação alcoólica, notadamente em concentrações superiores a 200mg/l. A Tabela 3 apresenta a formulação do meio de fermentação.

Tabela 3 - Composição do meio de fermentação.

Componentes	g/l
Glicose	40,0
KH ₂ PO ₄	5,0
NH ₄ Cl	5,0
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	1,0
KCl	1,0
Extrato de levedura	6,0

O pH do meio de fermentação é de 5,0 após a esterilização, um valor próximo do encontrado nas fermentações industriais.

3.4.2. Plaqueamento

Foi utilizado MRS agar (DIFCO 0882-17-0), para o plaqueamento e contagem das bactérias do gênero *Lactobacillus*, e PCA (DIFCO 0479-17-3) para as do gênero *Bacillus*.

3.5. Padronização do Inóculo

Os ensaios iniciaram-se com um nível de concentração celular de 10^4 células/ml no meio de fermentação.

As culturas inóculo foram obtidas de forma diferente para *Bacillus* e *Lactobacillus*. As bactérias do gênero *Bacillus* estudadas apresentam motilidade e, portanto, dificuldade em serem quantificadas por contagem direta via microscópio. O método desenvolvido para *Bacillus* inclui a aplicação de um choque térmico à suspensão inóculo. Esta prática objetiva a ativação dos esporos de *Bacillus* para que tornem-se passíveis de contagem.

3.5.1. *Lactobacillus* : Uma alçada da cultura de 48 horas ($32 \pm 1^\circ\text{C}$) crescida em Litmus Milk foi inoculada em erlenmeyer de 250ml contendo 50ml de MRS caldo. Esta cultura foi então incubada por uma noite a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e 150rpm. Após o período de incubação foi estimada a concentração de microrganismos por contagem microscópica em câmara de Neubauer. A partir da contagem obtida, foi feito o cálculo para que o inóculo atingisse uma concentração final de 10^4 células/ml no meio de fermentação. A Figura 2 mostra um esquema do método de padronização do inóculo para testes com *Lactobacillus*.

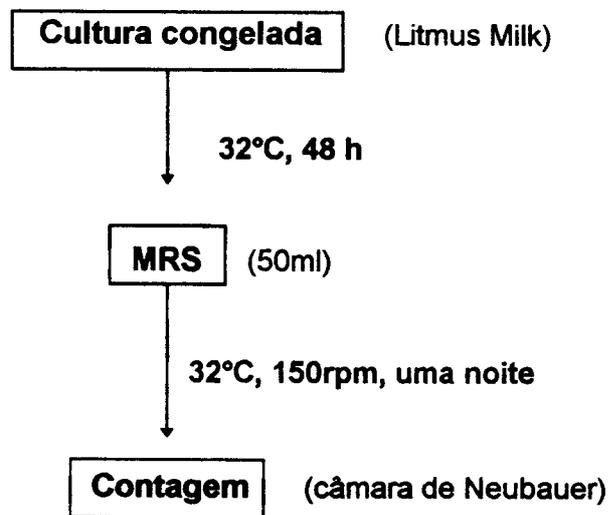


Figura 2 - Produção do inóculo para testes com *Lactobacillus*.

3.5.2. *Bacillus* : Uma alçada da cultura de 48 horas ($32 \pm 1^\circ\text{C}$) crescida em Litmus Milk foi inoculada em tubos com PCA inclinado. Os tubos foram incubados por 72 horas a $32 \pm 1^\circ\text{C}$, para indução da esporulação. Posteriormente, esta cultura foi transferida para tubos contendo 9ml de solução salina (NaCl 0,9%). Esses tubos foram submetidos a choque térmico em banho-Maria a 80°C por 10 minutos (ALCARDE, 1995). A suspensão bacteriana foi imediatamente resfriada e armazenada em geladeira (4°C), por cerca de 24 horas, até o momento do uso como inóculo dos testes com *Bacillus*. A concentração celular do inóculo foi estimada por plaqueamento em superfície. Uma amostra da suspensão bacteriana foi submetida a diluição serial em solução salina e inoculada em placas de PCA. Após o espalhamento de 0,1ml das amostras com alça de Drigalski, as placas foram incubadas a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 ± 2 horas. A Figura 3 mostra o método utilizado para produção do inóculo dos testes com *Bacillus*.

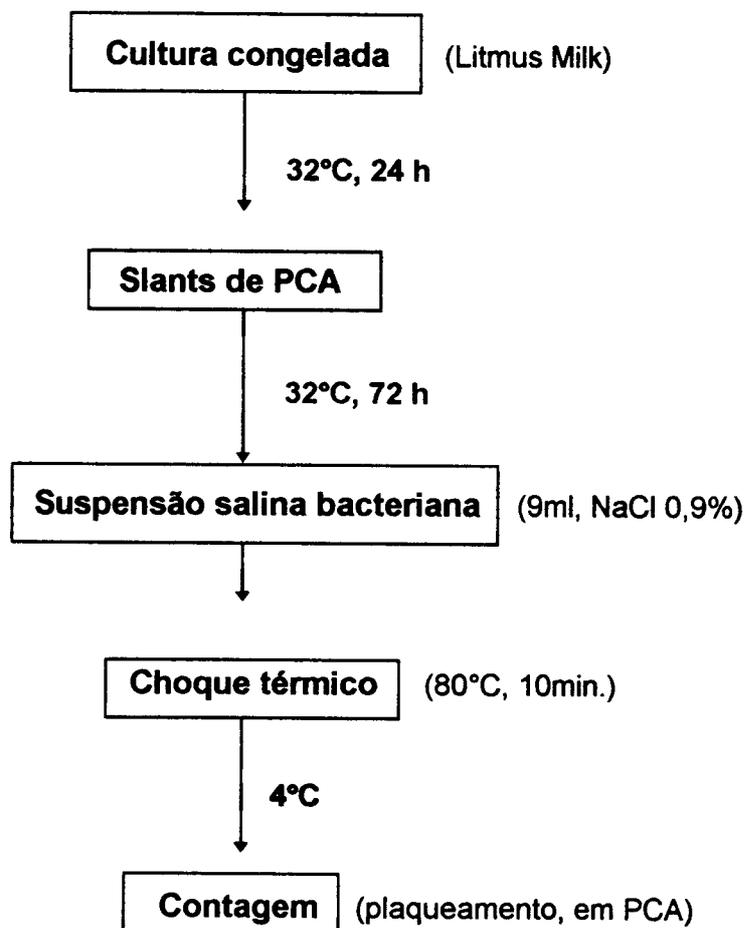


Figura 3 - Produção do inóculo para testes com *Bacillus*.

3.6. Condução dos Ensaio de Fermentação

Os ensaios foram realizados separadamente para cada bactéria estudada (item 4.2.). As fermentações foram conduzidas em frascos erlenmeyer de 250ml, previamente aferidos, contendo 120ml do meio de fermentação. Os frascos foram tampados com rodilhões de gaze e algodão industrial. As fermentações foram incubadas em agitador rotativo a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ e 150rpm por 48 horas. A relação volume do frasco/volume do meio e nível de agitação adotados pretenderam proporcionar uma condição de microaeração para as culturas.

O preparo dos frascos foi feito primeiramente com adição dos antibióticos em volume necessário para que as três concentrações estudadas fossem obtidas. Em seguida, foi feita a adição da suspensão ou da cultura de bactéria, através de micropipetas com ponteiros estéreis; as quantidades de inóculo eram de alguns μl , uma vez que as concentrações das bactérias nos inóculos preparados variaram entre 10^6 e 10^8 células/ml ou UFC/ml. Após a adição do antibiótico e inóculo, o volume final do frasco foi completado para 120 ml com meio de fermentação. Foi feita ainda uma fermentação controle onde não houve a adição de antibiótico. A tabela 4 relaciona a composição de cada tratamento para os testes realizados.

De cada tratamento foram retirados 20ml de amostra nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas de fermentação.

As amostras foram analisadas quanto à população de microrganismos, teor de açúcar e pH.

Tabela 4 - Tratamentos para os ensaios de fermentação.

Tratamento	Biopen	Kamoran
1	–	–
2	1,0 ppm	–
3	2,0 ppm	–
4	4,0 ppm	–
5	–	1,5 ppm
6	–	3,0 ppm
7	–	6,0 ppm

3.7. Metodologia Analítica

3.7.1. Contagem de microrganismos: A contagem foi feita por plaqueamento em superfície. Os meios utilizados para o plaqueamento foram MRS agar, para as bactérias do gênero *Lactobacillus*, e PCA para as do gênero *Bacillus*. As placas utilizadas foram preparadas com 24 ou 48 horas de antecedência, para facilitar a absorção das amostras. Essas amostras foram submetidas a uma diluição serial em solução salina (NaCl 0,9%) e transferidas para as placas com pipetas graduadas de 0,2 ml. Para cada amostra, três diluições subsequentes foram inoculadas em placas, em duplicata, para garantir uma contagem de 25 a 250 microrganismos por amostra. O espalhamento de 0,1ml das amostras na superfície dos meios foi realizado com auxílio de alça de Drigalski. As placas inoculadas foram incubadas a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 ± 2 horas e 24 ± 2 horas para *Lactobacillus* e *Bacillus*, respectivamente. Os resultados das contagens expressos em UFC/ml foram transformados em ciclos logarítmicos e percentagem de ciclos para sua discussão. Uma vez que as contagens em UFC/ml são números de elevada grandeza, a transformação direta em percentagem das variações de contagens populacionais expressas em UFC/ml dificulta a real avaliação dos resultados. Assim, neste trabalho, as contagens foram transformadas em logaritmo, de modo que a avaliação dos tratamentos foi realizada pela variação percentual da população em ciclos logarítmicos. A opção pela técnica de espalhamento em superfície fundamentou-se nas dificuldades encontradas na contagem de placas inoculadas com *Bacillus*, quando produzidas pela técnica "Pour Plate". Estas placas costumemente apresentaram colônias crescidas no fundo, com espalhamentos que dificultavam a visualização e contagem das colônias superiores.

3.7.2. Concentração de Glicose: As amostras foram analisadas para concentração de glicose pelo método enzimático da glicose-oxidase. O método baseia-se na oxidação da glicose catalisada pela enzima glicose-oxidase. Esta reação é associada à redução do reativo de cor (aminofenazona e fenol) com desenvolvimento de uma coloração rósea de intensidade proporcional à concentração de glicose na amostra. Para realização destes testes foi utilizado o Kit

para determinação de glicose pelo método enzimático da Laborlab S/A Produtos para Laboratórios, comumente empregado para determinações clínicas do teor deste açúcar. A reação foi realizada adicionando-se a 0,1 ml das amostras, adequadamente diluídas, 10 ml do reagente de cor contendo a enzima. Esta mistura foi incubada por 10 minutos a 37°C e depois resfriada para leitura da absorbância em espectrofotômetro a 505 nm. O fator de conversão dos valores de absorbância obtidos foi determinado a partir da regressão linear de curvas padrão de glicose versus absorbância, na faixa de concentração de 0,5 a 3,0 g/ml (5 pontos); os valores do coeficiente de correlação para as diversas curvas de calibração foram sempre superiores a 0,999.

3.7.3. pH: medido em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão de fosfato pH 4,0 e pH 7,0, a temperatura ambiente. A temperatura das amostras foi ajustada à temperatura ambiente antes da determinação de seu pH

3.8. Delineamento Experimental

O plano experimental dos ensaios previa um modelo de Experimentos em Grupo, com realização de dois ensaios para cada condição experimental, o que significa a realização de duas repetições. Contudo os resultados dos primeiros ensaios mostraram um comportamento uniforme, permitindo concluir pela não necessidade da repetição, uma vez que nenhuma contribuição prática seria acrescentada.

O projeto de pesquisa previa também a realização de análises complementares para determinação da acidez e biomassa em cada condição experimental. Porém, os resultados iniciais obtidos não mostraram-se adequados pela não adaptação à metodologia empregada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. *Lactobacillus fermentum*

Os antibióticos Biopen e Kamoran foram testados em três diferentes dosagens em relação a *L. fermentum*. Amostras para análise de UFC/ml, glicose e pH foram coletadas nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas. As Figuras 4, 5, 6 e 7 e as Tabelas 6 e 7 mostram os resultados obtidos.

Todas as dosagens estudadas para os dois produtos paralisaram o crescimento da população. Isto pode ser confirmado pela ausência de consumo de glicose e pela manutenção do pH. No controle, onde não houve a adição de antibiótico, o consumo de glicose foi da ordem de 3,92 g/l em 48 horas, e a queda de pH de 5,03 para 3,54.

Os resultados mostram que nas primeiras seis horas de ensaio a maior concentração do produto Biopen (4,0 ppm) reduziu a população em um nível de apenas 0,66 ciclos logarítmicos (12,36%). Neste mesmo tempo, o produto Kamoran nas dosagens 3,0 e 6,0 ppm reduziu a população em 2,16 e 1,50 ciclos logarítmicos (40,30% e 28,85%), respectivamente. Em PRINCIPAIS bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, suas características e sensibilidade a antibióticos (1991) a dosagem de 1,0 ppm de penicilina com um tempo de contato de 6 horas, reduziu a população de *L. fermentum* em 20,0% (índice não calculado sobre a variação logarítmica da população). O índice de redução obtido neste trabalho para a mesma dosagem e tempo de contato foi de 8,71% em ciclos logarítmicos.

Ao final do ensaio (48 horas), todas as concentrações de Biopen diminuíram a população em pelo menos 4 ciclos logarítmicos. Um índice de redução equivalente ao da dosagem de 1,0 ppm de Biopen, que foi maior que 4,28 ciclos logarítmicos (maior que 81,06%), foi atingido apenas pelas dosagens de 3,0 e 6,0 ppm do

Kamoran, cujos índices de redução foram maior que 4,36 e 3,80 ciclos logarítmicos (81,34% e 73,08%), respectivamente.

Os resultados mostram que o Kamoran nas dosagens de 3,0 e 6,0 ppm apresentou uma resposta mais rápida na redução da população de *L. fermentum*. Porém o Biopen, em todas as dosagens estudadas, mostrou-se mais eficiente em tratamento mais prolongado, ao inverso do ocorrido para a maioria das bactérias estudadas.

A menor dosagem estudada de Biopen (1,0 ppm) reduziu a população de maneira tão eficiente quanto as dosagens superiores. Para o Kamoran, as dosagens de 6,0 ppm e a recomendada (3,0 ppm) reduziram a população a níveis semelhantes e de modo mais eficiente que a dosagem de 1,5 ppm. Estes dados coincidem com aqueles obtidos por STUPIELLO (1993) que determinou em 0,5 ppm a concentração inibitória mínima (CIM) da penicilina para *L. fermentum*. OLIVANETO (1995) afirma que a penicilina foi, dentre os antibióticos testados, um dos produtos que apresentou os melhores resultados na inibição de *L. fermentum*. O autor obteve a CIM de 0,10 a 0,23 ppm para penicilina em 24 horas de contato, conforme o pH do meio e linhagem testados

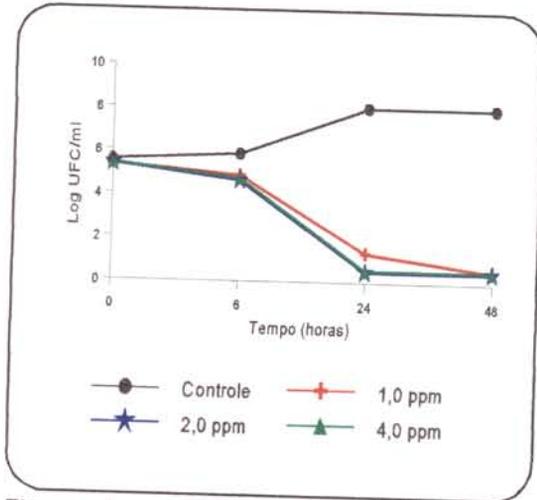


Figura 4 - População (UFC/ml) de *L. fermentum* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Biopen.

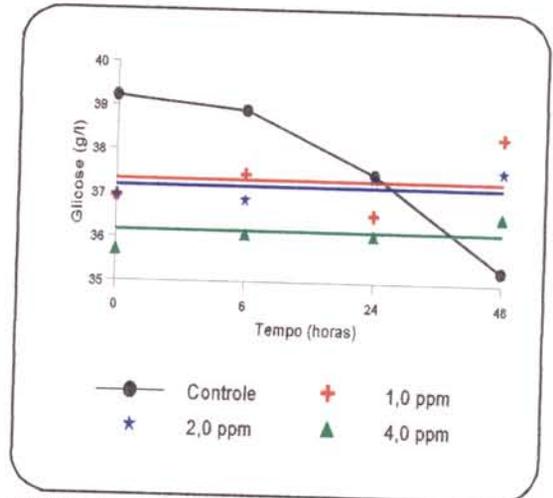


Figura 5 - Concentração de açúcar (g/l) da fermentação com *L. fermentum* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Biopen.

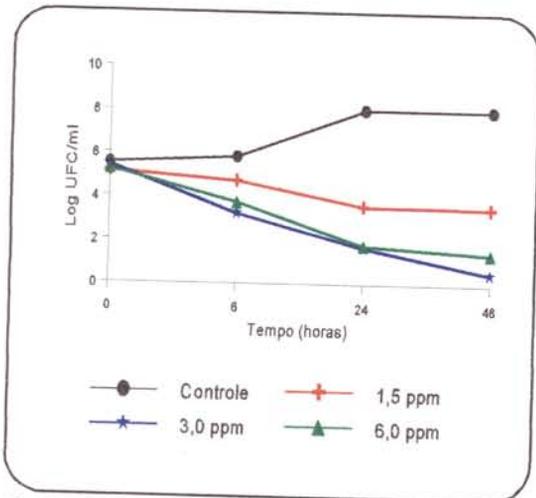


Figura 6 - População (UFC/ml) de *L. fermentum* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagem de Kamoran.

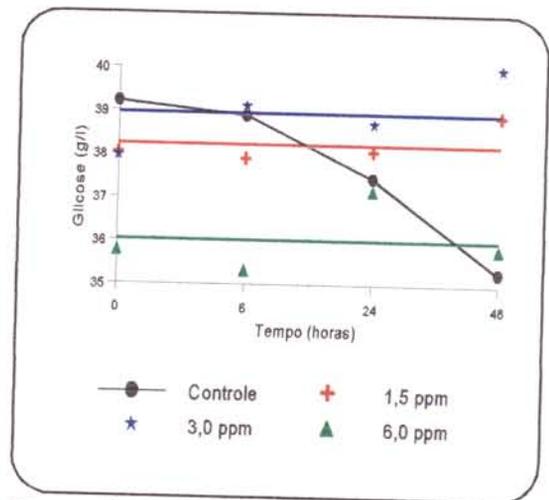


Figura 7 - Concentração de açúcar (g/l) da fermentação de *L. fermentum* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Kamoran.

Tabela 6 - População (UFC/ml), concentração de glicose (g/l) e pH para a fermentação com *L. fermentum* em função da aplicação de Biopen.

Análises	Biopen (ppm)	Tempo (horas)			
		0	6	24	48
População (UFC/ml)	Controle	3,3x10 ⁵	7,0x10 ⁵	1,1x10 ⁸	1,1x10 ⁸
	1,0	1,9x10 ⁵	6,6x10 ⁴	2,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
	2,0	2,0x10 ⁵	4,6x10 ⁴	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
	4,0	2,2x10 ⁵	4,8x10 ⁴	<1,0x10 ¹	<1,0x10 ¹
Glicose (g/l)	Controle	39,22	38,90	37,47	35,30
	1,0	38,00	37,88	38,07	38,90
	2,0	37,94	39,10	38,71	40,00
	4,0	35,75	35,30	37,16	35,82
pH	Controle	5,03	5,04	3,76	3,54
	1,0	5,05	5,05	4,91	4,91
	2,0	5,06	5,05	4,96	4,98
	4,0	5,06	5,06	4,98	5,00

Tabela 7 - População (UFC/ml), concentração de glicose (g/l) e pH para a fermentação com *L. fermentum* em função da aplicação de Kamoran.

Análises	Kamoran (ppm)	Tempo (horas)			
		0	6	24	48
População (UFC/ml)	Controle	$3,3 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$
	1,5	$1,3 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$	$3,7 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$
	3,0	$2,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^3$	$4,5 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^1$
	6,0	$1,6 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$	$5,5 \times 10^1$	$2,5 \times 10^1$
Glicose (g/l)	Controle	39,22	38,90	37,47	35,30
	1,5	36,91	37,42	36,52	38,32
	3,0	36,91	36,84	37,36	37,55
	6,0	35,69	36,07	36,07	36,52
pH	Controle	5,03	5,04	3,76	3,54
	1,5	5,05	5,06	4,98	5,02
	3,0	5,06	5,05	4,99	5,02
	6,0	5,06	5,06	5,00	5,03

4.2. *Lactobacillus plantarum*

Os antibióticos Biopen e Kamoran foram testados em três diferentes dosagens em relação a *L. plantarum*. Amostras para análise de UFC/ml, glicose e pH foram coletadas nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas. As Figuras 8, 9, 10 e 11 e as Tabelas 8 e 9 mostram os resultados obtidos.

Todas as dosagens estudadas para os dois produtos paralisaram o crescimento da população. Isto pode ser confirmado pela ausência de consumo de glicose e pela manutenção do pH. No controle, onde não houve adição de antibiótico, o consumo de glicose foi da ordem de 3,30 g/l em 48 horas, e a queda do pH de 5,08 para 3,28.

Os resultados mostram que nas primeiras seis horas de ensaio o Biopen, nas dosagens estudadas, reduziu a população entre 0,09 e 0,18 ciclos logarítmicos (1,88% a 3,77%). Neste mesmo tempo, as dosagens de Kamoran reduziram a população entre 0,55 e 1,03 ciclos logarítmicos (11,20% a 21,64%). Em PRINCIPAIS bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, suas características e sensibilidade a antibióticos (1991) a dosagem de 1,0 ppm de penicilina com um tempo de contato de 6 horas, reduziu a população de *L. plantarum* em 40,0% (índice não calculado sobre a variação logarítmica da população). Neste trabalho, a mesma dosagem e o mesmo tempo de contato de penicilina reduziram a população de *L. plantarum* em 1,88% em ciclos logarítmicos.

Todas as dosagens, para os dois produtos, provocaram a queda da população nas primeiras vinte e quatro horas de ensaio. Depois disto, a maior dosagem de cada produto continuou diminuindo a população, enquanto que para as outras duas dosagens, para os dois produtos, a população apresentou tendência de crescimento. Provavelmente, este crescimento é resultado da resistência de parte da população às dosagens empregadas. STUPIELLO (1993) afirma que *L. plantarum*, dentre as bactérias testadas, foi a mais resistente frente a todos os antimicrobianos testados.

Ao final do ensaio (48 horas), os produtos Biopen e Kamoran diminuíram a população em níveis semelhantes, de 0,18 a 1,05 ciclos logarítmicos (3,77% a 21,97%) e de 0,26 a 1,23 ciclos logarítmicos (5,46% a 25,05%), respectivamente.

O produto Kamoran nas dosagens estudadas apresentou uma resposta mais rápida na redução da população de *L. plantarum*, ao contrário do ocorrido para a maioria das bactérias estudadas, e mostrou eficiência semelhante à do Biopen em tratamento prolongado.

As duas dosagens inferiores dos dois produtos apenas controlaram o crescimento da população durante as 48 horas de ensaio. Porém a maior dosagem aplicada, de 4,0 ppm para o Biopen e 6,0 ppm para o Kamoran, reduziram a população e sobretudo não permitiram a seleção de uma população resistente, em 48 horas de contato. STUPIELLO (1993) não obteve inibição da população de *L. plantarum* utilizando concentrações bem superiores de penicilina (16 ppm) que as empregadas neste trabalho. Estas diferenças indicam relação com a metodologia empregada em cada trabalho. STUPIELLO (1993) observou diferenças entre os valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos para as duas metodologias testadas, e neste casos, as CIM para meio líquido eram sempre superiores às obtidas para meio sólido. O autor considerou que associação entre o tipo de meio utilizado e o microrganismo testado podem possibilitar uma atuação diversa de um determinado antimicrobiano.

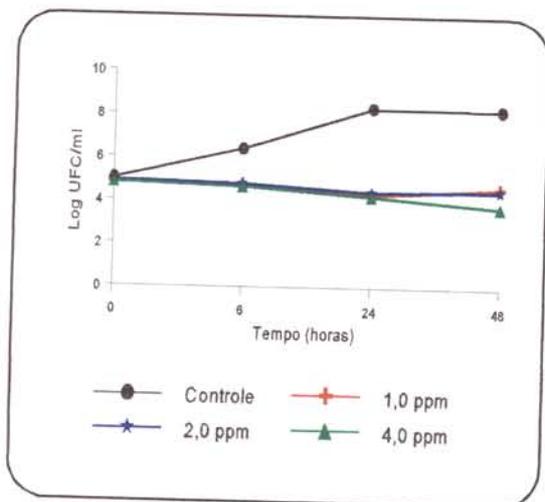


Figura 8 - População (UFC/ml) de *L. plantarum* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Biopen.

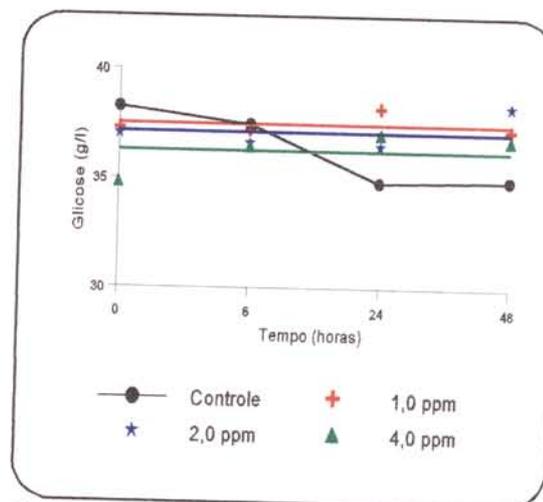


Figura 9 - Concentração de açúcar (g/l) da fermentação com *L. plantarum* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Biopen.

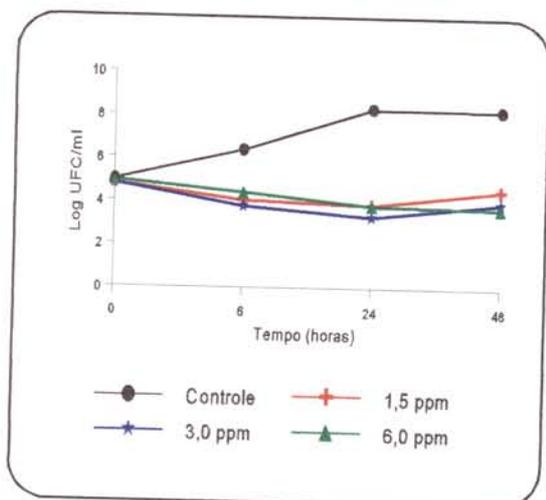


Figura 10 - População (UFC/ml) de *L. plantarum* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Kamoran.

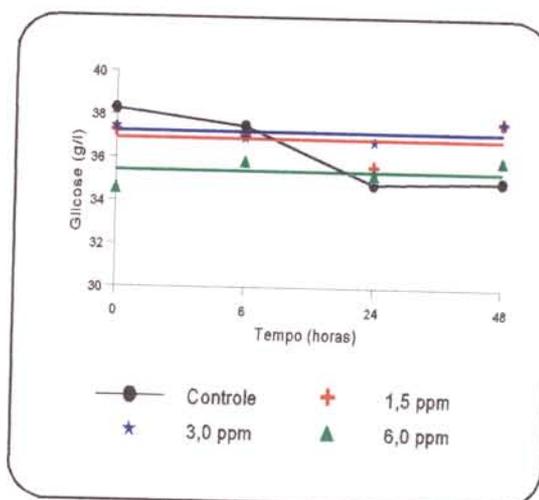


Figura 11 - Concentração de açúcar (g/l) da fermentação com *L. plantarum* em função do tempo (horas) para as diferentes doses de Kamoran.

Tabela 8 - População (UFC/ml), concentração de glicose (g/l) e pH para a fermentação com *L. plantarum* em função da aplicação de Biopen.

Análises	Biopen (ppm)	Tempo (horas)			
		0	6	24	48
População (UFC/ml)	Controle	$9,6 \times 10^4$	$2,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
	1,0	$6,0 \times 10^4$	$4,9 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$
	2,0	$7,0 \times 10^4$	$5,4 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$
	4,0	$6,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$5,4 \times 10^3$
Glicose (g/l)	Controle	38,27	37,49	34,84	34,97
	1,0	37,23	37,17	38,20	37,23
	2,0	36,98	36,59	36,46	38,32
	4,0	34,78	36,46	37,04	36,78
pH	Controle	5,08	5,07	3,48	3,28
	1,0	5,09	5,08	5,07	5,03
	2,0	5,09	5,08	5,08	5,05
	4,0	5,09	5,08	5,08	5,07

Tabela 9 - População (UFC/ml), concentração de glicose (g/l) e pH para a fermentação com *L. plantarum* em função da aplicação de Kamoran.

Análises	Kamoran (ppm)	Tempo (horas)			
		0	6	24	48
População (UFC/ml)	Controle	$9,6 \times 10^4$	$2,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
	1,5	$5,7 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$6,5 \times 10^3$	$3,2 \times 10^4$
	3,0	$5,7 \times 10^4$	$5,4 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	$8,5 \times 10^3$
	6,0	$8,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$6,2 \times 10^3$	$4,8 \times 10^3$
Glicose (g/l)	Controle	38,27	37,49	34,84	34,97
	1,5	37,23	37,04	35,59	37,68
	3,0	37,36	36,91	36,78	37,68
	6,0	34,54	35,81	35,23	35,94
pH	Controle	5,08	5,07	3,48	3,28
	1,5	5,09	5,08	5,03	5,01
	3,0	5,10	5,08	5,07	5,04
	6,0	5,10	5,09	5,08	5,05

4.3 *Lactobacillus buchneri*

Os antibióticos Biopen e Kamoran foram testados em três diferentes dosagens em relação a *L. buchneri*. Amostras para análise de UFC/ml, glicose e pH foram coletadas nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas. As Figuras 12, 13, 14 e 15 e as Tabelas 10 e 11 mostram os resultados obtidos.

Todas as dosagens estudadas para os dois produtos paralisaram o crescimento da população. Isto pode ser confirmado pela ausência de consumo de glicose e pela manutenção do pH. No controle, onde não houve a adição de antibiótico, a população cresceu até as 24 horas de ensaio e, durante este período, o consumo de glicose foi da ordem de 3,81 g/l, e a queda do pH de 5,18 para 3,88.

A queda acentuada da população após 24 horas não foi observada nos ensaios com as demais bactérias. Assim, o tratamento controle com *L. buchneri* foi repetido e os mesmos resultados foram obtidos, confirmando seu comportamento diferenciado. Esta diminuição da população sugere que *L. buchneri* é um microrganismo mais sensível à ação inibitória dos metabólitos produzidos durante a fermentação, já que o nível de glicose no meio permaneceu alto e poderia sustentar a continuidade do crescimento da população.

Os resultados mostram que nas primeiras seis horas de ensaio o produto Biopen, nas dosagens estudadas, reduziu a população entre 1,52 e 1,75 ciclos logarítmicos (31,80% a 36,01%). Neste mesmo tempo, somente a maior dosagem do produto Kamoran (6,0 ppm) reduziu a população num nível semelhante, igual a 1,39 ciclos logarítmicos (26,99%).

O Biopen, nas três dosagens, diminuiu a população em um nível maior que 3,78 ciclos logarítmicos (maior que 79,08%), pelo menos, já com 24 horas de ensaio. Somente ao final do ensaio (48 horas) o Kamoran na maior dosagem (6,0 ppm) provocou uma redução semelhante, da ordem de 3,67 ciclos logarítmicos (71,26%).

Os resultados mostram que o Biopen foi mais eficiente no controle de *L. buchneri*, pois atuou mais rapidamente e requereu concentrações menores para provocar índices maiores de redução da população.

A menor dosagem de Biopen (1,0 ppm) foi tão eficiente quanto as dosagens superiores na redução da população. Todas as dosagens de Kamoran reduziram a população, porém a maior dosagem (6,0 ppm) foi mais eficiente. Estes dados coincidem com aqueles obtidos por STUPIELLO (1993) que determinou em 0,5 ppm a concentração inibitória mínima para penicilina contra *L. buchneri*.

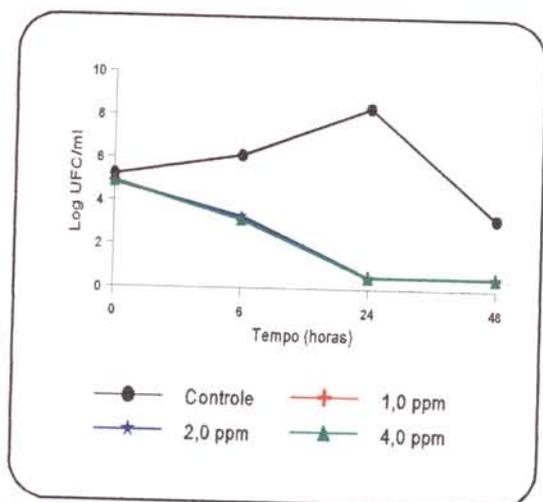


Figura 12 - População (UFC/ml) de *L. buchneri* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Biopen.

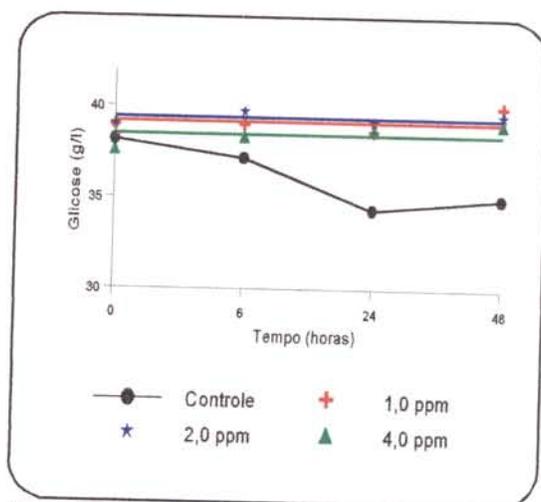


Figura 13 - Concentração de açúcar (g/l) da fermentação com *L. buchneri* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Biopen.

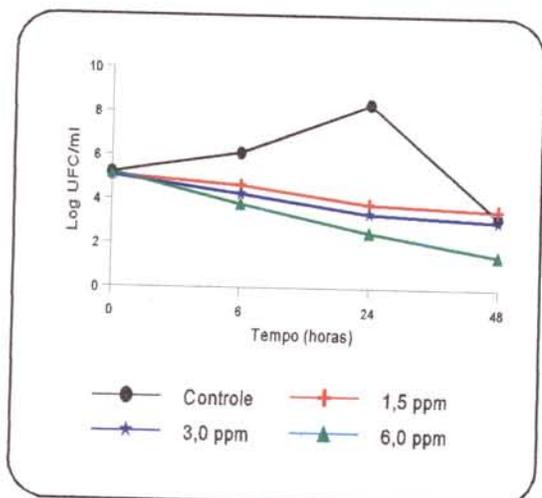


Figura 14 - População (log UFC/ml) de *L. buchneri* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Kamoran.

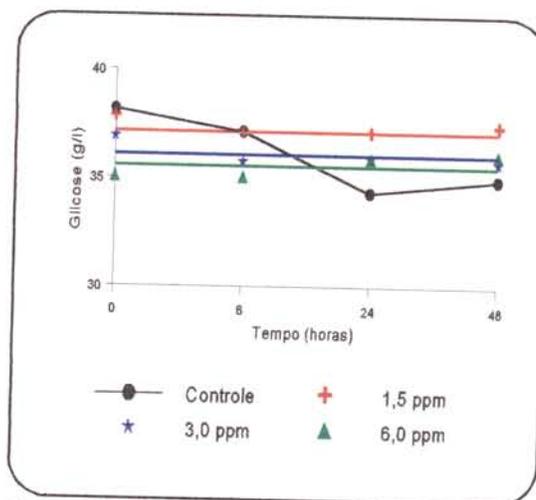


Figura 15 - Concentração de açúcar (g/l) da fermentação com *L. buchneri* em função do tempo para as diferentes dosagens de Kamoran.

Tabela 10 - População (UFC/ml), concentração de glicose (g/l) e pH para a fermentação com *L. buchneri* em função da aplicação de Biopen.

Análises	Biopen (ppm)	Tempo (horas)			
		0	6	24	48
População (UFC/ml)	Controle	$1,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^8$	$1,8 \times 10^3$
	1,0	$7,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	2,0	$6,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
	4,0	$6,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$
Glicose (g/l)	Controle	38,15	37,15	34,34	34,96
	1,0	38,87	38,94	38,61	39,99
	2,0	38,94	39,66	39,14	39,53
	4,0	37,55	38,28	38,67	39,07
pH	Controle	5,18	5,17	3,94	3,88
	1,0	5,19	5,18	5,13	5,14
	2,0	5,19	5,18	5,15	5,15
	4,0	5,20	5,18	5,16	5,16

Tabela 11 - População (UFC/ml), concentração de glicose (g/l) e pH para a fermentação com *L. buchneri* em função da aplicação de Kamoran.

Análises	Kamoran (ppm)	Tempo (horas)			
		0	6	24	48
População (UFC/ml)	Controle	$1,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$	$2,3 \times 10^8$	$1,8 \times 10^3$
	1,5	$1,1 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	$5,9 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$
	3,0	$1,0 \times 10^5$	$1,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$
	6,0	$1,4 \times 10^5$	$5,8 \times 10^3$	$3,8 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$
Glicose (g/l)	Controle	38,15	37,15	34,34	34,96
	1,5	37,81	37,09	36,09	37,40
	3,0	36,84	35,71	35,90	35,71
	6,0	35,02	35,02	35,90	36,09
pH	Controle	5,18	5,17	3,94	3,88
	1,5	5,22	5,20	5,17	5,13
	3,0	5,23	5,20	5,17	5,14
	6,0	5,24	5,20	5,18	5,15

4.4. *Bacillus coagulans*

Os antibióticos Biopen e Kamoran foram testados em três diferentes dosagens em relação a *B. coagulans*. Amostras para análise de UFC/ml, glicose e pH foram coletadas nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas. As Figuras 16, 17, 18 e 19 e as Tabelas 12 e 13 mostram os resultados obtidos.

Todas as dosagens estudadas para os dois produtos paralisaram o crescimento da população. Isto pode ser confirmado pela ausência de consumo de glicose e também pela manutenção do pH. No controle, onde não houve a adição de antibiótico, o consumo de glicose foi da ordem de 5,76 g/l em 48 horas, e variação do pH de 4,98 para 5,78.

A elevação do pH durante o período de crescimento da população de *B. coagulans* mostra um comportamento comum a vários *Bacillus*, e tem sido atribuído à hidrólise de componentes do meio com liberação de grupos OH⁻.*

Os resultados mostram que nas primeiras seis horas de ensaio o produto Biopen, nas dosagens estudadas, reduziu a população entre 1,42 e 1,60 ciclos logarítmicos (30,34% a 34,19%). Neste mesmo tempo, as dosagens do produto Kamoran reduziram a população entre 0,46 e 0,72 ciclos logarítmicos (10,07% a 16,04%). Dados contrastantes com os obtidos neste trabalho foram determinados em PRINCIPAIS bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, suas características e sensibilidade a antibióticos (1991), onde a dosagem de 1,0 ppm de penicilina com um tempo de contato de 6 horas, não reduziu significativamente a população de *B. coagulans*. ALCARDE (1995), para o mesmo tempo de contato, não obteve a redução de *B. coagulans* para 1,0 ppm e 2,0 ppm de penicilina. O mesmo autor obteve índices de redução de 1,36% e 2,70% (em ciclos logarítmicos) para 1,0 ppm e 3,0 ppm de Kamoran HJ, respectivamente. Tanto para a penicilina

* Comunicação pessoal da Prof. Dra. Dejanira F. de Angelis, Depart. de Microbiologia, UNESP/Rio Claro.

como para o Kamoran, a redução de *B. coagulans* obtida neste trabalho é superior àquela apresentada nos estudos citados.

Todas as dosagens do Biopen, especialmente a maior delas (4,0 ppm), provocaram a diminuição da população nas primeiras vinte e quatro horas de ensaio e, depois disto, a população apresentou tendência de crescimento. Provavelmente, este crescimento é resultado da resistência de parte da população às dosagens empregadas.

Ao final do ensaio (48 horas), o Biopen diminuiu a população entre 0,90 e 1,69 ciclos logarítmicos (19,11% a 36,11%), enquanto que o Kamoran reduziu a população entre 1,92 e 2,07 ciclos logarítmicos (42,76% a 45,39%).

Os resultados mostram que o Biopen apresentou uma resposta mais rápida na redução da população de *B. coagulans*. Porém, o Kamoran foi mais eficiente em tratamento prolongado exigindo concentrações menores e, sobretudo não atuou na seleção de uma população resistente, nas dosagens estudadas com tempo de contato de 48 horas.

As três dosagens de Biopen apenas controlaram o crescimento da população durante as 48 horas de ensaio, sendo que a maior dosagem aplicada (4,0 ppm), foi mais eficiente. A menor dosagem de Kamoran (1,5 ppm) reduziu a população de maneira tão eficiente quanto as dosagens superiores. Já STUPIELLO (1993) não obteve inibição de *B. coagulans* com até 16,0 ppm de penicilina.

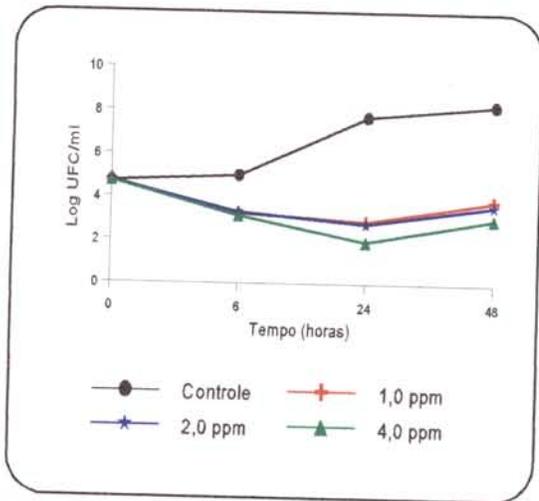


Figura 16 - População (UFC/ml) de *B. coagulans* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Biopen.

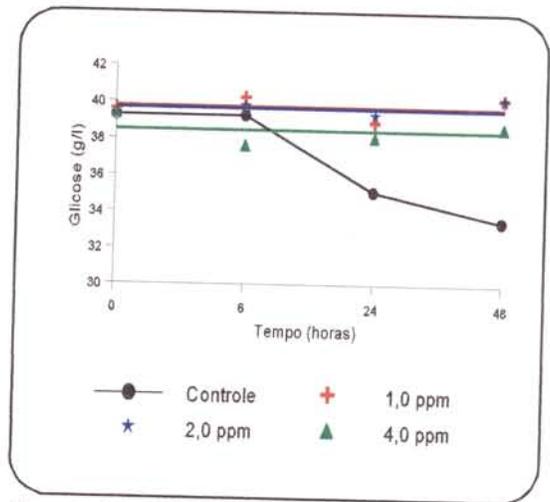


Figura 17 - Concentração de açúcar (g/l) da fermentação com *B. coagulans* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Biopen.

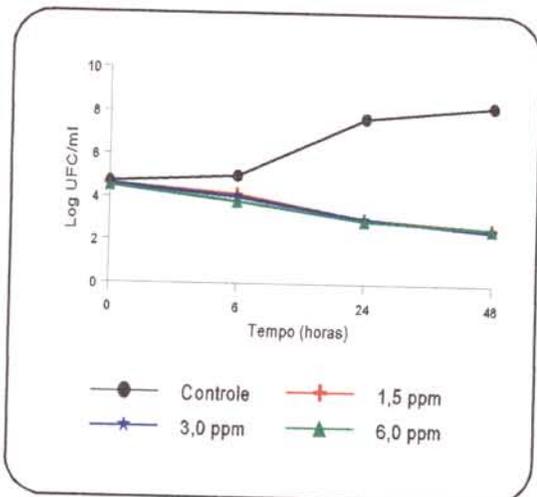


Figura 18 - População (UFC/ml) de *B. coagulans* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Kamoran.

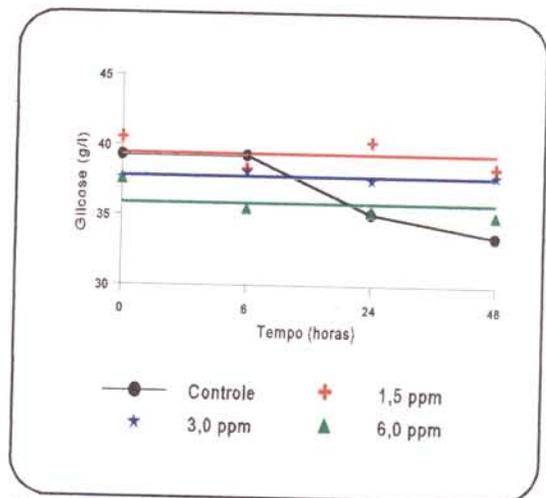


Figura 19 - Concentração de açúcar (g/l) da fermentação com *B. coagulans* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Kamoran.

Tabela 12 - População (UFC/ml), concentração de glicose (g/l) e pH para a fermentação com *B. coagulans* em função da aplicação de Biopen.

Análises	Biopen (ppm)	Tempo (horas)			
		0	6	24	48
População (UFC/ml)	Controle	$5,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$5,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$
	1,0	$5,1 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3$	$6,8 \times 10^2$	$6,5 \times 10^3$
	2,0	$4,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^3$	$5,4 \times 10^2$	$3,9 \times 10^3$
	4,0	$4,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$	$8,0 \times 10^1$	$9,8 \times 10^2$
Glicose (g/l)	Controle	39,28	39,28	35,11	33,52
	1,0	39,54	40,21	38,88	40,21
	2,0	39,21	39,74	39,28	40,21
	4,0	39,34	37,61	38,08	38,68
pH	Controle	4,98	5,00	5,74	5,78
	1,0	4,99	4,98	5,00	4,98
	2,0	4,99	4,98	4,99	4,98
	4,0	5,00	4,99	5,00	4,98

Tabela 13 - População (UFC/ml), concentração de glicose (g/l) e pH para a fermentação com *B. coagulans* em função da aplicação de Kamoran.

Análises	Kamoran (ppm)	Tempo (horas)			
		0	6	24	48
População (UFC/ml)	Controle	$5,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$	$5,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$
	1,5	$3,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$9,3 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$
	3,0	$3,7 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$3,1 \times 10^2$
	6,0	$3,1 \times 10^4$	$6,0 \times 10^3$	$8,2 \times 10^2$	$3,8 \times 10^2$
Glicose (g/l)	Controle	39,28	39,28	35,11	33,52
	1,5	40,46	38,25	40,20	38,41
	3,0	37,56	38,02	37,49	37,82
	6,0	37,52	35,44	35,26	35,02
pH	Controle	4,98	5,00	5,74	5,78
	1,5	4,98	4,94	4,94	4,94
	3,0	4,99	4,96	4,95	4,95
	6,0	5,00	4,96	4,95	4,95

4.5. *Bacillus megaterium*

Os antibióticos Biopen e Kamoran foram testados em três diferentes dosagens em relação a *B. megaterium*. Amostras para análise de UFC/ml, glicose e pH foram coletadas nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas. As Figuras 20, 21, 22 e 23 e as Tabelas 14 e 15 mostram os resultados obtidos.

Todas as dosagens estudadas para os dois produtos paralisaram o crescimento da população. Isto pode ser confirmado pela ausência de consumo de glicose e também pela manutenção do pH. No controle, onde não houve a adição de produto, o consumo de glicose foi da ordem de 5,14 g/l em 48 horas, e a queda de pH de 5,12 para 3,98.

Os resultados mostram que nas primeiras seis horas de ensaio o produto Biopen, nas dosagens estudadas, reduziu a população entre 1,14 e 1,38 ciclos logarítmicos (24,41% a 29,24%). Neste mesmo tempo, as dosagens do produto Kamoran reduziram a população entre 0,87 e 0,95 ciclos logarítmicos (18,28% a 19,87%). Em PRINCIPAIS bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, suas características e sensibilidade a antibióticos (1991) a dosagem de 1,0 ppm de penicilina com um tempo de contato de 6 horas, reduziu a população de *B. megaterium* em 44,0% (índice não calculado sobre a variação logarítmica da população). Neste trabalho, as dosagens de 1,0 ppm e 2,0 ppm com um tempo de contato de 6 horas reduziram a população de *B. megaterium* em 24,41% e 26,28% em ciclos logarítmicos. ALCARDE (1995) não obteve a redução da população de *B. megaterium* para 1,0 ppm e 2,0 ppm de penicilina. O mesmo autor não obteve redução de *B. megaterium* para 1,0 ppm de Kamoran HJ e a redução para 3,0 ppm foi de 2,96% em ciclos logarítmicos. Os dados apresentados pelo último autor não coincidem com aqueles apresentados neste trabalho, onde a penicilina mostrou-se capaz de reduzir a população de *B. megaterium*.

As dosagens do Biopen provocaram quedas maiores da população nas primeiras vinte e quatro horas de ensaio mas, depois disto, a população apresentou

tendência de crescimento. Provavelmente, este crescimento é resultado da resistência de parte da população às dosagens empregadas.

Ao final do ensaio (48 horas), os produtos Biopen e Kamoran diminuíram a população em níveis semelhantes, de 1,25 a 1,61 (26,77% a 34,11%) e de 1,46 a 1,61 ciclos logarítmicos (30,54% a 33,82%), respectivamente.

Os resultados mostram que o Biopen apresentou uma resposta mais rápida na redução da população de *B. megaterium*. Porém, o Kamoran foi igualmente eficiente em tratamento prolongado sem provocar a seleção de uma população resistente, nas dosagens estudadas com tempo de contato de 48 horas.

Tanto para o Biopen como para o Kamoran as menores dosagens estudadas (1 e 1,5 ppm) foram tão eficientes na redução da população em 48 horas quanto as dosagens maiores. Já RODINI (1989) observou crescimento de *B. megaterium* até a dosagem de 400 ppm de penicilina. Esta diferença entre as concentrações de penicilina capazes de controlar a população de *B. megaterium* sugere relação com a metodologia utilizada. RODINI (1989) testou a inibição dos microrganismos inoculados em placas contendo meio nutriente agar com diferentes concentrações de produto. Porém, na prática industrial tem-se conseguido controlar as populações de contaminantes da fermentação alcoólica com aplicações de penicilina, para tratamentos de choque, na faixa de concentrações testada neste trabalho. STUPIELLO (1993) apresenta dados que corroboram os resultados deste trabalho. O último autor obteve inibição da população de *B. megaterium* com 0,5 ppm de penicilina.

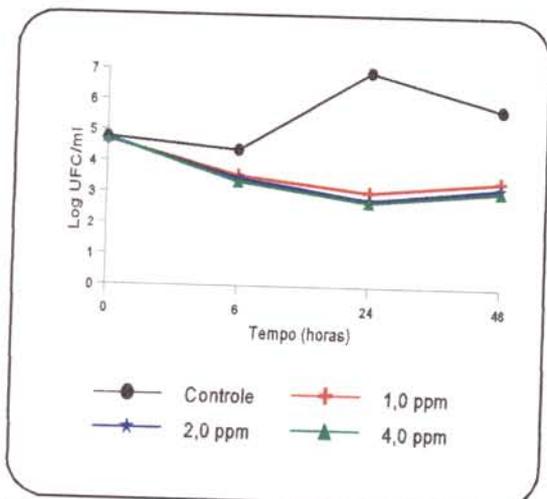


Figura 20 - População (UFC/ml) de *B. megaterium* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Biopen.

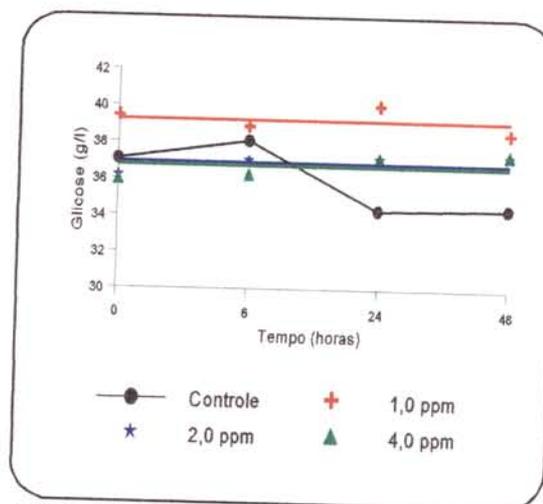


Figura 21 - Concentração de açúcar (g/l) da fermentação com *B. megaterium* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Biopen.

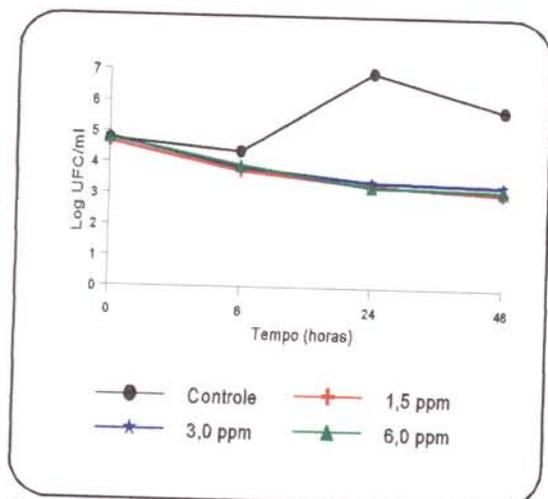


Figura 22 - População (UFC/ml) de *B. megaterium* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Kamoran.

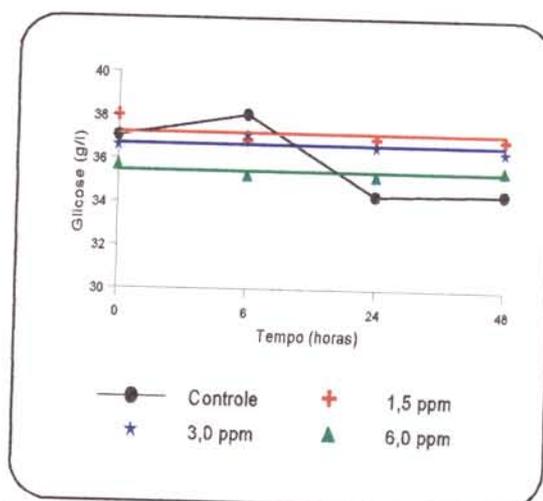


Figura 23 - Concentração de açúcar (g/l) da fermentação com *B. megaterium* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Kamoran.

Tabela 14 - População (UFC/ml), concentração de glicose (g/l) e pH para a fermentação com *B. megaterium* em função da aplicação de Biopen.

Análises	Biopen (ppm)	Tempo (horas)			
		0	6	24	48
População (UFC/ml)	Controle	$5,7 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$9,0 \times 10^6$	$5,7 \times 10^5$
	1,0	$4,7 \times 10^4$	$3,4 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$
	2,0	$4,8 \times 10^4$	$2,8 \times 10^3$	$6,0 \times 10^2$	$1,6 \times 10^3$
	4,0	$5,2 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$	$5,3 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$
Glicose (g/l)	Controle	37,07	38,08	34,34	31,93
	1,0	39,36	38,82	40,02	38,55
	2,0	36,08	36,98	37,11	37,30
	4,0	35,92	36,21	37,18	37,43
pH	Controle	5,12	5,13	4,18	3,98
	1,0	5,13	5,11	5,13	5,13
	2,0	5,13	5,11	5,12	5,12
	4,0	5,14	5,12	5,12	5,12

Tabela 15 - População (UFC/ml), concentração de glicose (g/l) e pH para a fermentação com *B. megaterium* em função da aplicação de Kamoran.

Análises	Kamoran (ppm)	Tempo (horas)			
		0	6	24	48
População (UFC/ml)	Controle	$5,7 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$	$9,0 \times 10^6$	$5,7 \times 10^5$
	1,5	$4,4 \times 10^4$	$5,4 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
	3,0	$6,0 \times 10^4$	$6,8 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$
	6,0	$5,7 \times 10^4$	$7,8 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$
Glicose (g/l)	Controle	37,07	38,08	34,34	31,93
	1,5	37,95	36,86	36,95	36,95
	3,0	36,56	37,08	36,56	36,37
	6,0	35,67	35,22	35,22	35,54
pH	Controle	5,12	5,13	4,18	3,98
	1,5	5,13	5,12	5,12	5,12
	3,0	5,14	5,12	5,13	5,12
	6,0	5,15	5,12	5,13	5,12

4.6. *Bacillus subtilis*

Os antibióticos Biopen e Kamoran foram testados em três diferentes dosagens em relação a *B. subtilis*. Amostras para análise de UFC/ml, glicose e pH foram coletadas nos tempos 0, 6, 24 e 48 horas. As Figuras 24, 25, 26 e 27 e as Tabelas 16 e 17 mostram os resultados obtidos.

Todas as dosagens estudadas para os dois produtos paralisaram o crescimento da população. Isto pode ser confirmado pela ausência de consumo de glicose e pela manutenção do pH. No controle, onde não houve a adição de produto, o consumo de glicose foi da ordem de 14,37 g/l em 48 horas, e a variação do pH de 5,25 para 5,94, tal como ocorrido e comentado para *B. coagulans*.

Os resultados mostram que nas primeiras seis horas de ensaio o produto Biopen, nas dosagens estudadas, reduziu a população entre 0,57 e 0,73 ciclos logarítmicos (12,47% a 15,35%). Neste mesmo tempo, as dosagens do produto Kamoran reduziram a população entre 0,17 e 0,23 ciclos logarítmicos (3,66% a 5,00%). Em PRINCIPAIS bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, suas características e sensibilidade a antibióticos (1991) a dosagem de 1,0 ppm de penicilina com um tempo de contato de 6 horas não reduziu a população de *B. subtilis*. Já ALCARDE (1995) obteve a redução da população de *B. subtilis* em 4,23% e 19,51% em ciclos logarítmicos para 1,0 ppm e 2,0 ppm de penicilina, respectivamente, com um tempo de contato de 6 horas. O mesmo autor obteve uma redução de 7,28% e 17,22% em ciclos logarítmicos para 1,0 ppm e 3,0 ppm de Kamoran HJ. Estes últimos dados mostram uma ação semelhante para penicilina e Kamoran com 6 horas de contato.

Todas as dosagens de Biopen, especialmente a maior dosagem (4,0 ppm), provocaram a diminuição da população nas primeiras vinte e quatro horas de ensaio e, depois disto, a população apresentou tendência de crescimento. Provavelmente, este crescimento é resultado da resistência de uma parcela da população às dosagens empregadas.

RESUMO E DISCUSSÃO

Ao final do ensaio (48 horas), apenas as duas maiores dosagens de Biopen provocaram uma diminuição da população que foi da ordem de 0,23 e 0,67 ciclos logarítmicos (4,90% e 14,66%). As três dosagens do Kamoran reduziram a população em níveis bem superiores, entre 2,67 e 2,76 ciclos logarítmicos (57,36% a 59,48%).

Os resultados mostram que o Biopen apresentou uma resposta mais rápida na redução da população de *B. subtilis*. Porém, o Kamoran foi mais eficiente em tratamento prolongado exigindo concentrações menores e, sobretudo não atuou na seleção de uma flora resistente, nas dosagens estudadas com tempo de contato de 48 horas.

As duas dosagens inferiores do Biopen apenas controlaram o crescimento da população durante as 48 horas de ensaio. Porém, a maior dosagem (4,0 ppm) reduziu a população apesar de ter permitido seu crescimento a partir das 24 horas. A menor dosagem do Kamoran (1,5 ppm) reduziu a população de maneira tão eficiente quanto as dosagens superiores. RODINI (1989) obteve o crescimento de *B. subtilis* até a dosagem de 400 ppm de penicilina. Esta diferença entre as concentrações de penicilina capazes de controlar a população de *B. subtilis* sugere relação com a metodologia utilizada. RODINI (1989) testou a inibição dos microrganismos inoculados em placas contendo meio nutriente agar com diferentes concentrações de produto. Porém, na prática industrial tem-se conseguido controlar as populações de contaminantes da fermentação alcoólica com aplicações de penicilina, para tratamentos de choque, na faixa de concentrações testada neste trabalho. Já STUPIELLO (1993) apresenta dados que coincidem com os obtidos neste trabalho, pois inibiu *B. subtilis* com 2,0 ppm de penicilina.

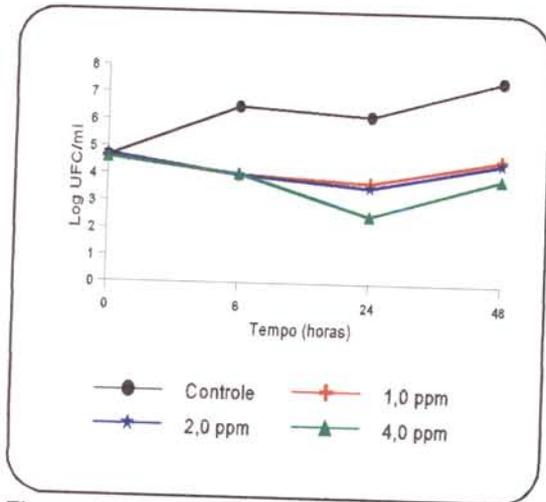


Figura 24 - População (UFC/ml) de *B. subtilis* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Biopen.

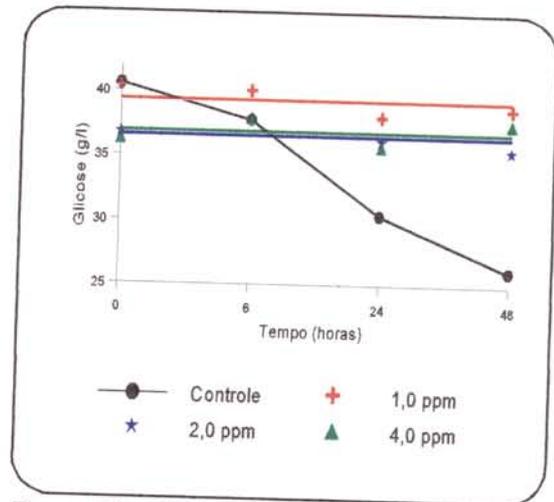


Figura 25 - Concentração de açúcar (g/l) da fermentação com *B. subtilis* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Biopen.

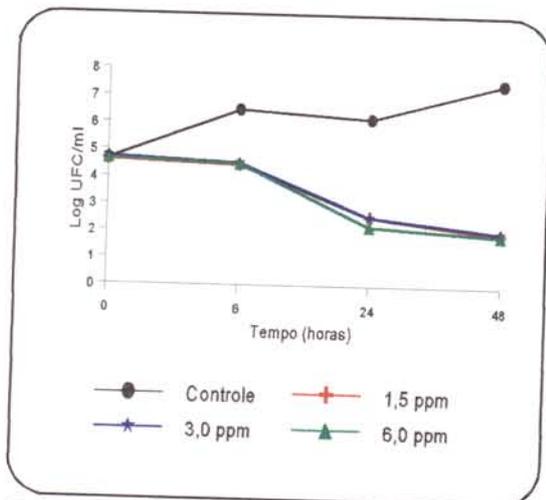


Figura 26 - População (UFC/ml) de *B. subtilis* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Kamoran.

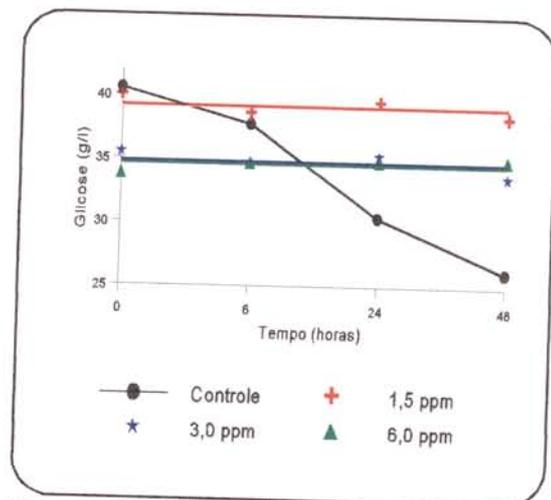


Figura 27 - Concentração de açúcar (g/l) da fermentação com *B. subtilis* em função do tempo (horas) para as diferentes dosagens de Kamoran.

Tabela 16 - População (UFC/ml), concentração de glicose (g/l) e pH para a fermentação com *B. subtilis* em função da aplicação de Biopen.

Análises	Biopen (ppm)	Tempo (horas)			
		0	6	24	48
População (UFC/ml)	Controle	$4,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$3,5 \times 10^7$
	1,0	$3,8 \times 10^4$	$9,1 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$	$4,0 \times 10^4$
	2,0	$5,0 \times 10^4$	$9,2 \times 10^3$	$3,4 \times 10^3$	$2,9 \times 10^4$
	4,0	$3,8 \times 10^4$	$9,8 \times 10^3$	$3,0 \times 10^2$	$8,0 \times 10^3$
Glicose (g/l)	Controle	40,53	37,76	30,43	26,16
	1,0	40,33	39,94	38,00	38,70
	2,0	40,94	40,69	40,19	38,36
	4,0	40,35	38,85	36,84	36,60
pH	Controle	5,25	5,26	5,79	5,94
	1,0	5,28	5,21	5,19	5,20
	2,0	5,28	5,23	5,19	5,20
	4,0	5,28	5,22	5,19	5,20

Tabela 17 - População (UFC/ml), concentração de glicose (g/l) e pH para a fermentação com *B. subtilis* em função da aplicação de Kamoran.

Análises	Kamoran (ppm)	Tempo (horas)			
		0	6	24	48
População (UFC/ml)	Controle	$4,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$3,5 \times 10^7$
	1,5	$4,0 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$	$3,5 \times 10^2$	$8,5 \times 10^1$
	3,0	$4,9 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$3,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
	6,0	$4,4 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^2$	$7,5 \times 10^1$
Glicose (g/l)	Controle	40,53	37,76	30,43	26,16
	1,5	39,93	38,58	39,51	38,37
	3,0	35,39	34,57	35,27	33,63
	6,0	37,34	34,70	33,66	34,54
pH	Controle	5,25	5,26	5,79	5,94
	1,5	5,28	5,21	5,20	5,20
	3,0	5,27	5,21	5,21	5,21
	6,0	5,28	5,22	5,22	5,22

4.7. Índice de Crescimento x Consumo de Glicose

Para os dois antibióticos testados, frente a cada uma das seis bactérias, foram utilizadas: a concentração recomendada pelo fabricante, o dobro e a metade da mesma. Apesar disto, nem mesmo nas doses reduzidas, foi verificado o crescimento da população. Este só foi observado para o tratamento controle. A Tabela 18 mostra os índices de crescimento e o consumo de glicose para todos os ensaios realizados.

O índice de crescimento foi obtido pela diferença entre os valores logarítmicos das contagens da população em 0 e 48 horas. O consumo de glicose refere-se à diferença entre as concentrações de glicose em 0 e 48 horas.

A relação consumo de glicose/crescimento celular só pôde ser determinada para o tratamento controle de cada bactéria, uma vez que não foi detectado consumo deste açúcar nos tratamentos em presença de antibiótico. Essa relação apresentou diferenças consideráveis entre as bactérias. As bactérias do grupo *Bacillus* consomem maior quantidade de glicose para cada ciclo logarítmico de crescimento quando comparadas aos *Lactobacillus*. O consumo de glicose foi de 1,61 a 4,97 e 1,01 a 1,56g/ciclo logarítmico para *Bacillus* e *Lactobacillus*, respectivamente.

Tabela 18 - Índice de crescimento da população (log UFC/ml) e consumo de glicose (g/l) das bactérias testadas em função da aplicação de Biopen e Kamoran em 48 horas.

		Controle	Biopen (ppm)			Kamoran (ppm)		
			1,0	2,0	4,0	1,5	3,0	6,0
<i>L. fermentum</i>	IC	2,52	<-4,28	<-4,30	<-4,34	-1,61	<-4,36	-3,80
	CA	3,92	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	IC	3,28	-0,18	-0,36	-1,05	-0,26	-0,83	-1,23
	CA	3,30	-	-	-	-	-	-
<i>L. buchneri</i>	IC	3,16*	<-3,86*	<-3,78*	<-3,83*	-1,50	-1,96	-3,67
	CA	3,81*	-	-	-	-	-	-
<i>B. coagulans</i>	IC	3,58	-0,90	-1,09	-1,69	-2,00	-2,07	-1,92
	CA	5,76	-	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i>	IC	2,20	-1,25	-1,48	-1,61	-1,56	-1,46	-1,61
	CA	5,14	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	IC	2,89	0,03	-0,23	-0,67	-2,67	-2,69	-2,76
	CA	14,37	-	-	-	-	-	-

IC: índice de crescimento da população.

CA: consumo de glicose.

*: índices em 24 horas.

5. CONCLUSÕES

- ✓ Para todas as dosagens estudadas dos dois produtos, mesmo com a metade da recomendada pelo fabricante, houve diminuição de todas as populações nas primeiras seis horas de ensaio. Para Biopen, produto a base de penicilina, quatro das seis bactérias estudadas apresentaram, pelo menos nas menores dosagens, sinais de crescimento no final de quarenta e oito horas. Este fato pode estar associado a resistência de parte da população pelo produto, uma vez, que vem se fazendo uso deste tipo de antibiótico na indústria da produção de álcool desde os anos 50. Para o Kamoran, cujo princípio ativo tem uso recente na indústria, apenas *L. plantarum* apresentou sinais dessa resistência.
- ✓ *L. plantarum* mostrou-se a bactéria mais resistente aos antibióticos testados uma vez que, somente para as dosagens máximas e o maior tempo de contato (48 horas) a redução foi superior a um ciclo logarítmico.
- ✓ A bactéria mais sensível aos dois produtos testados foi *L. Fermentum*, já que a apenas a menor dosagem de Biopen (1,5 ppm) reduziu a população abaixo de dois ciclos logarítmicos.
- ✓ De uma maneira geral, o produto Biopen reduziu a população das bactérias estudadas em um menor período de tempo. Por outro lado, o produto Kamoran foi mais eficiente ao final de quarenta e oito horas.
- ✓ Mesmo trabalhando com a metade das dosagens indicadas pelos fabricantes, não houve aumento significativo das populações de bactéria ao final de 48 horas de contato. Em função disto, para os tratamentos com antibiótico, não foi possível estabelecer uma relação entre consumo de glicose e crescimento da população, já que as dosagens utilizadas mostraram-se letais.
- ✓ Embora as populações não tenham apresentado sinais de crescimento em

nenhuma das dosagens testadas, os tratamentos onde não foram adicionados antibióticos mostraram que o consumo de glicose por ciclo logarítmico de crescimento muda entre as espécies estudadas. O grupo dos *Bacillus* apresentou maior consumo quando comparado aos *Lactobacillus*, sendo que os índices obtidos foram de 1,61 a 4,97 e de 1,01 a 1,56 g/ciclo, respectivamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ALCARDE, V. E. **Avaliação de Antimicrobianos na Germinação de Esporos e Células Vegetativas de Bactérias Isoladas de Processos de Fermentação Alcoólica.** Piracicaba, 1995. Tese (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.
- 2 - ALMEIDA, J. R. **Álcool e destilaria.** Piracicaba: Nathanael dos Santos: Mimeogr., 1940. vol. 5, p. 55-85.
- 3 - ALTERTHUM, F.; CRUZ, M. R. M.; VAIRO, M. L. R.; GAMBASSI, D. M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 3, n. 1, p. 42-49, 1984.
- 4 - AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; CAMPOS, H. Infecção, problema sério na produção de álcool. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 2., 1981. **Anais**, p. 158-168.
- 5 - AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool e Açúcar**, v. 2, n. 5, p. 12-14, 1982.
- 6 - ANDRIETTA, M. G. S.; RODRIGUES, M. I. **Controle da Fermentação Alcoólica Através de Testes Microbiológicos e Bioquímicos:** Apostila do Curso de Extensão. 2. ed. Campinas, 1996. Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- 7 - ANTIBIÓTICO HJ - Elanco: Resumo dos testes com bactericida "in vitro" executado pela Fermentec. 1994. s.n.t.
- 8 - AQUARONE, E. Ação da tetraciclina em fermentação alcoólica de mosto de melaço. **Boletim do Departamento de Química da Escola Politécnica de São Paulo**, v. 11, p. 49, 1950.

-
- 9 - AQUARONE, E. Influência do cloranfenicol na fermentação alcoólica de melaço de cana diluído. **Anuário Farm. Quím. São Paulo**, v. 10, n. 3/4, p. 39, 1959.
- 10 - AQUARONE, E.; BRAZZACH, M. L. O cloranfenicol como desinfetante em fermentação alcoólica de melaço de cana. **Anuário Farm. Quím. São Paulo**, v. 11, n. 3/4, p. 49-60, 1960.
- 11 - AQUARONE, E.; BRAZZACH, M. L. Estudos comparativos de antissépticos usados na fermentação alcoólica de mosto de melaço. **Boletim do Departamento de Química da Escola Politécnica de São Paulo**, v. 16, p. 1-25, 1963.
- 12 - AQUARONE, E.; BARUFFALDI, R.; PASSOS, J. B. P. Dados sobre o emprego de penicilina na produção de álcool em escala industrial no nordeste. **Revista da Faculdade de Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 4, n. 1, p. 103-118, 1966.
- 13 - AQUARONE, E. **Contribuição ao Estudo do Emprego de Associações de Antibióticos como Desinfetantes em Fermentações Alcoólicas**. São Paulo, 1968. Tese (Cátedra) - Faculdade de Farmácia e Bioquímica, USP.
- 14 - BERGEY'S manual of determinative bacteriology. 8. ed. Baltimore: Waverly Press, INC., 1974. cap. 15-16, p. 529-598.
- 15 - BERTELLI, L. G. Dezesesseis anos de Proálcool. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 11, n. 1, p. 19-20, 1992.
- 16 - BEVAN, D.; BOND, J. Micro-organisms in field and mill - A preliminary survey. IN: CONFERENCE OF QUEENSLAND SOC. SUGAR CANE TECHNOL., 38. **Proceedings**, 1971. p. 137-143.
- 17 - BOURDAREL, M. J. & RAMIREZ, A. Action comparee de deux agents bactericides chimiques sur la fermentation alcoolique du jus de betterave et de la melasse. **Industries Alimentaires et Agricoles**, ap. , n. 4, p. 219-224, 1986.

- 18 - BORZANI, W. L. O emprego da penicilina como desinfetante em fermentação alcoólica de mosto de milho. **Boletim do Departamento de Química da Escola Politécnica de São Paulo**, v. 7, p. 9-11, 1957.
- 19 - BORZANI, W.; AQUARONE, E. Continuous fermentation - Penicillin as contamination control agent. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 5, n. 8, p. 612-616, 1957.
- 20 - BRAUNBECK, M. D. W. **Efeito de Biocidas sobre o Comportamento de Leveduras e o Rendimento da Fermentação**. Piracicaba, 1988. Tese (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.
- 21 - BROMBERG, R. **Estudo do Mecanismo de Floculação de Leveduras Causado por *Lactobacillus fermentum***. Campinas, 1994. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- 22 - BRUJIN, J. Deterioration of sugar cane after harvesting part II. Changes in juice composition. **International Sugar Journal**, v. 68, p. 331-334, 1966.
- 23 - CEREDA, M. P.; SERRA, G. E.; CAGLIARI, A. M.; MENEGUIM, M. A. Métodos microbianos de avaliação de antissépticos empregados em indústrias alcooleiras. **Brasil Açucareiro**, v. 97, n. 3, p. 44-51, 1981.
- 24 - CHIN, P. M.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactic acid bacteria on wheat mash fermentations prepared with laboratory backset. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 4, p. 311-317, 1994.
- 25 - CLARKE, M. A.; ROBERTS, E. J.; GODSHALL, M. A.; BRANNAN, M. A.; CARPENTER, F. G.; COLL, E. E. Sucrose loss in manufacture of cane sugar. **Sugar y Azucar**, v. 75, n. 9, p. 64-68, 1980.
- 26 - CRUZ, M. R. L.; VAIRO, M. L.; GAMBASSI, D. M. Influência da penicilina V-ácida no controle das infecções bacterianas na fermentação alcoólica.

Revista de Microbiologia da Sociedade Brasileira de Microbiologia, v. 16, n. 2, p. 138-142, 1985.

- 27 - DAY, W. H.; SERJAK, W. C.; STRATTON, J. R.; STONE, L. Antibiotics as contamination-control agents in grain alcohol fermentation. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, n. 5, p. 252-258, 1954.
- 28 - DIFCO Laboratories. **Product Catalog for Microbiology**. Detroit: Difco, 1996/97.
- 29 - DUNCAN, C. L.; COLMER, A. R. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. **Applied Microbiology**, v. 12, n. 2, p. 173-177, 1964.
- 30 - EGAN, B. T. The infection process in sour storage rot. In: CONFERENCE OF QUEENSLAND SOCIETY OF SUGAR TECHNOLOGISTS, 32. **Proceedings**, 1965. p. 21-24.
- 31 - EGAN, B. T. Some effects of sour storage rot on cane juice quality. In: CONFERENCE OF QUEENSLAND SOCIETY OF SUGAR TECHNOLOGISTS, 33. **Proceedings**, 1966. p. 11-20.
- 32 - EGAN, B. T. Post-harvest deterioration losses in sugar cane in Queensland. In: CONGRESS ISSTC, 30. **Proceedings**, 1968. p. 1729-1735.
- 33 - EGUCHI, S. Y. Agentes Antimicrobianos. In: EGUCHI, S. Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V. F.; GALLO, C. R. **Pontos Críticos Microbiológicos em Usinas de Açúcar e Álcool**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello", 1989. 22 p.
- 34 - ESSIA NGANG, J. J.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 125-128, 1989.
- 35 - ESSIA NGANG, J. J.; WOLNIEWICZ, E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Inhibition of beet molasses alcoholic fermentation by lactobacilli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 5, p. 490-493, 1990.

-
- 36 - ESSIA NGANG, J. J.; WOLNIEWICZ, E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P.
Stimulation of lactobacilli during alcoholic fermentation: action of sucrose hydrolysis by yeast. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 8, p. 741-746, 1992.
- 37 - FRANCO, C. J. Fermentação alcoólica. **Saccharum**, v. 1, n. 3, p. 31-36, 1978.
- 38 - GALLI, Z. F. Fermentação do mel final das usinas de açúcar. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 2., Piracicaba: Instituto Zimotécnico, 1961. v. 2, p. 297-304.
- 39 - GALLO, C. D. Contaminantes bacterianos em mosto e dornas de fermentação alcoólica. In: EGUCHI, S. Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V. F.; GALLO, C. R. **Pontos Críticos Microbiológicos em Usinas de Açúcar e Álcool**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello", 1989, 18 p.
- 40 - GANOU-PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L.; GALZY, P.; PARFAIT, A. Les bacteries aerobies des milieux fermentaires a base de jus de canne a sucre. **Industries Alimentaires et Agricoles**, jul./ag. , n. 7-8, p. 579-585, 1989.
- 41 - HES, J. W. The deterioration of harvest cane. **International Sugar Journal**, v. 4, p. 102-104, 1952.
- 42 - HUANG, Y. C.; EDWARDS, C. G.; PETERSON, J. C.; HAAG, M. Relationship between sluggish fermentations and the antagonism of yeast by lactic acid bacteria. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 47, n. 1, p. 1-9, 1996.
- 43 - HYNES, S. H.; KJARSGAARD, D. M.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Use of virginiamycin to control the growth of lactic acid bacteria during alcohol fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, n.18, p. 284-291, 1997.
- 44 - JOLLY, S. L.; PRAKASH. Removal dextran from cane juice. **International Sugar Journal**, v. 89, p. 184-185, 1987.

- 45 - KAJI, D. A. **Influência da Temperatura e Infecção Lática na Fermentação Alcoólica**. Campinas, 1989. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- 46 - KAJI, D. A.; CANHOS, V. P. Contaminantes de processos de produção de açúcar e álcool. In: EGUCHI, S. Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V. F.; GALLO, C. R. **Pontos Críticos Microbiológicos em Usinas de Açúcar e Álcool**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello", 1989. 8 p.
- 47 - LAWRENCE, C. A.; BLOCK, S. S. **Desinfection, Sterilization and Preservation**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1968. 808 p.
- 48 - LIMA, U. A.; GOLDONI, J. S.; CEREDA, M. P.; SOUZA, L. G. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. **Brasil Açucareiro**, v. 12, n. 4, p. 21-27, 1974.
- 49 - LUCREDI, H. A.; FINGUERUT, J.; ROSSEL, C. E. V.; YOKOYA, F. Verificação da esterilidade do sistema de tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar para fermentação. **Boletim Técnico Copersucar**, v. 27, n. 84, p. 25-28, 1984.
- 50 - MAEDA, A. H. **Estudo de Bactérias Acéticas de Usina de Açúcar e Álcool**. Campinas, 1997. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- 51 - MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 1, p. 103-121, 1983.
- 52 - McMASTER, L. D.; RAVNO, A. B. Sucrose loss in diffusion with reference to thermophilic bacteria and lactic acid. In: SOUTH AFRICAN SUGAR TECHNOLOGY ASSOCIATION. **Proceedings**, 1975. v. 49, p. 49-52.
- 53 - McMASTER, L. D.; RAVNO, A. B. The occurrence of lactic acid and associated micro-organisms in cane sugar processing. In: CONGRESS ISSCT, 16. **Proceedings**, 1977. São Paulo, Brasil, p. 2679-2693.

- 54 - NEVES, L. B. Tecnologia da fabricação do álcool. **Revista Brasileira de Química**, v. 3, p. 89-134, 1938.
- 55 - OLIVA-NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica pelo processo batelada-alimentada**. Campinas, 1990. Tese (Mestre em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- 56 - OLIVA-NETO, P. **Estudo de Diferentes Fatores que Influenciam o Crescimento da População Bacteriana Contaminante da Fermentação Alcoólica por Leveduras**. Campinas, 1995. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- 57 - OLIVEIRA, M. C. F. L.; ANTUNES, G. M. S.; SACRAMENTO, S. Estudo prévio para normatização de técnicas para avaliação de bactericidas. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB E CONVENÇÃO DA ACTALAC, 4. e 7. **Anais**, 1987. p. 547-561.
- 58 - OLIVEIRA, A. J.; GALLO, C. R.; ALCARDE, V. E.; AMORIM, H. V. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos das principais bactérias contaminantes da fermentação alcoólica por espectrofotometria. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 5. **Anais**, 1993. p. 214-245.
- 59 - PILON, J. R.; BERTOLINI, M. C. Avaliação da flora bacteriana em uma indústria sucro-alcooleira durante uma safra. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 15., Ribeirão Preto, 1989. **Resumos**. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1989. p. 176.
- 60 - PRINCIPAIS bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, suas características e sensibilidade a antibióticos. Piracicaba, Fermentec S/C Ltda., 1991. 41 p.
- 61 - RHIGHI, J. C. I. Técnicas utilizadas no corte da cana-de-açúcar. In: SEMINÁRIO COPERSUCAR DA AGROINDÚSTRIA AÇUCAREIRA, 3. , Águas de Lindóia, 1975. **Anais**. p. 367-379.

- 62 - RODINI, M. A. T. **Isolamento, Caracterização e Identificação de Bactérias Contaminantes de Dornas de Fermentação nas Destilarias de Etanol.** Piracicaba, 1985. Tese (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.
- 63 - RODINI, M. A. T. Bactérias contaminantes do processo de fermentação de etanol e sua sensibilidade frente à penicilina e pentaclorofenol. **STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 8, n. 2, p. 52-54, 1989.
- 64 - ROSALES, S. Y. R. **Contaminantes Bacterianos da Fermentação Etanólica: Isolamento em Meios Diferenciais, Identificação e Avaliação de Desinfetantes.** Rio Claro, 1989. Tese (Doutor em Ciências) - Universidade "Júlio de Mesquita Filho", UNESP.
- 65 - SAMSON, F. E.; KATZ, A. M.; HARRIS, D. L. Effects of acetate and other short-chain fatty acids on yeast metabolism. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 54, n. , p. 406. 1955.
- 66 - SATTO, S.; BRAZZACH, L. B.; AQUARONE, E. Estudo comparativo entre vários desinfetantes para controle de contaminação nas fermentações alcoólicas de mostos de melaço de cana. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.16, n. 1/2, p. 122-132, 1980.
- 67 - SERRA, G.E.; CEREDA, M. P.; FERES, R.J.; BERTOZO, M. T.; VICENTE, A. T. Contaminação da fermentação alcoólica. **Brasil Açucareiro**, v. 93, n. 6, p. 26-31, 1979.
- 68 - SHAPER, M. E.; GARVIE, E. I.; TILBURY, R. H. Some slime forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. **Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 389-397, 1972.
- 69 - SILVA, N.; CANHOS, V. P. Caracterização da microbiota bacteriana contaminante do caldo de cana durante a etapa de resfriamento em torre no processo de produção de álcool. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 60-72, 1990.

- 70 - SKOLE, D. R.; HOGU, J. N.; RIZATTO, A. B. Microbiology of sugar: a taxonomic study. In: TECH. SESS. CANE SUGAR REFINING. **Res.**, 1977.
- 71 - SOUZA, L. G.; GOLDINI, J. S.; EIRA, A. F. Microorganismo em melaço armazenado. **Brasil Açucareiro**, v. 4, p. 204-206, 1977.
- 72 - STUPIELLO, J. P. Qualidade da cana-de-açúcar para fabricação de açúcar e álcool. **Açúcar e Álcool**, n. 2, p. 28-32, 1982.
- 73 - STUPIELLO, M. G. **Avaliação de Metodologia para Estudo da Ação de Alguns Antimicrobianos Frente a Bactérias Gram+ Isoladas da Fermentação Alcoólica**. Piracicaba, 1993. Tese (Mestre em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.
- 74 - TILBURY, R. H. Biodeterioration of harvest sugar cane. In: WALTERS, A. H.; ELPHICK, J. J. **Biodeterioration of materials**. Amsterdam: Elsevier, 1968. p. 717-730.
- 75 - TILBURY, R. H. Dextrans and dextranase. In: I.S.S.C.T., 14. **Proceedings**, 1971. p. 1444-1459.
- 76 - TILBURY, R. H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in sugar industry. In: CAN, J. G.; CUTING, C. V.; WHITING, G. C. **Lactic Acid Bacteria in Beverages and Foods**. London: Academic Press, 1975. p. 177-191.
- 77 - TILBURY, R. H.; HOLLINGSWORTH, B. S.; GRAHAM, S. D.; POTTAGE, P. Mill sanitation - A fresh approach to biocide evaluation. In: I.S.S.C.T., 16. **Proceedings**, 1977. v. 3, p. 2749-2768.
- 78 - TORLONI, M. Influência da clorotetraciclina na fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana pelo processo de corte. **Boletim do Departamento de Química da Escola Politécnica de São Paulo**, v. 12, n. 4, p. 29-36, 1958.
- 79 - YOKOYA, F. Microbiologia de processo: fermentação. In: EGUCHI, S. Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V. F.; GALLO, C. R. **Pontos Críticos**

Microbiológicos em Usinas de Açúcar e Alcool. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas "André Tosello", 1989. 22p.

80 - YOKOYA, F.; OLIVA-NETO, P. Caracterização da floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 1, p. 12-16, 1991.