

Teste de suscetibilidade aos inibidores de crescimento de colônias bacterianas contaminantes de uma indústria de etanol da microrregião de Ituiutaba, Minas Gerais

Susceptibility test for the growth inhibitors of bacterial colonies contaminants of an ethanol industry of the Ituiutaba microregion, Minas Gerais

Jéssica Velasco Andrade; Allisson Rodrigues de Rezende; Eleusa Maria Ferreira Rocha

RESUMO

A fermentação alcoólica é realizada por leveduras, principalmente da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. O processo fermentativo pode apresentar uma carga microbiana contaminante, que pode ser prejudicial à produção de etanol. Levando em conta que o processo fermentativo conduzido por *S. cerevisiae* é de grande valia para a produção de etanol, este estudo teve como objetivo principal testar a suscetibilidade aos inibidores de crescimento de seres procariontes contaminantes do processo fermentativo. Duas colônias bacterianas foram testadas em presenças dos seguintes antibióticos: Amicacina (AMI 30µg/mL), Amoxicilina (AMC 30µg/mL), Ampicilina (AMP 10µg/mL), Cefalexina (CTX 30µg/mL), Cloranfenicol (CLO 30µg/mL) e Tetraciclina (TET 30µg/mL). Os resultados indicaram diferentes sensibilidades para as colônias testadas. A colônia 01 apresentou-se sensível a todos os antibióticos testados, devido à presença dos halos de inibição. Ao contrário da colônia 02, onde se observou a resistência para três tipos de antibióticos analisados e sensibilidade aos demais. Indicando assim que a colônia 02 é mais resistente que a 01, já que esta última apresentou certa sensibilidade aos seis antibióticos testados, enquanto a primeira colônia citada mostrou-se resistente aos antibióticos. Portanto, o uso adequado de inibidores de crescimento de organismos procariontes contaminante pode garantir um controle microbiológico eficaz livre de microrganismos invasores, e um rendimento significativo da produção industrial do etanol brasileiro.

Palavras-chave: Levedura; *Saccharomyces cerevisiae*; Destilaria; Etanol; Fermentação.

ABSTRACT

The alcoholic fermentation is carried by yeast, especially by species *Saccharomyces cerevisiae*. The fermentation process may have a contaminant microbial load and may be harmful to the production of ethanol. Taking into account that the fermentation driven by *S. cerevisiae* is of great value to ethanol production, this study aimed to test the susceptibility to growth inhibitors of prokaryotes contaminants of the fermentation process. Two bacterial colonies were tested to following antibiotics: Amikacin (AMI 30µg / mL), Amoxicillin (AMC 30µg / mL), Ampicillin (AMP 10mg / mL), Cephalexin (CTX 30µg / mL), chloramphenicol

(CLO 30µg / mL) and tetracycline (TET 30µg / mL). The results showed different sensitivities to the tested colonies. Colony 01 had to be sensitive to all antibiotics tested, due to the presence of inhibition halos. In contrast to the colony 02 observed resistance to three kinds of analyzed antibiotics and sensitive for remaining, indicating that the colony 02 is more resistant than 01, since the latter showed some sensitivity to the six tested antibiotics, while said first colony was resistant to antibiotics. Therefore, the proper use of prokaryotes organisms contaminants growth inhibitors can ensure an effective microbiological control free of invading microorganisms, and a significant yield industrial production of Brazilian ethanol.

Keywords: Yeast; *Saccharomyces cerevisiae*; Distillery; Ethanol; Fermentation.

INTRODUÇÃO

Os organismos procariontes são os seres vivos mais plesiomórficos do planeta Terra e ainda assim há um número de espécies catalogadas relativamente pequeno quando comparado aos demais grandes táxons do domínio *Eukarya*. Mora e colaboradores (2011) apontam que são conhecidas apenas 11.513 espécies pertencentes aos domínios taxonômicos *Archaea* e *Bacteria*. Apesar de existirem espécies patogênicas, há muitas outras essenciais para vários processos, como as bactérias do processo fermentativo para obtenção de etanol.

Como abordado por Naves *et al.* (2010), os organismos contaminantes presentes no processo supracitado são os mesmos encontrados no solo da plantação de cana-de-açúcar, já que este é um imenso reservatório de microrganismos. A fermentação alcoólica é conduzida por leveduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, todavia Nobre (2005) ressalta que, se a carga microbiana contaminante deste processo atingir níveis elevados, estes podem ser prejudiciais à produção de etanol.

Em sua revisão de literatura, Naves *et al.* (2010) apontam ainda que os organismos procariontes mais comumente encontrados nos colmos da cana-de-açúcar são aqueles pertencentes aos gêneros *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Corynebacterium*, contudo também podem ser encontrados bolores e leveduras dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia*. Gallo (1990) ressalta que *Lactobacillus* é outro gênero freqüentemente encontrado, e que este também se destaca como um contaminante bacteriano que pode ser prejudicial à produção de etanol.

Levando em conta que o processo fermentativo realizado por *S. cerevisiae* é de grande valia para a produção de etanol, este trabalho apresentou como objetivo primordial, testar a suscetibilidade aos inibidores de crescimento de seres procariontes contaminantes deste processo fermentativo.

METODOLOGIA

As análises microscópicas das colônias bacterianas contaminantes do processo fermentativo do etanol de destilaria, bem como os testes de suscetibilidade das mesmas foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), Unidade Ituiutaba. A destilaria selecionada para realização dos testes pertence à microrregião geográfica de Ituiutaba e mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (IBGE, 1990).

O meio de cultura utilizado para o crescimento das colônias bacterianas contaminantes contendo: glicose 0,1%; extrato de levedura 0,25% e triptona 0,5% (GLT), com pH 6,8 (CECCATO-ANTONINI, 2010). Estas foram cultivadas em placa de Petri em meio, acima citado, e incubadas a 37 °C por 48 horas. Após o crescimento, elas foram observadas ao microscópio óptico quanto à morfologia celular.

Para a contagem de bactérias contaminantes do processo fermentativo foi utilizado o método de Andrade e Rocha (2013) baseado em Ceccato-Antonini (2010). Andrade e Rocha (2013) caracterizaram morfologicamente as bactérias quanto à forma e a coloração do Gram e, além disso, determinaram a Concentração Mínima Inibitória (MIC) para o inibidor de crescimento Kamoran. Para dar continuidade ao trabalho de Andrade e Rocha (2013), foi realizado um teste de suscetibilidade, através de um antibiograma, o qual avaliou a sensibilidade a outros inibidores de crescimento bacteriano.

Para este experimento, duas colônias bacterianas foram cultivadas em meio GLT líquido por *overnight*, em seguida, 100µL de cada amostra crescida foram espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigaslky em placas de Petri contendo meios GLT sólidos. A seguir, discos de antibióticos foram colocados com o auxílio de uma pinça esterilizada nas placas de Petri em meios sólidos. Os discos de

antibióticos utilizados foram os seguintes: Amicacina (AMI 30µg/mL), Amoxicilina (AMC 30µg/mL), Ampicilina (AMP 10µg/mL), Cefalexina (CTX 30µg/mL), Cloranfenicol (CLO 30µg/mL) e Tetraciclina (TET 30µg/mL). As placas de Petri foram incubadas a 37°C por 1 a 2 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dando continuidade ao trabalho de Andrade e Rocha (2013), que já haviam caracterizado morfologicamente as bactérias e determinaram o MIC para o inibidor de crescimento Kamoran, estas autoras relataram que as bactérias contaminantes apresentaram a forma de bastonetes, de coloração roxa e eram Gram-positivas, dado este que corrobora com Gallo (1990), já que em sua tese, o autor concluiu que a flora bacteriana gram-positiva foi predominante para as amostras analisadas. Com relação ao MIC, as autoras anteriormente citadas, mostraram que a concentração inibitória mínima em presença de Kamoran foi acima de 3 ppm para a colônia analisada, e esta concentração foi capaz de inibir a contaminação bacteriana, como abordado na literatura específica, além de ter garantido a viabilidade da levedura.

Para dar seqüência ao trabalho de Andrade e Rocha (2013), o presente estudo teve como cerne da pesquisa o teste de sensibilidade a inibidores de crescimento bacteriano contaminantes do processo fermentativo, executado por meio de um antibiograma. Para isso, foi realizado um experimento em que as colônias 01 e 02, foram submetidas ao teste de suscetibilidade a antibióticos. O resultado quanto a resistência ou sensibilidade aos antibióticos testados está disposto na tabela 01, onde a presença do halo de inibição e ausência de crescimento da colônia foi representado por S e a ausência do halo de inibição e crescimento da colônia foi simbolizado por R.

Tabela 01. Resposta da resistência ou sensibilidade de colônias bacterianas contaminantes testadas quanto aos antibióticos abaixo relacionados.

Antibióticos	Colônia 01	Colônia 02
Amicacina (AMI 30)	S	S
Amoxicilina (AMC 30)	S	S
Ampicilina (AMP 10)	S	R
Cefalexina (CTX 30)	S	R
Cloranfenicol (CLO 30)	S	R
Tetraciclina (TET 30)	S	S

Os resultados indicaram diferentes sensibilidades para as colônias testadas. A colônia 01 apresentou-se sensível a todos os antibióticos testados, devido à presença dos halos de inibição. Ao contrário para a colônia 02 observou-se a resistência para três tipos de antibióticos analisados e sensibilidade aos demais. O resultado em questão pode ser melhor visualizado na figura abaixo.

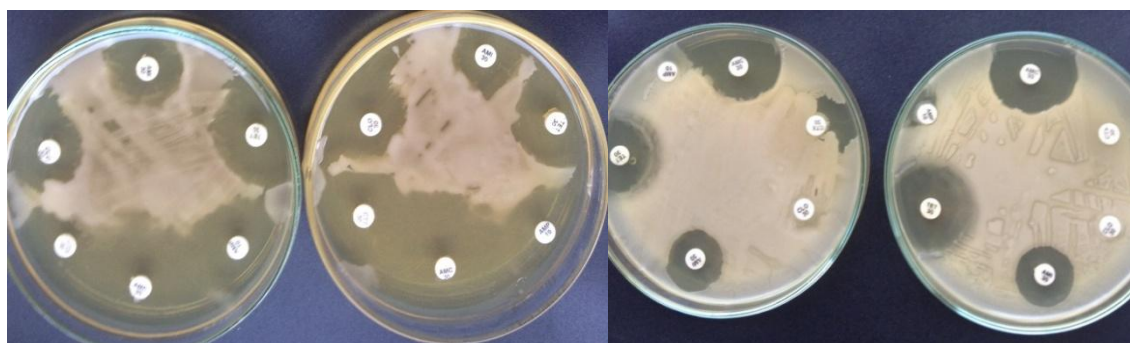


Figura 01. Teste do antibiograma para a colônia 01 (à esquerda) e colônia 02 (à direita).

Os métodos convencionais usados pelas indústrias sucroalcooleiras para o tratamento do mosto, com o intuito de diminuir a carga microbiana contaminante, preconizam o uso de antibióticos e de ácido sulfúrico concentrado (ALCARDE *et al.*, 2003; NOBRE *et al.*, 2007). Este último garante inclusive, a desfloculação do material (SOUZA; MUTTON, 2004). Na destilaria do presente estudo, o ácido sulfúrico é utilizado bem como o antibiótico Kamoran.

O Kamoran é usado em vários trabalhos (ALCARDE, 2000; ALCARDE *et al.*, 2001) e mostrou-se eficiente na eliminação de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* contaminantes do mosto, proporcionado uma melhora em alguns parâmetros bioquímicos da fermentação, tais como pH, teor de ácidos orgânicos e rendimento no processo fermentativo. Estas foram as qualidades buscadas por

grande parte das destilarias brasileiras. O antibiótico Kamoran atua com efeitos bacteriostáticos, pois inibe o crescimento e não ocasiona morte celular, e bactericida, já que há morte celular, porém sem lise das células (SILVA, 2010).

Segundo as autoras Silva (2010) e Prado (2014), “os princípios ativos dos antibióticos são de origem do metabolismo de microrganismos selecionados e o seu grau de pureza depende do refinamento do processo de purificação de cada empresa produtora de antibióticos”. No caso do Kamoran, por exemplo, ele é obtido a partir da fermentação de *Streptomyces cinnamonensis*, que produz o princípio ativo monensinasódica cristalina, que impede o transporte de cátions na membrana das bactérias Gram-positivas (RQR, 2009).

A resistência bacteriana aos antibióticos é devido a mutações genéticas que ocorrem nestes seres procariontes. Segundo Oliveira *et al.* (2009) isso permite o crescimento seletivo das células mutadas na presença destes antibióticos. É necessário conhecer a sensibilidade da bactéria frente ao antibiótico, para que, após a possível mutação, seja realizada a seleção dos transformantes, utilizando quantidades econômicas e ao mesmo tempo eficientes de antibiótico (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Quanto aos antibióticos testados neste trabalho, apenas Ampicilina (AMP 10), Cefalexina (CTX 30) e Cloranfenicol (CLO 30) se mostraram resistentes à segunda colônia de bactérias contaminantes do processo fermentativo. Destes, pode-se destacar a ampicilina, que na colônia 02, por mais que não tenha apresentado halo de inibição, diminuiu um pouco mais a concentração/quantidade de bactérias contaminantes próximas ao disco do antibiótico (ver Figura 01), quando comparadas aos demais. Se houvesse uma alteração na concentração da ampicilina, possivelmente estas bactérias se mostrariam sensíveis ao antibiótico em questão.

A ampicilina é um antimicrobiano sintético do tipo penicilina, de amplo espectro, sendo um quimioterápico do grupo β -lactâmico (FERREIRA, 1995) que interfere na síntese de polipeptidioglicano, na parede celular bacteriana, cuja ação final é a inativação de um inibidor das enzimas autolíticas, conduzindo à lise da bactéria. A ampicilina é destruída por algumas bactérias que produzem β -lactama se e por muitos microrganismos Gram-negativos (RANG *et al.*, 1995).

Oliveira Filho (2010), em seu trabalho, mostrou que a interação própolis/ampicilina é eficiente na produção de vinhos com maiores teores alcoólicos, resultando em maiores rendimentos em álcool. Acredita-se que sejam necessários mais estudos acerca da ampicilina, já que este antibiótico pode diminuir a quantidade de bactérias e ainda otimizar o rendimento alcoólico no processo fermentativo.

Assim como Oliveira Filho (2010), outros pesquisadores são instigados a inovar para melhorar ou aperfeiçoar processos e técnicas. Ludwig *et al.* (2001), por exemplo, desenvolveram uma técnica simples e econômica para auxiliar no controle industrial das condições microbiológicas das destilarias produtoras de etanol, visando contribuir para o monitoramento da população de bactérias indutoras da floculação, contaminantes naturais do processo de fermentação alcoólica industrial.

Vale destacar que o controle de bactérias contaminantes não deve ser realizado apenas com uso de antibióticos convencionais, pois seu uso indiscriminado e contínuo, durante os processos fermentativos nas indústrias de álcool provocam seletividade nas cepas de bactérias presentes nestes processos. Com isso, as bactérias selecionadas tornam-se menos sensíveis à ação dos antibióticos (CINELLI, 2012). Caetano e Madaleno (2011) apontam alguns produtos naturais – a própolis, o lúpulo, o pomelo e o jambolão – que também possuem ação antimicrobiana, porém ainda faltam mais estudos sobre seus poderes biocidas na fermentação alcoólica.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a colônia bacteriana 02 é mais resistente que a 01, já que a esta última apresentou certa sensibilidade aos seis antibióticos testados, enquanto a primeira colônia citada mostrou-se resistente aos antibióticos Ampicilina (AMP 10), Cefalexina (CTX 30) e Cloranfenicol (CLO 30). O uso de outros tipos de antibióticos pode garantir um controle microbiológico eficaz livre de microrganismos invasores, e um rendimento significativo da produção industrial do etanol brasileiro.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FAPEMIG, órgão fomentador deste estudo. Agradecemos também à Professora Daniela Paula de Oliveira e à Bióloga Camila Cristina Saturnino, que gentilmente nos forneceram as amostras do fermento de levedo. E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, A. R. **Efeito da radiação gama em alguns parâmetros microbiológicos e bioquímicos da fermentação alcoólica.** 2000. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, 2000.

ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Comparison between gamma radiation and Kamoran HJ in the decontamination of sugar-cane must. **Journal of Food Processing and Preservation**, Malden, MA, USA, v. 25, n. 02, p. 137-147, May. 2001.

ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 60, n. 04, p. 677-681. Oct./Dec. 2003.

ANDRADE, J. V. **Identificação e caracterização de microrganismos invasores de uma destilaria de etanol do Pontal Mineiro.** 2014. 28 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), unidade Ituiutaba, Ituiutaba, MG, 2014.

ANDRADE, J. V.; ROCHA, E. M. F. Identificação de contaminantes bacterianos em uma destilaria de etanol do Pontal do Triângulo Mineiro. **Intercursos**, Ituiutaba, MG, v. 12, n. 01, p. 46-58, jan./jun. 2013.

CAETANO, A. C. G.; MADALENO, L. L. Controle de contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. **Ciência & Tecnologia**, Jaboticabal, SP, v. 02, n. 01, p. 27-37, 2011.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica**. São Carlos, SP: EdUFSCar, 2010. 103 p.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, 2012.

FERREIRA, E. M. F. C. **Identificação de controlo adaptativo de processos biotecnológicos**. 1995. 295 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia (FE), Universidade do Porto (UP), Porto, Portugal, 1995.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1990. 388 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Divisão Regional do Brasil em Mesorregiões e Microrregiões Geográficas**. v. 01. Rio de Janeiro, RJ: IBGE, 1990. 135 p.

LUDWIG, K. M.; OLIVA NETO, P.; ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 21, n. 01, p. 63-68, jan./abr. 2001.

MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B.; WORM, B. How many species are there on Earth and in the Ocean? **PLoS Biology**, San Francisco, California, v. 09, n. 08, p. 01-08, aug. 2011.

NAVES, R. F.; FERNANDES, F. S.; PINTO, O. G.; NAVES, P. L. F. Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, GO, v. 06, n. 11, p. 01-16, 2010.

NOBRE, T. P. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, 2005.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 27, n. 01, p. 20-25, jan./mar. 2007.

OLIVEIRA FILHO, J. H. **Atividade antimicrobiana de própolis sobre contaminantes da fermentação alcoólica destinada a produção de cachaça**. 2010. 53 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Jaboticabal, SP, 2010.

OLIVEIRA, T. F.; FERREIRA, J. S.; BOA SORTE, P. M. F.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; SCHWAB, S. **Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da coleção de culturas da EMPRAPA Agrobiologia**. Seropédica, RJ: EMBRAPA Agrobiologia, 2009. 16 p. (Boletim de Pesquisa & Desenvolvimento, 49).

PRADO, J. L. **Uso de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcoólica**. 2014. 45 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Botucatu, SP, 2014.

RANG, H.P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. **Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 1995.

REVISTA QUÍMICA REAL (RQR). Kamoran News: Manual Kamoran no controle bacteriano em fermentações alcoólicas que sangram e secam levedura seca. **Revista Química Real**, Belo Horizonte, MG, v. 01, n. 01, mar. 2009.

SILVA, G. K. C. **Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de microrganismos contaminantes do processo fermentativo para obtenção do etanol**. 2010. 93 f. Trabalho de Conclusão Curso (Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis) – Faculdade de Tecnologia (FATEC), Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza (CEETEPS), Araçatuba, SP, 2010.

SOUZA, M. A. C.; MUTTON, M. J. R. Floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada através de técnica fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, MG, v. 28, n. 04, p. 893-898, jul./ago. 2004.

AUTORES

JÉSSICA VELASCO ANDRADE é Graduada em Agronomia pela Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), unidade Ituiutaba/MG e atualmente é Mestranda em Sustentabilidade na Agricultura em Agronomia na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade de Cassilândia/MS.

ALLISSON RODRIGUES DE REZENDE é Mestre em Biologia Vegetal pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e atualmente é docente da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), unidade Ituiutaba/MG.

ELEUSA MARIA FERREIRA ROCHA é Doutora em Genética de Microrganismos pela Universidade de São Paulo (USP) e atualmente é docente da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), unidade Ituiutaba/MG; e-mail: eleusarocha@hotmail.com