

ALCIDES MARTINELLI FILHO

Engenheiro Agrônomo

Departamento de Microbiologia

Instituto Zimotécnico

U. S. P.

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DOS MICROORGANISMOS PRESENTES NOS AÇÚCARES DA ZONA DE PIRACICABA

Tese de Doutorado

apresentada à

Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz», U. S. P.

Piracicaba, Outubro de 1955.

ÍNDICE GERAL DA MATÉRIA

	Páginas
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura.....	4
3. Material e Métodos.....	9
3.1. Material.....	9
3.2. Coleta do Material.....	10
3.3. Meios de Cultura.....	11
3.3.1. Meios de cultura para a determinação de fungos.....	11
3.3.2. Meios de cultura para a determinação de bactérias.....	13
3.3.2.1. Meios de cultura para a determinação de bactérias mesofílicas.....	13
3.3.2.2. Meios de cultura para a determinação de bactérias termofílicas.....	14
3.3.3. Meios de cultura para a determinação de leveduras.....	15
3.4. Métodos.....	17
3.4.1. Métodos usados.....	17
3.4.1.1. Métodos para a determinação dos microorganismos mesofílicos.....	17
3.4.1.2. Métodos para a determinação dos microorganismos termofílicos.....	21
3.4.1.2.1. Amostragem.....	21
3.4.1.2.2. Tratamento da Amostra.....	21
3.4.1.2.3. Determinação da presença de bactérias termofílicas aeróbias formadoras de ácido.....	21
3.4.1.2.4. Determinação da presença de bactérias anaeróbicas termofílicas que produzem H ₂ S.....	22
3.4.1.2.5. Determinação da presença de bactérias anaeróbicas termofílicas que produzem gás.....	22
4. Resultados obtidos.....	23
4.1. Resultados das análises para as determinações dos microorganismos mesofílicos.....	23

4.2. Resultados das análises para as determinações dos microorganismos termofílicos.....	28
5. Discussão dos resultados.....	32
5.1. Discussão dos meios de cultura.....	32
5.2. Discussão relacionada aos microorganismos - mesofílicos.....	32
5.3. Discussão relacionada aos microorganismos - termofílicos.....	35
6. Conclusões.....	38
7. Resumo.....	39
8. Summary and conclusion.....	40
9. Bibliografia citada.....	40
10. Agradecimentos.....	45

M. Cantuária 19

1. INTRODUÇÃO

Por um largo período de tempo, a ideia mais comum sôbre a deterioração do açúcar, era a de que êsse fato ocorria devido a certas mudanças, as quais poder-se-iam chamar de autógenas, isto é, mudanças independentes de fatores ou influências externas. Assim, é que acreditavam ser a deterioração causada pela ação hidrolítica de ácidos orgânicos existentes no açúcar.

No início do último século, contudo, observadores ocasionais correlacionaram a deterioração do açúcar com a atividade de microorganismos, em vez da suposta ação de ácidos. E já em 1829, KOPELOFF, VAN DIJK e VAN BEEK relataram suas observações feitas em uma amostra de açúcar que havia sido enegrecida pela ação de fungos. O agente dêste enegrecimento era o Conferva mucoroides.

Desde então, até os dias de hoje, a teoria da deterioração do açúcar por microorganismos foi se tornando cada vez mais aceita. Atualmente o problema está inteiramente resolvido conhecendo-se, ademais, os meios de sua prevenção que são quasi universalmente conhecidos e praticados.

Entretanto, foi OWEN provávelmente o primeiro a correlacionar o número de microorganismos presentes e o grau de deterioração do açúcar armazenado. Os KOPELOFF foram, indubitavelmente, os primeiros a mostrar a relação entre o número de fungos e o comportamento do açúcar durante o armazenamento.

A questão da deterioração do açúcar em armazenamento tem sido objeto de tantas investigações, quer na in-

Mantovani/17

dústria de açúcar de cana como na de beterraba, e desde há muito, explica-se pelo simples fato da perda que o fenômeno ocasiona. Realmente, a presença de microorganismos, tais como bactérias, fungos e leveduras, em processos industriais, é de máxima importância quando estes organismos afetam a qualidade do produto, reduzem a produção ou constituem em perigo para a saúde. Nas usinas de açúcar os microorganismos podem reduzir o rendimento devido a hidrólise de sacarose, impedir o funcionamento da fábrica quando os materiais gomosos produzidos por bactérias interferem na qualidade do caldo ou, ainda, afetar o produto final que é o açúcar. Além disso, as mudanças na composição dos produtos alimentícios entre o período da sua confecção e consumo, paralelamente aos problemas de ordem científica correm, também, os de ordem econômica e de saúde pública.

À primeira vista poderá parecer um exagero as afirmações de que um produto tão puro como o açúcar possa ser responsável por uma série de ocorrências tão diferentes de tudo que se conhece sobre suas propriedades. Mas isso tanto é verdade, que os fabricantes de conservas dos Estados Unidos exigem dos fornecedores de açúcar, produtos quasi que bacteriológicamente puros, isto é, com um número reduzidíssimo de esporos por grama. Para tanto o National Canners Association possui padrões para bactéria termofílicas e OWEN, sobre o mesmo preconiza padrões também para fungos, leveduras e bactérias mesofílicas. Exigência idêntica é levada a efeito pela Companhia Nestlé, em Araras.

É muito difícil de se determinar os prejuízos em usinas de açúcar devido à ação desses microorganismos, porém, não há menor dúvida que a destruição do açúcar por esse meio é um fator de importância econômica.

O interesse na avaliação das concentrações dos microorganismos no açúcar prende-se ao efeito que essa flora irá representar na qualidade do produto armazenado. A determinação dos organismos existentes no açúcar é geralmente limitada aos fungos e bactérias termofílicas e, com pequenas excessões, às leveduras que por ventura possam existir. Desde que os fungos são os principais agentes deterioradores, somente a constatação de sua presença e intensidade, preencheriam as finalidades de uma análise.

Algunas vezes, entretanto, torna-se necessário ao refinador investigar a excessiva contaminação de bactérias termofílicas em seu produto, em virtude de exigências do mercado consumidor. Daí um exame no açúcar de onde originou aquele refinado tem que ser executado para a investigação das bactérias termofílicas.

As bactérias mesofílicas do açúcar são espécies esporógenas, podendo sobreviver aos estagios da fabricação. O seu aparecimento no açúcar tem como fonte o caldo das moendas. A sua determinação pode ter uma significância maior do que possa parecer, uma vez que a sua concentração no açúcar pode ser tomada como índice e eficiência da clarificação ou do estado de higiene da usina.

Sòmente em casos especiais procede-se uma análise qualitativa dos microorganismos do açúcar para a determinação de tipos específicos de bactérias, como por exemplo, para verificar a presença das produtoras de goma (levânio) e em casos mais raros, para estimar a presença do Leuconostoc mesenteroides, formador de dextrão.

Muito embora reconheçamos estarem estas análises bastante fóra das cogitações rotineiras das usinas de açúcar os resultados que elas revelam são muito mais do que um simples interesse acadêmico de investigar o comportamento de diversos microorganismos em presença de substratos de alta concentração de sacarose. Elas visam a importância do estudo de açúcares refinados e cristais como vetores de microorganismos deterioradores de alimentos.

Apezar de não existir em nosso País nenhuma disposição oficial para controlar a sanidade do açúcar de cana, é interessante, sem dúvida, conhecer a flora microbiana que possivelmente êle deverá conter. Para nós, todavia, sua importância torna-se ainda mais evidente por estarmos dentro do maior centro produtor de açúcar de São Paulo, e sabermos que com relação a êste problema não existe, ou pelo menos não conhecemos, qualquer trabalho, excetuando um ligeiro exame executado por SCOTT, em 1912, em algumas amostras que êle chamou de "açúcar bruto do Brasil".

Esperamos, portanto, que esta nossa pequena contribuição possa constituir um início do estudo de tão importante questão.

Maxwell

2. REVISÃO DA LITERATURA

- 4 -

A bibliografia sobre a deterioração dos açúcares - por via microbiana é tão volumosa que se torna muito difícil citar toda literatura publicada sobre o assunto. O que fizemos foi, portanto, rever o que se fez, citando apenas, o que nos pareceu de maior valor.

Assim vamos verificar que há muito tempo atrás, em 1673, época em que o açúcar vindo da Índia, foi introduzido na Europa, era de conhecimento como demonstra LIGON (28) - que o açúcar deveria ser guardado em lugar seco, para sua perfeita conservação. Quando não, se descoloria e, em casos extremos, se convertia em xarope.

Porém, já no início do último século, ou mais precisamente em 1829, VAN DIJK e VAN BEEK, de acordo com KOPE LOFF (26) foram os primeiros a falar sobre o verdadeiro agente da deterioração, quando relataram o fungo Conferva mucoroides, que havia enegrecido amostras de açúcar.

Enquanto uns acreditavam ser a umidade a causadora da deterioração do açúcar, outros disso culpavam os microorganismos, enquanto terceiros apontavam a ação de cloretos e outras impurezas existentes no açúcar, como responsáveis pela sua deliquescência. À esse grupo pertencia WRAY (49) que, em 1848, dizia ser possível "essa deliquescência continuar, até toda massa de açúcar se decompor". Sugeriu como um possível meio para impedir esta deterioração, a precipitação dos cloretos do caldo de cana com nitrato de prata.

Pouco mais tarde, PAYEN (39) relatou à Academia Franceza dois casos de deterioração do açúcar, nos quais os cristais tinham se corroído, e descolorido em alguns casos pela ação de fungos. E, logo mais, em 1869, DUBRUNFAUT (13) chamou a atenção da presença em açúcar de beterraba " desses organismos inferiores" descritos cuidadosamente por Pasteur como as causas das fermentações alcoólicas e bacterianas.

Em 1880 GAYON (17) verificou que o açúcar sofria transformações, e atribuiu aos "organismos de natureza das leveduras alcoólicas", a temperatura e a umidade como responsáveis por essas transformações.

(MAXWELL, (30) na Louisiana, 1896, observou micro

Marshall H. P.

organismos em açúcar deteriorado, atribuindo essa deterioração às bactérias dos ácidos láctico e butírico.

Em 1898, SHOREY, (42) constatou o fungo Penicillium glaucum em amostras de açúcar hawvaiano deteriorado. Sugeriu que a ação inversiva desse fungo é que determina a deterioração do açúcar. Foi mais adiante ainda, dizendo que a infecção tem lugar quando os esporos entram em contacto com o açúcar pela corrente de ar nas centrífugas. Fez também observações de que os açúcares mais deteriorados eram os fabricados em lugares onde existia muita poeira no ar onde, evidentemente, os esporos estavam mais espalhados.

O ponto de vista de SHOREY foi confirmado em 1899 por KAMERLING (23) em Java, quando encontrou, nada menos, de 19 tipos de fungos, os quais relatou como sendo do gênero Penicillium. Dizia ainda que os fungos iniciavam a deterioração, que era continuada pelas leveduras, depois que o açúcar adquirisse bastante umidade.

Um ano mais tarde, LAXA, (27) fez um estudo das bactérias que ocorrem nas fábricas de açúcar de beterraba onde encontrou como organismo dominante uma bactéria formadora de goma, a qual deu o nome de Clostridium gelatinosum. Observou também a natureza termofílica desse organismo. Com relação à infecção nas usinas, LAXA achava que a sua causa, residia na contaminação ocasionada pelas partículas de solo aderentes às raízes da cana e, à poluição do ar.

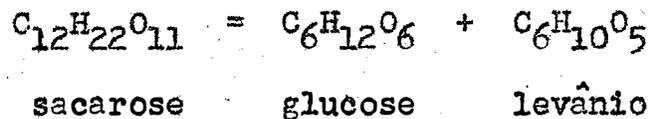
Em 1902 GREIG-SMITH (19) descobriu na Austrália um microorganismo deteriorador do açúcar, que mais tarde também foi verificado em Java, Mauritius, Egito, Perú, França, Alemanha e Rússia. Devido a sua habilidade em converter a sacarose na goma levorotatória levânio, GREIG-SMITH deu a esse microorganismo o nome de Bacillus levaniformans. Em virtude de sua larga distribuição julgou o autor ser ele o responsável pela deterioração e não o fungo determinado por SHOREY.

Nesse mesmo ano, DODSON (12) publicou um trabalho demonstrando a possibilidade de se obter um açúcar deteriorado, pela inoculação de um açúcar com culturas de bactérias, previamente isoladas de açúcar deteriorado. DODSON, nesse particular foi o pioneiro, pois antes ninguém havia executado experimentalmente a infecção do açúcar.

Monatsh. f. Chem.

Em 1908 apareceu um trabalho de autoria de DEERR e NORRIS (11) onde publicaram os resultados de suas investigações sobre a deterioração do açúcar. Assinalaram certas espécies de bactérias que tinham a faculdade de promover alterações no açúcar. Este trabalho foi continuado por BRAIN e DEERR (3) e constitui um estudo intensivo sobre a microflora do açúcar e das condições que influenciam a ação dos microorganismos.

Em 1911 OWEN (31) na Louisiana, chegou a conclusão de que a deterioração do açúcar não é devida à inversão, mas sim a uma fermentação de goma que se forma sob reação levemente alcalina. Esta fermentação, de acordo com OWEN, é produzida por um grupo de bactérias compreendendo as pseudo "potato bacilli", que causam a destruição da sacarose por um enzima, levânase, que tem ação extra celular, e transforma a sacarose de acordo com a seguinte equação:



As "potato bacilli" que ocorrem largamente nos solos podem ser facilmente introduzidas nas usinas, aderentes a cana. A grande resistência de seus esporos oferece meios para que elas atravessem incólumes todas as fases de fabricação chegando até o produto final, que é o açúcar. OWEN demonstrou que, enquanto 98% dos microorganismos perecem no processo de clarificação, em nenhuma fase ou estágio da fabricação é o produto isento de microorganismos, e são exatamente os 2% restantes que constituem os esporos resistentes ao aquecimento que escapam à destruição e vão ter ao açúcar. Como meios de combate OWEN recomenda o uso de antissépticos para as moendas e tanques, e grande cuidado na secagem do açúcar.

Nesse mesmo ano SCHONE (40) em suas observações reforçou o conhecimento da importância dos fungos e da "torulae" na inversão, e notou em açúcar deteriorado a presença dos gêneros Mucor e Penicillium e, neste último, principalmente o Penicillium glaucum. SCHONE investigou também a acidez produzida pela introdução de culturas puras desses microorganismos em soluções estéreis de açúcar. Esse autor ainda diz que a atividade biológica desses organismos pode atingir um ponto tal que provoca uma combustão espontânea do açúcar.

M. Martins

Cita um caso no qual um lote de 1.000 toneladas de açúcar de beterraba foi destruído dessa maneira, com força quase que explosiva (40).

Um ano mais tarde, em 1912, SCOTT (41) isolou espécies de Aspergillus e Penicillium de açúcar do Brasil, Peru, Java e Jamaica, estudou o desenvolvimento e o poder de inversão desses gêneros, bem como as medidas de precauções para evitar que os açúcares sejam infeccionados por esses microorganismos.

AMMONS, (1) em 1917, verificou micélio de fungos em açúcar, e isolou Aspergillus e Rhizopus bem como Penicillium glaucum e Penicillium purpurogenum e, por meio de inoculações ele demonstrou que o Penicillium glaucum é capaz de produzir uma apreciável deterioração no açúcar. É opinião sua que a deterioração não é devida a ação de um único microorganismo.

BROWNE (4) foi o primeiro a investigar as mudanças, sob o aspecto químico, na composição dos açúcares deteriorados. Observou nesses açúcares um grande número de Torula e Monilia e, dentre essas, a Monilia nigra e Monilia fusca. Além desses microorganismos BROWNE mencionou a presença de fungos pertencentes ao gênero Penicillium.

OWEN, (32) em 1918, volta a apresentar outro trabalho onde isolou fungos do gênero Aspergillus de um grande número de amostras de açúcar da Louisiana. Estudou além disso, a sua ação em soluções de açúcar de alta concentração. Em virtude dessas observações, conclui que os fungos são os mais perigosos deterioradores devido ao seu grande poder de inversão, e a propriedade de exercer sua ação em soluções concentradas, mesmo em meios pobres em elementos nutritivos.

BLAKE (2) e GEERLIGS (18) apresentaram, nessa mesma época observações sobre o assunto, porém mais de interesse prático para as próprias usinas do que trabalhos científicos de laboratório.

Em 1919 apareceram as intensivas investigações dos KOPELOFF (25) que orientaram seus estudos às espécies de fungos que ocorrem no açúcar e seu poder de deterioração. Procuraram também estabelecer medidas para a fabricação e armazenamento do açúcar sob condições preventivas. Os KOPELOFF

tiveram por principal preocupação correlacionar as espécies e números de fungos com o grau de deterioração dos açúcares.

Da mesma maneira que os KOPELOFF defendiam a ideia de que os fungos eram os principais agentes de deterioração, em 1922, TEMPANY e DE CHARMOY (44) concluíram, após investigações em açúcar de Maurítius, que a Torulae é o organismo de maior ação sob aquele ponto de vista.

Em 1923, OWEN (33) apresenta outro trabalho que vem de encontro com a ideia de TEMPANY e DE CHARMOY, pois baseia-se, principalmente, no uso da Torula como preventivo de deterioração. A levedura seria inoculada ao açúcar e agiria como agente protetor.

Apesar de serem inúmeros os trabalhos com relação aos microorganismos presentes no açúcar, o estudo da flora bacteriana dos produtos no qual aquela substância toma parte até agora, não recebeu nenhuma atenção dos pesquisadores. WEINZIRL (45) contudo, demonstrou que bactérias vindas com o açúcar podiam ser as responsáveis pela explosão de chocolates. Este trabalho, embora contenha nenhuma referência às bactérias termofílicas do açúcar, constitui, entretanto, um marco inicial para o estudo de tão importante problema.

Tais microorganismos são as bactérias que atravessam tôdas as fases de fabricação e vão ter ao açúcar, que assim contaminado pode ocasionar distúrbios às conservas e às bebidas em cuja composição êles façam parte.

Os pioneiros nêsses estudos foram CAMERON e WILLIAMS (8) com seus trabalhos apresentados em 1928.

Apareceram depois dessa data os trabalhos de CAMERON (5), CAMERON e YESAIR (9), DUVAL (14), CAMERON e BIGELOW (10), e HOMANS, (22) onde salientam o fato da existência de grande número de bactérias termofílicas nas refinarias, principalmente onde a higiene fôr descuidada. Os esporos dêsses organismos são resistentes ao calor. A importância de sua presença no açúcar, como já dissemos, reside no fato de serem os causadores da deterioração de alimentos e bebidas, quando êle fôr usado para tal mister.

Foi nessa época também que apareceram os métodos oficiais usados pelo "National Cannery Association" para a de

terminação das bactérias termofílicas. Isso verificamos nas publicações de CAMERON (6) (7) que contribuiu para a sua elaboração.

Todos os autores são concordes que as próprias medidas de sanidade usadas nas usinas e refinarias são as mais praticáveis e efetivas no contrôlo das bactérias termofílicas. HALL e KEANE (20) contudo, estudaram o uso de irradiações com luz ultra violeta nas fábricas e concluíram que meta de das espécies de microorganismos que ocorrem no açúcar podem ser mortos por meio dêste processo. Esta medida, entretanto, não é praticada nas usinas.

Como dissemos ao iniciar esta revisão bibliográfica a literatura sôbre o assunto é vastíssima quer sob o ponto de vista técnico quer sob o ponto de vista elucidativo. Últimamente entretanto, embora valiosos, os trabalhos que têm sido publicados, já não apresentam novidades de ordem técnica, - constituem apenas, pontos de observações de interesse local. Por essa razão não foram aquí citados.

Devemos, contudo, ainda mencionar os trabalhos de OWEN (36) (38) que há quasi meio século vem trabalhando e apresentando contribuições de alto valor sôbre o assunto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

Os materiais que nos forneceram elementos para êste estudo foram amostras de açúcar cristal, refinado, demerara e batido, colhidas em usinas da região de Piracicaba e comércio local.

Por ser Piracicaba um dos maiores centros açucareiros do País, demos inteira preferência aos açúcares aquí fabricados, para a elaboração do presente trabalho.

Poucas amostras colhemos no comercio distribuidor da cidade. Nossas vistas se voltaram preferentemente aos produtos recém fabricados ou armazenados nos proprios depósitos das usinas localizadas em diferentes pontos do Município.

Assim procedemos por ser o nosso objetivo conhecer o estado microbiológico do açúcar, na sua fonte de origem.

Na região de Piracicaba, como alias acontece em to-

M. Almeida

do, o Estado, somente um tipo de açúcar é fabricado: o crystal. Excepcionalmente outros tipos merecem a atenção dos usineiros. Em algumas usinas, entretanto, existem refinarias anexas, onde parte do açúcar crystal é refinado e vendido no comércio com essa denominação.

Em geral, o açúcar da região, tanto o crystal como o refinado, apresentam ótimas características, como se poderá ver pelo quadro abaixo:-

Determinações	Tipos de açúcar fabricados				
	crystal de 1ª	crystal de 2ª	crystal mixto	redondo ou demerara	refinado
Pol	99,55	97,60	98,90	96,58	99,75
Redut.	0,18	0,89	0,31	1,35	0,06
Cinzas	0,05	0,13	0,08	0,33	0,04
Umidade	0,19	0,52	0,41	0,81	0,05
N:D:	0,03	0,86	0,30	0,93	0,10
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Açúcares da zona de Piracicaba
Análises do Prof. J.R. Almeida

3.2. COLETA DO MATERIAL

Realizamos 16 visitas em datas espaçadas às Usinas da região em cada uma colhemos 5 amostras, perfazendo, conseqüentemente um total de 80 amostras diferentes. No comércio local conseguimos 20 amostras, perfazendo um total de 100. Todos os açúcares colhidos foram da safra de 1955.

Para a coleta das amostras usamos frascos Erlenmeyer de boca larga, com 500 ml de capacidade, fechados com tampão de algodão e esterilizados.

Tiramos o açúcar da parte media dos sacos com uma concha de metal, flambada em uma lâmpada de álcool antes de cada operação. Os frascos tiveram, também, suas bocas flambadas cada vez que o tampão era retirado.

Após a coleta da amostra o vaso foi numerado para sua posterior identificação.

Cada frasco recebeu, em média, 200 g de açúcar, -

quantidade essa suficiente para proporcionar a determinação dos microorganismos, tanto mesofílicos como termofílicos.

As amostras após chegadas ao laboratório foram imediatamente trabalhadas.

3.3. MEIOS DE CULTURA

Ao selecionar um meio de cultura para uma análise microbiológica, a preocupação imediata seria a de se adotar um substrato que possuisse uma composição tal, que proporcionasse o desenvolvimento do maior número de espécies que ocorrem na substância a ser analisada.

No presente trabalho, para efeitos comparativos, - limitamo-nos a usar os substratos recomendados por autoridades no assunto. Tivemos, entretanto, o cuidado de empregar - diversos meios seletivos para cada grupo de microorganismos, procurando assim garantir uma estimativa mais próxima da - real.

3.3.1. MEIOS DE CULTURA PARA A DETERMINAÇÃO DE FUNGOS

Para a determinação dos fungos experimentamos vários meios de cultura.

a) Meio de Kopeloff (Modificado do meio de Czapek)

O meio de Czapek tem sido empregado com resultados satisfatórios com relação a grande variedade de fungos isolados do açúcar. Todavia, a modificação de KOPELOFF, além de conservar suas qualidades originais, proporciona ainda um desenvolvimento mais rápido das colônias (25).

OWEN, em recente trabalho, (35) recomenda o uso deste meio para a determinação dos fungos no açúcar.

Composição do meio de Kopeloff-Czapek.

Açúcar de cana.....	50,00	g
Peptona.....	5,00	g
K ₂ HPO ₄	1,00	g
KCl.....	0,50	g
MgSO ₄	0,25	g
FeSO ₄	0,01	g
NH ₄ NO ₃	1,00	g

Mane...

Ágar..... 20,00 g
Água destilada..... 1.000 ml

b) Meio de Owen (Modificado do meio de Smith)

A vantagem deste substrato, segundo seu autor, (35) é possuir uma alta concentração de açúcar, que limita o desenvolvimento dos fungos, exceto daqueles que determinam a deterioração do açúcar.

Sua composição é a seguinte:-

Açúcar de cana..... 400,00 g
Peptona..... 1,00 g
KCl..... 5,00 g
Na₂HPO₄..... 2,00 g
Ágar..... 20,00 g
Água destilada..... 1.000 ml

c) Meio de Littman

OWEN e BIENVENU (38) recomendam para análises microbiológicas do açúcar o uso do meio de cultura de LITTMAN (29). Esse substrato mostrou ser bastante satisfatório, inibindo por um lado o desenvolvimento de bactérias e leveduras e, por outro, evitando que as colônias de fungos espalhem-se rapidamente por sobre a superfície das placas de Petri, o que dificultaria a contagem. Isto se verifica mesmo quando o número de microorganismos é bastante elevado. A nosso ver, este substrato é o melhor meio de cultura para a determinação dos fungos.

Composição do substrato:-

Dextrose..... 10,00 g
Peptona..... 10,00 g
Oxgall..... 15,00 g
Cristal violeta..... 0,01 g
Ágar..... 20,00 g
Água destilada..... 1.000 ml

Acrescenta-se ainda mais, estreptomicina à razão de 30 unidades para 1 ml de meio de cultura, a qual é colocada nas placas de Petri por ocasião da inoculação.

Mant...

3.3.2. MEIOS DE CULTURA PARA A DETERMINAÇÃO DE BACTÉRIAS

As bactérias que ocorrem normalmente no açúcar são de duas categorias: Mesofílicas e Termofílicas. Para a determinação do número das primeiras, usamos meios de cultura recomendados por OWEN (35), VERONA (Comunicação verbal) e DE WALLEY e SCARR (47). Para as termofílicas seguimos os métodos do "National Canners Association" e, por conseguinte, usamos os substratos por eles recomendados.

3.3.2.1. MEIOS DE CULTURA PARA DETERMINAÇÃO DE BACTÉRIAS MESOFÍLICAS

O único grupo de bactérias mesofílicas que normalmente ocorrem no açúcar são as esporógenas do grupo mesentérico, das espécies formadoras de levânio. Estas espécies, contudo, raramente ocasionam a deterioração do açúcar. A importância de sua determinação se relaciona somente com a eficiência da clarificação e com a quantidade de contaminação existente no ar da usina (35).

d) Meio de Owen (Modificado do meio de Smith)

O melhor substrato para a determinação desse grupo segundo OWEN (35) é o mesmo meio de Smith recomendado para a avaliação dos fungos no qual introduziu-se, apenas, maior concentração em açúcar.

Composição deste meio:-

Açúcar de cana.....	500,00	g
KCl.....	5,00	g
Na ₂ HPO ₄	2,00	g
Peptona.....	1,00	g
Ágar.....	20,00	g
Água destilada.....	1.000	ml

e) Meio de Nutriente-Ágar (Modificado)

Para as contagens do grupo mesofílico, DE WALLEY e SCARR (47) recomendam o uso do meio de nutriente-ágar previamente fortificado com a adição de 1% de dextrose.

Extrato de carne.....	3,00	g
Peptona.....	5,00	g
Dextrose.....	10,00	g
Ágar.....	15,00	g

Monteiro / 17

Água destilada.....	1.000 ml
pH.....	6,8

c) Meio de Feijão branco.

Usamos para a determinação de bactérias, por sugestão verbal de VERONA, o meio de Feijão branco (Phaseolus lunatus L.), por ser um bom substrato para essa finalidade.

Este meio é preparado como se segue:

Juntamos 200 g de feijão branco com 1.000 ml de água destilada e fervemos por 20 minutos. Completamos, a seguir, o volume do líquido fervido, a 1.000 ml.

A esse líquido do qual é separado o feijão, adicionamos:-

Sacarose.....	20,00 g
Água de levedura.....	10,00 ml
Ágar.....	20,00 g

3.3.2.2. MEIOS DE CULTURA PARA DETERMINAÇÃO DAS BACTÉRIAS TERMOFÍLICAS

Para a determinação das bactérias termofílicas, - como já tivemos oportunidade de referir, lançamos mão dos - substratos recomendados pelos métodos oficiais do "National Canners Association" (43).

g) Meio de dextrose-triptona-ágar.

Substrato usado para a determinação de bactérias termofílicas aeróbias formadoras de ácido.

Composição:-

Triptona.....	10,00 g
Dextrose.....	5,00 g
Púrpura de bromo cresol.....	0,04 g
Ágar.....	15,00 g
Água destilada.....	1.000 ml

h) Meio de Fígado

Para a avaliação das bactérias termofílicas anaeróbias formadoras de gás.

Composição do meio:-

M. Menéndez

Fígado..... 500,00 g
Água destilada..... 1.000 ml

Moemos o fígado e fervemos durante 1 hora em fogo lento, ajustamos a reação a pH igual a 7,0.

Fervemos mais 10 minutos. Filtramos em pano ralo e completamos o volume a 1.000 ml com água destilada.

Adicionamos a esse caldo:-

Peptona..... 10,00 g
 K_2HPO_4 1,00 g

Reajustamos o pH a 7,0

Ao distribuírmos em tubos agregamos previamente, fígado moído a razão de mais ou menos 1 cm de altura no tubo de cultura.

1) Meio de Agar-sulfito (Modificado)

Meio usado para a determinação de bactérias termo-fílicas anaeróbias produtoras de H_2S .

Composição:-

Triptona..... 10,00 g
 Na_2SO_3 1,00 g
Ágar..... 20,00 g
Água destilada..... 1.000 ml

Ao colocarmos o meio de cultura nos tubos acrescentamos, antes, um prego de ferro enérgicamente lavado em ácido clorídrico.

3.3.3. MEIOS DE CULTURA PARA A DETERMINAÇÃO DE LEVEDURAS

Para a determinação das leveduras do açúcar alguns dos substratos recomendados são os seguintes:-

j) Meio "Osmophilic Yeast"

DE WALLEY e SCARR (46) recomendam o uso deste meio especial para o isolamento das espécies de leveduras que ocorrem no açúcar e, portanto, tendo capacidade de se desenvolver em soluções de sacarose de alta concentração. Este meio possui, também, a particularidade valiosa de retardar o desenvolvimento dos fungos.

M. A. A. A. A.

Sua composição á seguinte:-

Extrato de malte sêco.....	15,00	g
Peptona.....	0,78	g
Dextrina.....	2,67	g
Glicerina.....	2,37	g
NH ₄ Cl.....	1,00	g
Ágar.....	15,00	g
Xarope com 45 Brix, contendo 8 a 10% de açúcar invertido.	1.000	ml
pH.....	4,7	

k) Meio de malte (Modificado)

O meio de malte geralmente usado para a estimação de leveduras em produtos de leite, alimentos, etc. não é recomendado para êste nosso trabalho. É que nele se desenvolvem tanto leveduras como bactérias, tornando-se difícil uma contagem bem feita (35).

Justamente por isso preferimos usar uma modificação do meio de ágar-malte, recomendado verbalmente por EL - TABEY.

Composição do meio:-

Malte moido.....	250,00	g
Ágar.....	20,00	g
Água destilada.....	1.000	ml
Sacarose.....	50,00	g
Ácido propiónico.....	0,1	%
Graus Balling.....	5,0	
pH.....	4,7	

l) Meio fungistático de Hertz e Levine.

Para a contagem de leveduras quando estas existem juntamente com fungos e bactérias em alimentos ou bebidas, HERTZ e LEVINE (21) aconselham o uso de um meio especial preparado para êsse fim.

O meio tem a seguinte composição:-

Extrato de malte.....	20,00	g
Peptona.....	1,00	g
NH ₄ Cl.....	1,00	g

M. Martins

K_2HPO_4 1,00 g
Ágar..... 20,00 g
Água destilada..... 1.000 ml
Ácido láctico para ajustar o
pH a 4,5 - 4,7.

Adicionar Difetil à razão de 100 p.p.m. do meio.

3.4. MÉTODOS

Os microorganismos podem ser estimados quantitativamente sob dois aspectos: vivos e mortos ou somente vivos. No primeiro caso teríamos uma contagem total e no segundo - uma contagem apenas dos vivos. Ambos os casos comportam diversos métodos de análise quantitativa, e sua escolha irá depender da finalidade e natureza da mesma.

Os métodos de contagem total são inúmeros, como:- contagem microscópica direta (15) (48), método de - - WRIGHT (48), observações microscópicas em câmaras de contagem (48), método de opacidade (48), método de centri-fugação (48) etc.

Igualmente, os métodos de contagens dos microorganismos vivos podem ser resumidos em:- método de diluição -- (48), método das placas de contagem (48) e método de redução do azul de metileno (35).

3.4.1. MÉTODOS USADOS

3.4.1.1. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS MICROORGANISMOS MESOFÍLICOS

Do exame dos métodos de determinação quantitativa usados em Microbiologia, verificamos prontamente que, para o nosso trabalho, teríamos que optar para um dos métodos de contagem de microorganismos vivos. Esta escolha não só é feita devido a fragilidade dos outros métodos, como também, porque somente os organismos vivos podem causar a deterioração do açúcar.

A escolha recairia, portanto, entre os métodos de redução do azul de metileno, diluição, placas de contagem e contagem microscópica direta. Este último, embora esteja situado entre os métodos de contagem total, permite estabelecer uma diferença entre organismos vivos e mortos pela colo

ração que adquirem em presença de determinados corantes.

Contudo, dos métodos citados somente o das placas de contagem e o exame microscópico direto são usados no controle bacteriológico do açúcar e, destes, somente o primeiro poderá ser usado em todos os estágios de fabricação (34).

O método de redução do azul de metileno foi dispensado porque, embora seja satisfatório para a enumeração das bactérias do caldo de cana, tal não acontece com as determinações microbiológicas quando procedidas com o açúcar. Isto porque, neste último, existe uma concentração microbiana muito mais baixa (35). Mesmo que possível, o uso deste método, só se limitaria à estimativa de bactérias do açúcar.

O método usado foi, portanto, o das placas de contagem. Com o seu emprego tivemos as placas onde os fungos, bactérias e leveduras que se desenvolveram durante a incubação formaram as colônias que puderam ser facilmente vistas e contadas.

Usando-se este método pudemos, ainda, aplicar o teste da Máxima Verossimilhança (24) adaptado ao presente trabalho por PIMENTEL GOMES. Ele nos permitiu avaliar o número de microorganismos de uma maneira mais precisa, ao contrário, do que acontece com as simples multiplicações do número de colônias pela recíproca das diluições.

O método das placas de contagem é baseado no princípio da diluição em série. Diminuindo o número dos microorganismos permite que eles se desenvolvam em um meio sólido de modo que, cada célula se transforme em uma colônia e o número destas represente o conteúdo microbiano presente.

O método usado compreende as seguintes fases:-

- a) Preparação e esterilização do meio de cultura conveniente;
- b) Esterilização de volumes de água em recipientes adequados;
- c) Esterilização de placas de Petri e pipetas;
- d) Pesagens e diluições assépticas do material a ser examinado;
- e) Transferência ou inoculação do material nas placas;
- f) Incubação das placas;
- g) Enumeração das colônias;
- h) Cálculo do número de microorganismos.

a) Preparação e esterilização do meio de cultura conveniente.

Para a preparação e esterilização dos meios de cultura, seguimos as práticas usuais de Microbiologia.

b) Esterilização de volumes de água em recipientes adequados.

Nesta fase preparamos os frascos de Erlenmeyer e os tubos de cultura com as quantidades de água destilada necessárias às diluições.

Os frascos usados foram de 250 ml de capacidade contendo 100 ml de água destilada (35). Em um vaso dessa capacidade pudemos introduzir 10 g de açúcar sem risco de molhar o tampão de algodão, o que seria contra-indicado pela técnica.

Os outros volumes de água foram medidos com pipetas, a razão de 9 ml para cada tubo de cultura, e esterilizados.

As esterilizações foram executadas em autoclave a 1 atmosfera durante 20 minutos.

c) Esterilização das placas de Petri e pipetas.

Esta operação também foi executada da maneira comum em Microbiologia.

d) Pesagens e diluições assépticas do material a ser examinado.

As amostras de açúcar trazidas para o laboratório em frascos de Erlenmeyer fechados com tampão de algodão, foram transferidas para os frascos contendo a água para diluição, à razão de 10 g para cada amostra. O açúcar foi pesado diretamente dentro do recipiente contendo os 100 ml de água esterilizada (35). Com movimentos enérgicos de rotação as bactérias e outros microorganismos foram postos em suspensão.

Neste caso a diluição inicial foi de 1:10. Dela retiramos assépticamente com uma pipeta, 1 ml introduzindo-o em um tubo de cultura contendo 9 ml de água estéril. Esta segunda diluição é da ordem de 1:100. A seguir repetimos, de modo idêntico, a mesma operação, conseguindo outra diluição, de 1:1.000.

M. Martins

Essas três diluições foram suficientes para nosso trabalho.

e) Transferência ou inoculação do material nas placas.

A inoculação foi executada da maneira usual em Microbiologia, usando-se nesta operação, grupos de três placas, uma para cada diluição.

f) Incubação das placas de Petri.

As placas de Petri foram incubadas por um período de 48-72 horas, a temperatura constante de 32°C (35).

g) Contagem das colônias.

Foram nesta fase procedidas as contagens das colônias que se desenvolveram nas placas durante o período de incubação.

Para facilitar esta operação usamos as placas de Wolphugel quando o número de colônias era bastante grande. Entretanto, quando as placas apresentavam número reduzido das mesmas, procedemos a enumeração, somente com auxílio do lápis dermatográfico, para facilitar as marcações.

h) Cálculo do número de microorganismos.

Os números de colônias das três placas (uma para cada diluição) nos forneceram dados para calcularmos o número de microorganismos por grama de açúcar.

Esse resultado final foi calculado com o uso da fórmula de "Maxima verosimilhança" (24).

$$n = \frac{p + q + r}{1 + \frac{1}{10} + \frac{1}{100}} \quad (I)$$

na qual:-

p = número de colônias na 1ª placa;

q = número de colônias na 2ª placa;

r = número de colônias na 3ª placa.

O número de microorganismos por grama de açúcar é igual a n (I) multiplicado pela menor diluição (1:10), ou seja:-

$$\text{Número de microorganismos} = n(I) \times 10.$$

Mantini

3.4.1.2. MÉTODOS PARA A DETERMINAÇÃO DOS MICROORGANISMOS TERMOFÍLICOS

De acôrdo com CAMERON (8) os grupos de bactérias mais importantes que se encontram na flora microbiana do áçúcar são:-

- 1º) Bactérias termofílicas aeróbias formadoras de ácido;
- 2º) Bactérias termofílicas anaeróbias formadoras de H_2S ;
- 3º) Bactérias termofílicas anaeróbias formadoras de gás.

O primeiro grupo de bactérias caracteriza-se por formar acidez nos alimentos enlatados, principalmente nos doces; ao segundo grupo pertencem as bactérias que formam gás sulfídrico e, em consequência, alterações dos produtos; no terceiro estão incluídas as bactérias formadoras de gás, principalmente gás carbônico e hidrogênio.

Para a determinação desses grupos de bactérias seguimos os métodos preconizados pelo "National Canners Association" (43) cujos detalhes damos a seguir.

3.4.1.2.1. AMOSTRAGEM

As amostras dos açúcares utilizadas foram as mesmas empregadas para a determinação dos microorganismos mesofílicos, conforme se vê no item 3.2. COLETA DO MATERIAL.

3.4.1.2.2. TRATAMENTO DA AMOSTRA

Em um frasco de Erlenmeyer de 250 ml de capacidade, marcado para um volume de 100 ml, colocamos 20 g da amostra. Agregamos, a seguir, água esterilizada até a marca do volume indicado. Agitamos bem, e fervemos durante 5 minutos. Esfriamos o frasco na água da torneira. Recolocamos a água perdida na evaporação, até ao volume primitivo.

3.4.1.2.3. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS TERMOFÍLICAS AERÓBIAS FORMADORAS DE ÁCIDO.

A amostra preparada segundo já se referiu foi agitada e introduzida à razão de 2 ml em cada uma de 5 placas de Petri. Agregamos o meio de Dextrose-Triptona-Ágar, mistu

M. L. ...

ramos e incubamos a 55°C durante 48 horas. Para evitar que o substrato secasse, foi necessário umidecer o interior da estufa incubadora, mantendo-se em seu interior um ambiente úmido.

As colônias das bactérias formadoras de ácido são características. Elas são redondas, medem 2-5 mm de diâmetro apresentam uma mancha opaca no centro e são circundadas por um halo dentro de um campo púrpura. Esse halo pode ser insignificante, ou deixar de existir, quando as bactérias presentes são fracas produtoras de ácido.

A soma das colônias que aparecem nas cinco placas de Petri multiplicada por cinco nos deu o número de esporos que se encontram em 10 g de açúcar da amostra examinada.

3.4.1.2.4. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS TERMOFÍLICAS QUE PRODUZEM H₂S.

Dividimos 20 ml da solução fervida de açúcar em 6 tubos (3,3 ml, aproximadamente, para cada tubo) de cultura contendo Ágar-Sulfito. Misturamos bem o inóculo com o meio e, incubamos a 55°C por 72 horas.

A presença destas bactérias se manifestou pela produção de áreas escuras ao redor do prego contido no tubo, ou apenas por um enegrecimento do mesmo.

3.4.1.2.5. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS TERMOFÍLICAS ANAERÓBIAS QUE PRODUZEM GÁS.

Utilizando o mesmo material anterior, distribuímos 20 ml da solução da amostra em 6 tubos de cultura com o meio de fígado e, em seguida, colocamos ágar comum fundido sobre esse meio, com a finalidade de formar um tampão. Incubamos os tubos por 72 horas a 55°C.

A presença de esporos de bactérias termofílicas autógenas na amostra foi verificada pela separação do tampão de ágar do nível do líquido de cultura e por uma acidificação no substrato.

4. RESULTADOS OBTIDOS

4.1. RESULTADOS DAS ANÁLISES PARA AS DETERMINAÇÕES DOS MICROORGANISMOS MESOFÍLICOS

Os resultados das análises dos açúcares cristal, - refinado, demerara e batido, para a determinação dos microorganismos mesofílicos, são dados nas tabelas I, II, III e IV respectivamente.

Os resultados estão expressos em número de microorganismos por grama de açúcar. Cada tabela traz os números de microorganismos e os meios de cultura empregados para de terminá-los.

As amostras são independentes uma da outra. Contudo, foram retiradas cinco de cada vez de uma mesma fonte de origem, usina, depósito da usina, ou casa comercial.

TABELA I. NÚMERO DE MICROORGANISMOS EXISTENTES POR GRAMA DE AÇÚCAR CRISTAL.

Nº	MEIO KOPELOFF	MEIO LITTMAN	MEIO NUTRIENTE ÁGAR	MEIO OSMOPHILIC YEAST	MEIO HERTZ e LEVINE
	FUNGOS	FUNGOS	BACTÉRIAS	LEVEDURAS	LEVEDURAS
1	27	10	99	0	0
2	18	10	0	0	0
3	27	0	0	0	0
4	27	18	10	0	0
5	27	10	18	0	10
6	117	36	63	0	0
7	27	45	117	0	0
8	54	45	63	0	0
9	72	54	54	0	0
10	72	36	99	0	0
11	135	80	117	0	0
12	80	27	45	0	0

Alonso...

Nº	MEIO KOPELOFF	MEIO LITTMAN	MEIO NUTRIENTE ÁGAR	MEIO OSMOPHILIC YEAST	MEIO HERTZ e LEVINE
	FUNGOS	FUNGOS	BACTERIAS	LEVEDURAS	LEVEDURAS
13	144	127	36	84	0
14	108	117	80	0	0
15	27	36	27	0	0
16	27	36	27	0	0
17	0	0	0	0	0
18	27	90	18	0	0
19	10	18	63	0	0
20	18	45	54	0	0
21	45	54	54	0	0
22	36	18	45	0	0
23	45	54	144	0	0
24	90	27	45	0	0
25	54	72	10	0	0
26	459	1063	0	0	0
27	468	1187	189	0	0
28	315	1297	0	0	0
29	549	738	0	0	0
30	189	189	45	0	0
31	117	126	45	0	0
32	90	99	63	0	0
33	117	144	72	0	0
34	144	153	54	0	0
35	126	99	36	0	0

TABELA II. NÚMERO DE MICROORGANISMOS EXISTENTES POR GRAMA DE AÇÚCAR REFINADO.

Nº	MEIO KOPELOFF	MEIO LITTMAN	MEIO NUTRIENTE ÁGAR	MEIO OSMOPHILIC YEAST	MEIO HERTZ LEVINE
	FUNGOS	FUNGOS	BACTÉRIAS	LEVEDURAS	LEVEDURAS
1	53	63	657	0	0
2	18	18	801	0	135
3	10	0	1081	0	90
4	45	53	576	0	36
5	18	10	567	0	99
6	54	90	378	0	36
7	27	54	414	0	81
8	27	45	666	0	72
9	27	81	333	0	18
10	45	10	324	0	72
11	45	45	117	0	0
12	36	189	27	0	0
13	117	180	18	0	0
14	126	180	99	0	0
15	126	100	36	0	0
16	126	243	18	0	0
17	252	180	36	0	0
18	45	144	0	0	0
19	45	234	27	0	0
20	210	270	36	0	0
21	153	144	27	0	0
22	279	135	27	0	0
23	90	243	18	0	0
24	153	207	18	0	0
25	189	197	36	0	0

Alvarez 1977

Nº	MEIO KOPELOFF	MEIO LITTMAN	MEIO NUTRIENTE ÁGAR	MEIO OSMOPHILIC YEAST	MEIO HERTZ e LEVINE
	FUNGOS	FUNGOS	BACTÉRIAS	LEVEDURAS	LEVEDURAS
26	108	72	36	0	0
27	36	27	0	0	0
28	54	108	0	0	0
29	108	144	0	0	0
30	162	117	10	0	0
31	90	72	10	0	0
32	153	90	18	0	0
33	18	0	10	0	0
34	90	36	0	0	0
35	90	72	450	0	0

TABELA III. NÚMERO DE MICROORGANISMOS EXISTENTES POR GRAMA DE AÇÚCAR DEMERARA.

Nº	MEIO KOPELOFF	MEIO LITTMAN	MEIO NUTRIENTE ÁGAR	MEIO OSMOPHILIC YEAST	MEIO HERTZ e LEVINE
	FUNGOS	FUNGOS	BACTÉRIAS	LEVEDURAS	LEVEDURAS
1	90	54	90	0	0
2	90	189	45	0	0
3	81	144	54	0	0
4	54	90	63	0	0
5	81	45	54	0	0
6	207	144	99	0	0
7	180	162	108	0	0
8	171	117	99	0	0

Marcelino

Nº	MEIO KOPELOFF	MEIO LITTMAN	MEIO NUTRIENTE ÁGAR	MEIO OSMOPHILIC YEAST	MEIO HERTZ e LEVINE
	FUNGOS	FUNGOS	BACTÉRIAS	LEVEDURAS	LEVEDURAS
9	189	162	63	0	0
10	180	135	144	0	0
11	162	144	90	0	0
12	135	144	99	0	0
13	153	180	72	0	0
14	278	278	45	0	0
15	185	207	81	0	0

TABELA IV. NÚMERO DE MICROORGANISMOS EXISTENTES POR GRAMA DE AÇÚCAR BATIDO.

Nº	MEIO KOPELOFF	MEIO LITTMAN	MEIO NUTRIENTE ÁGAR	MEIO OSMOPHILIC YEAST	MEIO HERTZ e LEVINE
	FUNGOS	FUNGOS	BACTÉRIAS	LEVEDURAS	LEVEDURAS
1	2008	2387	459	0	27
2	1486	846	162	0	99
3	891	1288	288	0	90
4	1792	1393	99	0	81
5	1936	1363	180	0	54
6	1162	1405	504	0	0
7	1297	1003	720	0	0
8	567	1405	261	0	0
9	540	657	216	0	0
10	747	387	501	0	0

Martins

Nº	MEIO KOPELOFF	MEIO LITTMAN	MEIO NUTRIENTE ÁGAR	MEIO OSMOPHILIC YEAST	MEIO HERTZ e LEVINE
	FUNGOS	FUNGOS	BACTÉRIAS	LEVEDURAS	LEVEDURAS
11	1531	1333	360	0	0
12	1018	1585	396	0	0
13	648	1360	567	0	0
14	882	1639	189	0	0
15	1171	1360	531	0	0

4.2. RESULTADOS DAS ANÁLISES PARA AS DETERMINAÇÕES DOS MICROORGANISMOS TERMOFÍLICOS.

Nas tabelas V, VI, VII damos os resultados das análises em açúcares cristais, refinado, demerara e batido, - concernentes à avaliação das bactérias termofílicas.

As bactérias termofílicas aeróbias formadoras de ácido estão expressa pelo número de esporos contido em 10 g de açúcar.

Com relação às bactérias termofílicas anaeróbias - formadoras de gás, e anaeróbias formadoras de H₂S, estão apenas assinaladas a sua presença ou ausência.

As amostras neste caso também, são independentes, - embora cada grupo de cinco pertençam a uma mesma fonte e, - tenham sido colhidas na mesma ocasião.

Martins

TABELA V. ANÁLISES REALIZADAS EM AÇÚCAR CRISTAL. AS BACTÉRIAS FORMADORAS DE ÁCIDO ESTÃO EXPRESSAS EM Nº DE ESPOROS POR 10 g DE AÇÚCAR. AS DEMAIS, APENAS ASSINALADAS A SUA PRESENÇA OU AUSÊNCIA.

N Ú M E R O	QUANTIDADE DE BACTÉRIAS AERÓBIAS FORMADORAS DE ÁCIDO	BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE GÁS	BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE H ₂ S	N Ú M E R O	QUANTIDADE DE BACTÉRIAS AERÓBIAS FORMADORAS DE ÁCIDO	BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE GÁS	BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE H ₂ S
1	85	3+	-	19	25	4+	3+
2	25	1+	-	20	15	3+	-
3	20	3+	2+	21	10	3+	2+
4	25	2+	-	22	45	4+	+
5	60	4+	-	23	15	2+	3+
6	345	3+	-	24	5	3+	3+
7	120	2+	-	25	65	-	-
8	65	3+	-	26	25	1+	1+
9	135	4+	1+	27	20	3+	1+
10	55	5+	-	28	0	-	-
11	45	4+	-	29	15	-	-
12	70	5+	2+	30	0	1+	-
13	70	3+	-	31	55	5+	1+
14	45	5+	-	32	90	3+	2+
15	25	3+	2+	33	95	3+	1+
16	110	4+	1+	34	55	2+	1+
17	25	3+	2+	35	15	1+	2+
18	10	5+	2+				

M. Antunes

TABELA VI. ANÁLISES REALIZADAS EM AÇÚCAR REFINADO. AS BACTÉRIAS FORMADORAS DE ÁCIDO ESTÃO EXPRESSAS EM NÚMERO DE ESPOROS POR 10 g DE AÇÚCAR. AS DEMAIS, APENAS ESTÃO ASSINALADAS A SUA PRESENÇA OU AUSÊNCIA.

NÚMERO	QUANTIDADE DE BACTÉRIAS AERÓBIAS FORMADORAS DE ÁCIDO	BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE GÁS		NÚMERO	QUANTIDADE DE BACTÉRIAS AERÓBIAS FORMADORAS DE ÁCIDO	BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE GÁS	
		BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE GÁS	BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE H ₂ S			BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE GÁS	BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE H ₂ S
1	35	3+	-	19	20	1+	1+
2	35	2+	-	20	30	-	-
3	0	1+	-	21	35	-	3+
4	10	3+	-	22	40	2+	2+
5	25	3+	-	23	60	1+	3+
6	75	3+	1+	24	30	2+	1+
7	15	2+	-	25	40	4+	-
8	10	2+	1+	26	15	2+	1+
9	30	4+	-	27	30	1+	1+
10	45	4+	2+	28	50	3+	-
11	20	3+	1+	29	45	3+	-
12	5	4+	2+	30	25	-	-
13	0	3+	-	31	20	2+	1+
14	10	2+	2+	32	135	-	4+
15	95	2+	4+	33	70	1+	-
16	55	2+	1+	34	45	-	2+
17	15	1+	-	35	10	3+	2+
18	0	-	-				

M. Castineh 1/99

TABELA VIII. ANÁLISES REALIZADAS EM AÇÚCAR DEMERARA (ESQUERDA DA TABELA) E BATIDO (DIREITA DA TABELA). AS BACTÉRIAS FORMADORAS DE ÁCIDO ESTÃO EXPRESSAS EM NÚMERO DE ESPOROS POR 10 g DE AÇÚCAR. AS DEMAIS, APENAS ESTÃO ASSINALADAS A SUA PRESENÇA OU AUSÊNCIA.

NÚMERO	QUANTIDADE DE BACTÉRIAS AERÓBIAS FORMADORAS DE ÁCIDO	BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE GÁS	BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE H ₂ S	NÚMERO	QUANTIDADE DE BACTÉRIAS AERÓBIAS FORMADORAS DE ÁCIDO	BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE GÁS	BACTÉRIAS ANAERÓBIAS FORMADORAS DE H ₂ S
1	190	4+	1+	1	210	6+	3+
2	175	4+	2+	2	330	4+	4+
3	330	4+	2+	3	205	-	2+
4	215	5+	4+	4	200	5+	-
5	225	4+	4+	5	175	3+	-
6	225	4+	-	6	195	3+	-
7	140	4+	2+	7	210	4+	2+
8	290	3+	3+	8	160	-	2+
9	150	4+	1+	9	290	3+	1+
10	115	4+	-	10	225	3+	3+
11	230	3+	1+	11	245	3+	2+
12	155	-	1+	12	125	3+	-
13	135	-	-	13	170	-	3+
14	165	3+	2+	14	290	3+	2+
15	130	-	2+	15	255	5+	3+

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. DISCUSSÃO DOS MEIOS DE CULTURA

Ao iniciarmos a discussão dos resultados dêste trabalho temos que nos referir sôbre a ausência de certos meios de cultura nas tabelas de resultados das análises para avaliação dos organismos mesofílicos que aparecem no açúcar.

Usamos inicialmente em nosso trabalho três meio de cultura para cada grupo de microorganismos. Contudo, no decorrer do mesmo, fomos obrigados a abandonar o uso de alguns dêles. A pouca seletividade do meio de Owen recomendado para o isolamento de bactérias, fez com que deixássemos de emprega-lo. Nêsse substrato desenvolveram tanto fungos como bactérias e, em muitos casos mesmos, aqueles foram superiores em número.

Os demais, meio de Owen (para fungos), meio de Feijão branco, e meio de malte foram postos de lado por apresentarem reduzido número de colônias, quantidades essas inferiores às apresentadas pelos substratos empregados com a mesma finalidade.

Os meios com os quais continuamos trabalhando apresentaram-se satisfatórios. Entretanto, especial referência fazemos ao meio de Littmann, empregado primeiramente por OWEN e BIENVENU para o estudo dos fungos do açúcar. Êsse meio mostrou ser realmente um ótimo substrato para o isolamento dos fungos. Comparando-se êsse meio com o de KOPELOFF, verificamos pelo estudo das tabelas I, II, III e IV que os números das colônias apresentadas ora por um, ora por outro, são mais ou menos equivalentes. Contudo, nas placas onde empregamos o meio de Littmann as colônias não se espalharam pela superfície das placas. Isso permitiu fácil contagem mesmo quando o número de microorganismos foi grande como no caso do açúcar batido. Notamos ainda nas placas onde êsse meio foi empregado a absoluta ausência de bactérias, inibidas pela ação da estreptomicina.

5.2. DISCUSSÃO RELACIONADA AOS MICROORGANISMOS MESOFÍLICOS

Com relação aos números de microorganismos nos diversos açúcares verificamos o seguinte:-

Como era de se esperar, dadas as condições de fabri

M. Antunes

cação, o açúcar batido apresentou-se com maior número de microorganismos (fungos e bactérias). As médias de 15 amostras desse açúcar foram as seguintes:-

Meio de Kopeloff.....	505 fungos por grama
Meio de Littman.....	554 " " "
Meio de Nutriente-ágar.....	155 bactérias p/ "
Meio Osmophilic yeast.....	0 leveduras p/ "
Meio Hertz e Levine.....	10 " p/ "

Em segundo, por ordem de contaminação devemos colocar o açúcar cristal. Dos açúcares de consumo direto, o açúcar cristal apresentou-se como mais contaminado.

Os dados que se seguem são números médios das 35 amostras de açúcar cristal:-

Meio de Kopeloff.....	111 fungos por grama
Meio de Littman.....	176 " " "
Meio de Nutriente-ágar.....	52 bactérias p/ "
Meio Osmophilic yeast.....	3 leveduras p/ "
Meio Hertz e Levine.....	1 levedura p/ "

O açúcar refinado apresentou uma contaminação menor do que os açúcares batido e cristal no que concerne a presença de fungos. Contudo, constatamos existir neste açúcar uma quantidade de bactérias maior que a apresentada nos outros dois açúcares.

A média de 35 amostras de açúcar refinado nos deu os seguintes resultados:-

Meio de Kopeloff.....	92 fungos por grama
Meio de Littman.....	104 " " "
Meio de Nutriente-ágar.....	196 bactérias p/ "
Meio Osmophilic yeast.....	0 leveduras p/ "
Meio Hertz e Levine.....	18 " p/ "

Finalmente, ainda por grau de contaminação, situamos em último lugar, e de modo surpreendente, o açúcar demerara, que apesar de não ser um açúcar de consumo direto apresentou-se com número de organismos menores do que os demais açúcares.

Os dados abaixo são médias de 15 amostras de açúcar demerara:-

M. Mantovani

Meio de Kopeloff.....	63	fungos	por grama
Meio de Littman.....	62	"	" "
Meio de Nutriente-ágar.....	80	bactérias	p/ "
Meio Osmophilic yeast.....	0	leveduras	p/ "
Meio Hertz e Levine.....	0	"	p/ "

A explicação daquele fato a nosso ver reside na seguinte:- O açúcar demerara fabricado em nossas usinas recebem nas turbinas apenas lavagem de vapor. Ao contrário, os açúcares cristal e refinado, além, da lavagem em vapor - recebem uma lavagem de água, e pensamos, então, que a fonte de contaminação esta, justamente, nessa água. Ela carrega para o açúcar cristal e refinado um número maior de microorganismos.

Embora não tivéssemos a oportunidade de fazer uma análise bacteriológica das águas usadas nas usinas, o que não resta a menor dúvida é que, na sua maioria é de péssima qualidade, quasi sempre de retôrno. Ano após ano a água disponível nas usinas diminui em quantidade e piora em qualidade.

As leveduras nos diversos tipos de açúcares sempre estiveram presentes em número reduzido.

Os padrões de OWEN e MOBLEY (37) para microorganismos mesofílicos no açúcar são os seguintes:-

1 - Presença de fungos no açúcar

- a) As amostras não deverão conter uma infecção de fungos superior a 20%.
- b) O número de esporos de fungos não deverá exceder a 10 por grama de açúcar.

2 - PRESENÇA DE BACTÉRIAS MESOFÍLICAS

- c) O número de bactérias mesofílicas presentes não deverá ser superior a 50 por grama
- d) Açúcares contendo até 100 bactérias poderão ser aceitos (tolerados) porém, não são desejáveis.
- e) Açúcares contendo mais de 100 bactérias por grama não deverão ser aceitos.

3 - PRESENÇA DE LEVEDURAS NO AÇÚCAR

- f) As amostras não deverão conter mais de 20% de leveduras.
- g) O máximo de leveduras toleradas é de 50 - por grama.

M. S. S. S.

A vista desses padrões, relacionados aos diversos tipos de açúcar por nós estudados verificamos o seguinte:-

Com relação ao açúcar batido ele é aprovado por aqueles limites somente no que concerne às leveduras presentes. As quantidades de fungos e bactérias foram superiores aos mínimos exigidos.

Individualmente, verificamos pelo estudo da tabela IV, que nenhuma amostra examinada poderá ser aprovada pelos limites estabelecidos.

O açúcar cristal (Tabela I), que depois do açúcar batido foi o de maior concentração microbiana, também não consegue aprovação, isto porque somente uma das amostras examinadas (Nº 17 da Tabela I) apresentou-se estéril. As demais, contudo, apresentaram quantidades superiores às exigidas.

A mesma sorte teve também o açúcar refinado (Tabela II), que embora apresentando números mais baixos de microorganismos do que os outros tipos de açúcar, ainda são maiores que os números estabelecidos pelos padrões.

Resta finalmente eliminar pelos mesmos motivos já debatidos, o açúcar demerara.

Podemos verificar, contudo, que a maioria dos açúcares analisados apresentam uma quantidade de leveduras aceitável, mas como elas estão acompanhadas de fungos e bactérias em número excessivo, de nada serve para a aprovação dos diversos tipos de açúcar.

Embora não nos tenhamos preocupado com uma análise qualitativa do açúcar (35) pudemos, entretanto, correlacionar os gêneros de fungos presentes. Assim é que verificamos que 50% dos fungos encontrados pertencem ao gênero Aspergillus, 40% do gênero Penicillium e, os 10% restantes distribuídos entre os gêneros Mucor, Rhizopus e Neurospora.

Quanto às bactérias e as leveduras presentes nas amostras, não determinamos a sua taxionomia.

5.3. DISCUSSÃO RELACIONADA AOS MICROORGANISMOS TERMOFÍLICOS.

Os padrões para bactérias termofílicas, do "National Canners Association" (16) para o açúcar são os seguintes:-

Martins

- 1 - Bactérias aeróbias produtoras de ácido.
Para 5 amostras examinadas.
 - a) Poderá haver no máximo até 75 esporos, e
 - b) Uma média de não mais de 50 esporos por 10 gramas de açúcar.

- 2 - Bactérias anaeróbias produtoras de gás.
Para cada 5 amostras examinadas.
 - c) Elas não deverão estar presentes em mais de três das 5 amostras examinadas.
 - d) Em qualquer uma das amostras não deverá haver mais do que 4 tubos positivos, dos 6 examinados.

- 3 - Bactérias anaeróbias produtoras de H₂S.
Em 5 amostras examinadas.
 - e) Não deverão estar presentes em mais do que 2 das 5 amostras.
 - f) Em qualquer uma das amostras não mais do que 2 entre os 6 tubos.

De acordo com os padrões acima, podemos considerar as amostras de açúcar, estudadas com relação as bactérias termofílicas da seguinte maneira:-

Considerando inicialmente o açúcar cristal Tabela V verificaremos que individualmente diversas das amostras estão perfeitamente enquadradas dentro dos limites padrões. Encontrando até mesmo, uma amostra estéril com relação às bactérias termofílicas (amostra nº 28, Tabela V). Entretanto, como temos que considerar 5 amostras de um mesmo lote, notamos que somente o lote nº 6 (amostras nºs 26 a 30 da Tabela V) poderá ser aprovado, uma vez que os números apresentados pelas análises dos 3 grupos de bactérias termofílicas satisfazem os padrões.

A seguir, estudando a Tabela VI, encontramos os dados referentes as análises microbiológicas do açúcar refinado. Constatamos uma situação idêntica ao caso anterior, onde encontramos diversos açúcares que individualmente poderão ser recomendados pelo "National Cannery Association", mas que tal fato não se verifica quando considerados formando lotes de 5 amostras.

Aqui neste tipo de açúcar encontramos também, um lote apenas, dentro dos padrões. Trata-se do lote nº 4 (a-

Monteiro

mostras de nºs 16 a 20 da Tabela VI).

Finalmente, analisando a Tabela VII, onde estão inseridos os resultados das pesquisas das bactérias termofílicas procedidas nos açúcares demerara (esquerda da tabela) e batido (direita da tabela), vamos verificar um índice bastante elevado das referidas bactérias. Tôdas as amostras, quer sejam consideradas por lotes, quer individualmente, estão condenadas segundo os padrões oficiais do "National Canners Association".

O quadro abaixo representa os dados correspondentes as percentagens de cada um dos grupos de bactérias termofílicas contidas no conjunto das 100 amostras estudadas.

TABELA VIII - PERCENTAGEM DE AMOSTRAS CONTAMINADAS COM OS 3 GRUPOS DE BACTÉRIAS TERMOFÍLICAS, EM 10 G DE MATERIAL.

NÃO CONTAMINADAS	AERÓBIOS				ANAERÓBIOS				
	NÃO CONTEM	CONTEM			NÃO CONTEM	Somente formado de H ₂ S	Formado de H ₂ S e gás	Formado de gás	Somente formado de gás
		DE 1 a 20	DE 21 a 50	MAIS DE 50					
2	4	20	23	51	7	8	53	32	
		94							

Como podemos observar, de um exame do quadro acima, apenas 2% das amostras analisadas não estavam contaminadas com nenhum dos componentes dos grupos de bactérias termofílicas; 4% das mesmas não contém esporos de bactérias aeróbias formadoras de ácido, e 7% não estavam contaminadas com bactérias termofílicas anaeróbias.

Verificamos, ainda, que 94% das amostras estavam contaminadas com as bactérias aeróbias formadoras de ácido, na seguinte proporção:- 20% continham de 1 a 20 esporos; - 23% continham de 21 a 50 esporos; e 51% continham mais de 50 esporos, em 10 gramas de açúcar das amostras analisadas.

Dos açúcares contaminados com bactérias termofíli

Monteiro

cas anaeróbias, apenas 8% formam unicamente H_2S e 32 % somente gás; 53% das amostras formaram ambos os produtos.

Finalmente, no mesmo quadro, podemos ainda observar que 43% das amostras estavam contaminadas com até 50 - bactérias aeróbias formadoras de ácido por 10 g de açúcar (padrão "NCA"), 85% com as formadoras de gás e, 61% com bactérias formadoras de H_2S .

Os três grupos de bactérias termofílicas existentes no açúcar estão representados pelas seguintes espécies (43):-

- 1 - Bactérias termofílicas aeróbias formadoras de ácido, representada pelo Bacillus stearothermophilus;
- 2 - Bactérias termofílicas anaeróbias formadoras de gás (hidrogênio), representada pelo Clostridium thermosaccharolyticum;
- 3 - Bactérias termofílicas anaeróbias produtoras de H_2S , representada pelo Clostridium nigricans.

6. CONCLUSÕES

Das análises microbiológicas das amostras de açúcares estudados, deduzimos as seguintes conclusões:-

- a) É frequente nos açúcares analisados a presença de organismos tanto mesofílicos como termofílicos;
- b) Dentro dos mesofílicos encontramos por ordem de quantidade, fungos, bactérias e, com menor frequência, leveduras;
- c) Não existe nenhuma correlação entre a presença dos três grupos de microorganismos nas amostras estudadas;
- d) Entre os tipos de açúcares analisados, vemos enuncia-los, por ordem decrescente de pureza microbiológica, da seguinte maneira: demerara, refinado, cristal e batido;
- e) De acordo com os padrões existentes, os açúcares estudados não se enquandram dentro dos limites preconizados;
- f) Em relação aos microorganismos termofílicos é frequente o aparecimento das bactérias aeróbias e anaeróbias;
- h) Não existe nenhuma correlação entre a presença das bactérias aeróbias e anaeróbias;

M. Mantovani

- i) 94% das amostras continham bactérias anaeróbias formadoras de ácido, na seguinte proporção:- 20% continham de 1 a 20 esporos, 23% continham de 21 a 50, e, 51% mais de 50 esporos por 10 g de açúcar;
- j) 8% das amostras continham bactérias anaeróbias que somente produziam H_2S e, 32% que produziam somente gás; 53 delas continham bactérias que produziam H_2S e gás;
- k) Consoante os padrões do "National Canners Association" poucas são as amostras aprovadas.

7. RESUMO

Por não encontrarmos na literatura sobre a ocorrência de microorganismos no açúcar, nada que dissesse respeito ao açúcar do Brasil, e acharmos ser este um assunto de grande importância, resolvemos proceder algumas análises microbiológicas em açúcares fabricados na Zona de Piracicaba.

Assim é, que, seguindo as técnicas e meios de cultura mencionados neste trabalho, realizamos análises microbiológicas em amostras de açúcares cristal, refinado, demerara e batido, colhidas nas usinas e no comércio da cidade, totalizando 100 amostras.

Os resultados obtidos indicam a presença de microorganismos mesofílicos e termofílicos nos referidos açúcares.

Entre os primeiros constatamos a existência de fungos, bactérias e leveduras. Dentre os fungos, que são em maior número, o gênero Aspergillus foi o mais frequente.

Dentre os açúcares analisados, com relação aos microorganismos mesofílicos, o açúcar batido apresentou-se como sendo o mais contaminado, a seguir aparecem o cristal, refinado e por último o demerara.

Com relação aos termofílicos os resultados obtidos indicam a presença de três grupos de bactérias:- 1º bactérias aeróbias formadoras de ácido; 2º bactérias anaeróbias formadoras de H_2S ; 3º bactérias anaeróbias formadoras de gás.

Dentre os três grupos de bactérias, predominam as aeróbias, e entre o grupo das bactérias anaeróbias predominam as formadoras de gás.

Montini

8. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The description of the techniques and of the culture media used in microbiological analysis of sugar are given.

The types of sugar analysids were refined, "crystal", "demerara" and "batido", obtained from local dealers and from sugar plants.

The results show both thermophilics and mesophilics microorganisms, to be always present in the analysed sugars.

Molds and bacterias, were found in the mesophilic group, and eventually yeasts. Among the three groups of microorganisms, molds were the most frequently found. Most abundant genus: Aspergillus.

The tests for thermophilic bacterias were positive for aerobic bacteria acid forming, anaerobic gas forming and anaerobic bacteria forming H₂S.

The most frequently type of thermophilic bacteria found among the aerobic and anaerobic groups were respectively acid forming type and gas forming type.

There is no definite pattern for the number and type of microorganisms in the various samples.

9. BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1 - AMONS, W.J.T.
1917 - Een geval van achteruitgang van suiker onder invloed van microorganismen, Arch. Suikerindus. Nederland. Indie, Meded. Proefsta. Java-Suikerindus, Chem. Ser. n^o 5, 24, Zend Helfet, 1225-1231, Food Res., 1942, 7(6):459-480
- 2 - BLAKE, A.F.
1918 - A cause of raw sugar deterioration, La. Planter, 61(20):316-317, J. Industr. Engng. Chem., 11: 845-850
- 3 - BRAIN, L. e N. Deerr
1909 - The bacterial flora of Hawaiian sugar, Hawaiian Sugar Planters' Sta., Bull. 2, Int. Sug. J., 1911, 13:257-378

Martinez

- 4 - BROWNE, C.A.
1918 - Deterioration of raw cane sugar, J. Industr. Engng. Chem., 10(3):178-190
- 5 - CAMERON, E.J.
1930 - Thermophilic spoilage bacteria in granulated sugar, Canner, 70(13):17-20, Food Res., 1942, 7 (6) :459-480
- 6 - CAMERON, E.J.
1936 - Report on methods for detecting and estimating numbers of thermophilic bacteria in sugar, J. Ass. off. agric. Chem. Wash., 19(3):438-440
- 7 - CAMERON, E.J.
1938 - Report on methods for detecting and estimating numbers of thermophilic bacteria in sugar, J. Ass. off. agric. Chem. Wash., 21(3):457-458
- 8 - CAMERON, E.J. e C.C. Williams
1928 - Thermophilic flora of sugar in its relation to caning, Zbl. Bakt. (II abt.) 76:28-37
- 9 - CAMERON, E.J. e J. Yeasair
1931 - Sugar contamination; its effect in canning - corn, Canner, 72(14):15-16, Food Res., 1942, 7:459-480
- 10 - CAMERON, E.J. e W.D. Bigelow
1931 - Elimination of thermophilic bacteria from sugar, Industr. Engng. Chem. (Industr.), 23:1330-1333
- 11 - DEERR, N. e R.S. Norris
1908 - Deterioration of sugar on storage, Hawaiian Sugar Planters' Exp. Sta., Bull. 24, Food Res., 1942, 7:459-480
- 12 - DODSON, W.R.
1902 - Relation of Bacteria to the inversion of the sugar, La. Exp. Sta. Bull., 75 The microbiology of sugars, syrups and molasses, 1949, W.L. Owen, Published by Barr-Owen Enterprises, 126
- 13 - DUBRUNFAUT, M.
1869 - Note sur la présence des glucoses dans les sucres bruts et raffinés de betteraves, C.R. Acad. Sci., Paris, 68:663-666

- 14 - DUVAL, C. W.
1931 - Bacteriological studies at the Handerso Refi-
neries, Published by Handerson Sugar Refinery, New
Orleans, La., Int. Sug. J., 1932, 34:194
- 15 - EBERLE, R.
1896 - "Zählung der bakterien in normalen säuglings-
kot, Zbl. Bakt. (I Abt.) 19:2-5
- 16 - FABIAN, F.W.
1948 - Laboratory experiments in food bacteriology,
Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, 44-
-45
- 17 - GAYON, U.
1880 - Sur la cause de l'alteration des sucres bru-
ts de canne, C. R. Acad. Sci., Paris, 91:993-995
- 18 - GEERLIGS, H.C.P.
1918 - Measures taken in Java to prevent deteriora-
tion of stored sugar, Int. Sug. J., 20:543-546
- 19 - GREIG-SMITH, R.
1902 - Levan: a new bacterial gum from sugar, J.
Soc. Chem. Ind., 21:1381, Int. Sug. J., 1918, 20:
226-372
- 20 - HALL, H.H. e J.G. Keane
1939 - Effect of radiant energy on thermophilic or-
ganisms in sugar, Industr. Engng. Chem. (Industr.)
31:1168-1170
- 21 - HERTZ, M.R. e M. Levine
1942 - A fungistatic medium for enumeration of ye-
asts, Food Res., 7:430-441
- 22 - HOMANS, L.N.S.
1933 - Het verrkomen va "flat sour" en ander de -
derf veroozekende Bacterien in Sinker, Indische Mer-
curr, 8:1-15, Food Res., 1942, 7:459-480
- 23 - KAMERLING, Z.
1899 - Archief voor die Java Suikerindustrie, 529;
1903, 122, Int. Sug. J., 1911, 13:414-417
- 24 - KENDALL, M.G.
1948 - The advanced theory of statistics, sec. edi-
tion, 2^o vol, Charles Griffin & Co. Letd, London -
Chapter 17

Allan

- 25 - KOPELOFF, N. e L. Kopeloff
1919 - The deterioration of manufactured cane sugar
by molds, J. Industr. Engng. Chem., 11:845-850
- 26 - KOPELOFF, N. e L. Kopeloff
1922 - Abstr. Bact., 6:221, The microbiology of star
ch and sugars, 1930, Oxford University Press, London
Humphrey Milford, 289
- 27 - LAXA, O.
1900 - Zeitschrift fur Zuckerindustrie in Bohmen,
423, Int. Sug. J., 1911, 13:414-417
- 28 - LIGON, O.
1673 - History of the Island of Barbados, London, -
The Microbiology of starch and sugar, 1930, Oxford
University Press, London, Humphrey Milford, 289
- 29 - LITTON, M.L.
1947 - A culture medium for the primary isolation
of fungi, Science, 106(2744):109-111
- 30 - MAXWELL, F.
1896 - Louisiana Planter, 154, Int. Sug. J., 1911
13:414-417
- 31 - OWEN, W.L.
1911 - A recently discovered bacterial decomposi-
tion of sucrose, Industr. Engng. Chem. (Industr.),
3:481-486
- 32 - OWEN, W.L.
1919 - The deterioration of cane sugars in storage:
its causes and suggested measures for its control,
Int. Sug. J., 21:277-281;334-339
- 33 - OWEN, W.L.
1923 - Prevention of the deterioration of sugar by
Torula inoculation, Int. Sug. J., 25:232;371-374
- 34 - OWEN, W.L.
1925 - The deterioration of raw sugars in storage,
Reprinted from Facts about sugar, New York, N.Y., 43
- 35 - OWEN, W.L.
1949 - The microbiology of sugars, syrups and molas
ses, Published by Barr-Owen Research Enterprises, -
Chapters I, VI, VIII

M. L. Owen

- 36 - OWEN, W.L.
1952 - Sugar refining under bacteriological control
Sug. J., 14(10):26-34
- 37 - OWEN, W.L. e R.L. Mobley
1935 - Bacteriological standards of Refined sugars
(Deterioration of Refined Sugars), Facts about su-
gar, 30(12):451-452, Int. Sug. J., 1936, 38:144-145
- 38 - OWEN, W.L. e R.J. Bienvenu
1949 - An improved substrate for enumeration of -
mould fungi in sugar, Sugar, 44(5):30-32
- 39 - PAYEN, M.
1851 - Note sur une végétation microscopique que at-
taque le sucre solide, C. R. Acad. Sci., Paris, 33:
393-397
- 40 - SCHONE, A.
1911 - Ueber eine starke Zersetzung eines Rubenroh-
zuckers, Dtsch. Zuckerindustr., 36:247-248, Industr.
Engng. Chem. (Industr.), 1911, 11:845-850
- 41 - SCOTT, J.
1912 - The fungi of raw sugars, Int. Sug. J., 14:
582-586
- 42 - SHOREY, E.C.
1898 - The deterioration of raw cane sugar in tran-
sit or storage, J. Soc. Chem. Ind., 17:555, Int. -
Sug. J., 1918, 20:226-372
- 43 - TANNER, F.W.
1950 - Laboratory manual and work book in Microbio-
logy of Foods, written and compiled, The Garrard -
Press, Champaign, Illinois, Sec.-1,2-3
- 44 - TEMPANY, H.A. e D.D. de Charnoy
1922 - The deterioration of white sugar during sto-
rage in Mauritius, Int. Sug. J., 24:463-476; 527-532
- 45 - WEINZIRL, J.
1927 - Sugar as a source of the anaerobes causing
explosion of chocolate candies, J. Bact., 13:203-207
- 46 - WHALLEY, H.C.S. e M.P. Scarr
1946 - Micro-organisms in raw sugars, affination
syrops and molasses, Int. Sug. J., 48:180-183

M. C. S. e M. P. Scarr

47 - WHALLEY, H.C.S. e M.P. Scarr

1947 - Micro-organisms in raw and refined sugar and intermediate products, Chem & Ind., 35:531-536

48 - WILSON, G.S. e A.A. Miles

1948 - Topley and Wilsons' principles of bacteriology and immunity, third edition, vol. I, Edward - Arnold & Co., London, 80-82

49 - WRAY, W.

1848 - The practical sugar planter, London, 342-343, Int. Sug. J., 1918, 20:226-229

10. AGRADECIMENTOS

Queremos deixar aqui consignados os nossos sinceros agradecimentos aos Professores Jayme Rocha de Almeida, - Dignissimo Diretor do Instituto Zimotécnico, pelas sugestões e apóio moral e, Ruben de Souza Carvalho, ilustre catedrático de Fitopatologia Agrícola, por sugerir êste assunto e pela orientação segura que nos proporcionou, sem as quais seria impossível a feitura dêste trabalho.

Aproveitamos ainda a oportunidade para agradecer - ao Dr. Frederico Pimentel Gomes, da Cadeira de Matemática, - que nos orientou na parte referente a sua especialidade.

Agradecemos igualmente, a tódos que direta ou indiretamente contribuíram para que esta tese fosse executada,

* * * *