Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Identificação de bactérias contaminantes de fermento de cachaça por
seqüenciamento do gene 16S rDNA**

Osmar Vaz de Carvalho Netto

Dissertação apresentada, para obtenção do título de Mestre
em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2007

Osmar Vaz de Carvalho Netto
Bacharel em Ciências dos Alimentos

**Identificação de bactérias contaminantes de fermento de cachaça por seqüenciamento do
gene 16S rDNA**

Orientador:

Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2007

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Carvalho Netto, Osmar Vaz de

Identificação de bactérias contaminantes de fermento de cachaça por seqüenciamento do gene 16S rDNA / Osmar Vaz de Carvalho Netto. - - Piracicaba, 2007.
51 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Aguardente 2. Bactérias 3. Fermentação alcoólica – Contaminação 4. Genética molecular I. Título

CDD 663.53

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

À minha mãe Eliana e ao meu pai Eduardo.

Aos meus irmãos Fernando e Mariana.

À minha avó Ione.

A todos meus familiares.

Aos verdadeiros amigos de Campinas e Piracicaba.

AGRADECIMENTOS

A todos meus familiares, que independente da distância, sempre me incentivaram.

A todos meus amigos, aos quais sempre pude contar e são exemplos de amizade.

Ao orientador e amigo Prof. Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo, pelo exemplo de competência e profissionalismo.

Ao amigo Daniel, pela grande ajuda e dedicação ao trabalho.

Aos amigos do LGM: Júlia, Rapha, Thayne, Juliana, Cynthia, Érika, Aninha, Vivian, Márcia, Lílían, Fátima, Bruno, Carol, Danilo, Daniela, Marcelo, Cláudia, Flávia, Maria Cristina, Alessandra, Paulo, Reinaldo, Fernanda, pelo companheirismo e amizade durante todos esses anos.

Ao amigo Neno Campanari, pela cooperação, atenção e principalmente por ter proporcionado o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos da Fitopatologia: Fernanda, Rodolfo, Edivaldo, Carmem, Jefferson e Linda, pelo auxílio sempre que necessitei.

A todos funcionários, professores e alunos da Fitopatologia, pela acolhida durante meus estudos.

Aos professores André Ricardo Alcarde e Jorge Horii por terem proporcionado o desenvolvimento da idéia do trabalho.

À Gisele Lopes Nunes, pelo auxílio com as análises dos dados.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela acolhida em todos esses anos de graduação e pós-graduação.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

"As coisas são semelhantes: isto faz a Ciência possível;
as coisas são diferentes: isto faz a Ciência necessária".

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 DESENVOLVIMENTO.....	10
2.1 Revisão de literatura.....	10
2.1.1 A produção de cachaça no Brasil.....	10
2.1.2 A cachaça no mercado externo.....	12
2.1.3 Composição e qualidade da cachaça.....	13
2.1.4 Microrganismos contaminantes do processo de produção de cachaça.....	16
2.1.5 Avaliação da diversidade bacteriana por meio do seqüenciamento do gene 16S rDNA.....	17
2.1.6 Filogenia.....	19
2.1.7 Alinhamento de seqüências.....	19
2.1.8 Modelos de substituição de nucleotídeos.....	20
2.1.9 Métodos de reconstrução filogenética.....	21
2.1.10 Teste de confiança.....	22
2.1.11 Métodos de estimativa de riqueza de espécies.....	22
2.2 Material e métodos.....	24
2.2.1 Coleta de amostras.....	24
2.2.2 Extração de DNA das amostras e amplificação parcial do gene 16S rDNA.....	24
2.2.3 Clonagem e seqüenciamento do gene 16S rDNA.....	25
2.2.4 Determinação e análise das unidades taxonômicas operacionais.....	26
2.3 Resultados.....	29
2.3.1 Análises das seqüências de 16S rDNA.....	29
2.3.2 Análises das unidades taxonômicas operacionais.....	30
2.4 Discussão.....	37
2.4.1 Diversidade bacteriana nas amostras de fermento.....	37
2.4.2 Contaminantes do fermento de cachaça e relação a outros processos fermentativos.....	39
3 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43

RESUMO

Identificação de bactérias contaminantes de fermento de cachaça por sequenciamento do gene 16S rDNA

A cachaça é uma bebida típica brasileira produzida a partir da destilação do caldo de cana-de-açúcar fermentado principalmente por *Saccharomyces cerevisiae*. Grande parte da produção nacional é artesanal, e não há uma preocupação por parte dos produtores quanto ao controle microbiológico da fermentação. Este trabalho objetivou caracterizar a comunidade bacteriana contaminante do fermento utilizado na produção de cachaça. Foram coletadas quatro amostras em um alambique artesanal. A primeira (NA) foi coletada um ano anterior às outras três e utilizada como controle. As restantes foram coletadas ao final do primeiro dia de fermentação (NP), após quinze (NS) e trinta dias (NT) utilizando o mesmo fermento. Um total de 587 seqüências de 16S rDNA foram analisadas, sendo 81 da amostra NA, 177 da amostra NP, 159 da amostra NS e 170 da amostra NT. As análises das seqüências revelaram a presença de 17 gêneros e 27 espécies, além de 27 bactérias não conhecidas. Cento e setenta unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foram identificadas utilizando o software DOTUR com uma distância evolucionária de 0.03. Quarenta e três UTOs foram identificadas na amostra controle (NA), 38 na NP, 57 na amostra NS e 38 na terceira amostra (NT). Das 170 UTOs identificadas, apenas dezessete foram identificadas duas vezes em diferentes amostras e somente uma, identificada como *Lactobacillus hilgardii*, foi identificada três vezes, evidenciando uma grande dinâmica populacional bacteriana durante o processo fermentativo. Análises estatísticas utilizando o software S-LIBSHUFF indicaram diferenças significativas na composição bacteriana entre amostras. Foram encontradas espécies/gêneros ainda não descritas na literatura em fermentos de cachaça, como *Weissella cibaria*, *Leuconostoc citreum* e algumas espécies de *Lactobacillus*. Além destas, várias bactérias não conhecidas também foram identificadas. Os resultados revelaram que a comunidade de bactérias contaminantes do processo fermentativo é muito mais complexa do que se conhecia, com características heterofermentativas e produção de congêneres que provavelmente refletem na qualidade da bebida. Este é o primeiro relato da utilização do método de sequenciamento do gene 16S rDNA para determinar contaminantes bacterianos em fermentados de cana-de-açúcar para produção de cachaça.

Palavras chave: Aguardente; Bactérias; Fermentação alcoólica - Contaminação; Genética molecular.

ABSTRACT

Identification of bacterial contaminants of the cachaça ferment by sequencing of the 16S rDNA

Cachaça is a typical Brazilian spirit made from sugar cane fermented mainly by *Saccharomyces cerevisiae*. The production is mostly artisanal, and there is no microbiological control during the fermentation process. The objective of this study was to assess the bacterial community associated with the ferment used in the production of cachaça. Four ferment samples were collected from an artisanal still. The first one (NA), was collected one year previously to the other three and constituted a control reference. The remaining three samples were collected at the end of the first day of fermentation (NP), and fifteen (NS) and thirty days (NT) after using this same ferment. A total of 587 16S rDNA sequences were analyzed, being 81 sequences from the NA sample, 177 from NP, 159 from NS, and 170 from the NT sample. Sequence analyses revealed the presence of 17 genus and 27 species plus 27 unknown species. One hundred and seventy operational taxonomic units (OTUs) were identified using the DOTUR software using a cut-off evolutionary distance of 0.03. Forty three were identified in the control (NA) sample, 38 in the NP, 57 in NS, and 38 in the third (NT) sample. Of the 170 OTUs, only seventeen were detected twice in different samples and only one, identified as *Lactobacillus hilgardii*, was identified thrice, indicating a dynamic nature of the bacterial community during the fermentation process. Statistical analysis using the software S-LIBSHUFF indicated significant differences in the bacterial composition among samples. Our analyses also allowed to identify several bacteria not yet described as contaminants of the cachaça ferment, such as *Weissella cibaria*, *Leuconostoc citreum* and some *Lactobacillus* species. In addition, several unknown bacteria were also detected. The results revealed a much larger bacterial contaminant community present in the fermentative process of cachaça than previously reported with heterofermentative ability to produce secondary compounds which probably influence the quality of the final beverage. This is the first report on the utilization of the 16S rDNA sequencing method to assess the bacterial diversity of sugar cane fermentation for the production of cachaça.

Keywords: Aguardente; Bacteria; Alcoholic fermentation - Contamination; Molecular genetic.

1 INTRODUÇÃO

Cachaça é a denominação exclusiva da bebida destilada produzida no Brasil a partir do caldo de cana-de-açúcar fermentado (BRASIL, 1997). É produzida em praticamente todo o país por aproximadamente 30 mil produtores (PROGRAMA BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO DA CACHAÇA - PBDAC, 2006), sendo que, destes, 25 mil são artesanais (ASSOCIAÇÃO MINEIRA DOS PRODUTORES DE CACHAÇA DE QUALIDADE - AMPAQ, 2006). Este sistema produtivo é caracterizado por uma grande carga microbiana contaminante, pois não há uma preocupação quanto ao controle microbiológico da fermentação (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; KAJI; CANHOS, 1989). Na fabricação artesanal, não há esterilização do caldo da cana-de-açúcar e há reutilização do fermento em novas fermentações (MORAIS et al., 1997; PATARO et al., 1998). Após a fermentação, o caldo fermentado, chamado de vinho, é destilado e o fermento sedimentado, chamado “pé-de-cuba”, é reutilizado para a fermentação seguinte, levando um grande número de bactérias e produtos de seu metabolismo para o novo processo (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; KAJI; CANHOS, 1989), além de leveduras selvagens presentes nas dornas, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*.

A população de leveduras contaminantes em fermentos de cachaça é bem estudada e conhecida (MORAIS et al., 1997; PATARO et al., 1998, 2000; SCHWAN et al., 2001). Entretanto, no que concerne bactérias, estas são conhecidas apenas através de técnicas baseadas em isolamento em meios de cultivo (SERRA et al., 1979; ALTHERTUM et al., 1984; GALLO, 1989; YOKOYA, 1991; GALLO, 1992; OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994). No entanto, essa técnica não revela a real composição das espécies presentes na amostra, pois muitos microrganismos são de difícil cultivo (HUGENHOLTZ, 2002).

Assim, uma maneira para superar esse obstáculo metodológico é a identificação desses microrganismos através de técnicas independentes de cultivo. O seqüenciamento parcial do gene ribossomal 16S bacteriano é bastante eficiente para este fim (RONDON; GOODMAN; HANDESMAN, 1999; STACKEBRANDT et al., 2002; HONGO et al., 2003).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a comunidade bacteriana presente em fermentos de cachaça em um alambique artesanal utilizando o seqüenciamento do gene ribossomal 16S. A identificação dessas seqüências ocorreu através da comparação de similaridade com seqüências de bactérias depositadas em banco de dados. Esse é o primeiro relato a utilizar essa técnica para descrever bactérias contaminantes presentes no processo de produção desta bebida.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de Literatura

2.1.1 A produção de cachaça no Brasil

A aguardente de cana é a bebida com graduação alcoólica de 38 a 54% em volume a 20°C, obtida pela destilação do mosto fermentado de cana-de-açúcar, podendo ser adicionada de açúcares em até 6 g/L (BRASIL, 1997). Cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil com graduação alcoólica de 38 a 48% em volume a 20°C (BRASIL, 2003). Assim como a aguardente de cana, a cachaça pode ser adicionada de açúcares, sendo denominada “adoçada” quando a concentração de açúcares for superior a 6g/L e inferior a 30g/L expressos em sacarose (BRASIL, 1997). A cachaça envelhecida refere-se à bebida que contiver, no mínimo, 50% de cachaça envelhecida em recipiente de madeira por um período não inferior a um ano (BRASIL, 1997).

A cachaça, bebida genuinamente nacional produzida praticamente em todo o país, é a bebida destilada mais consumida no Brasil e a terceira mais consumida no mundo (PBDAC, 2006). Assim, possui grande importância econômica no Brasil. Em 2002 foram destilados 1,3 bilhão de litros de cachaça no país, e esse número vem se mantendo constante nos últimos anos. A produção representa 87% da produção nacional de bebidas alcoólicas destiladas, gerando uma receita de US\$ 600 milhões. As exportações em 2002, no entanto, foram de 14,8 milhões de litros, representando apenas 1,13% do total produzido (PBDAC, 2006). Não obstante, nos últimos anos as exportações de cachaça cresceram cerca de 10% ao ano e a expectativa é que atinjam 4% do total produzido até 2010 (PBDAC, 2006). As exportações passaram de US\$ 8,1 milhões em 2000 para US\$ 8,6 milhões em 2001. A meta é atingir US\$ 100 milhões até o fim desta década (FRANCO, 2002).

O setor emprega cerca de 450 mil trabalhadores e movimenta internamente US\$ 1 bilhão por ano. São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Ceará, Rio de Janeiro e Goiás são os Estados com os maiores volumes de produção. Cerca de 5 mil marcas são comercializadas no Brasil e estima-se que existam 30 mil produtores (PBDAC, 2006), sendo que, destes, 25 mil são artesanais (AMPAQ, 2006) que, em grande número, vendem sua produção às indústrias. A

produção industrial representa cerca de 95% do total produzido. Neste processo, a padronização do engarrafamento é mais definida que a artesanal. Isto porque as indústrias contam com melhores tecnologias, como destilação em colunas de aço inox, que separam melhor os compostos voláteis, monitoramento constante da fermentação, além de desenvolverem o processo sob condições microbiológicas mais controladas que no processo artesanal, através do tratamento do fermento a ser reutilizado com produtos químicos. Geralmente quando o produto é destinado à exportação sua produção é inteiramente na indústria, o que lhe confere uma melhor qualidade e padronização. Por outro lado, o produto destinado ao comércio interno e realizado por pequenas indústrias, pode ser produzido com cachaças de diferentes origens fornecidas por produtores artesanais. Neste caso, as cachaças sofrem uma mistura, chamada de “blend”, onde há uma padronização do produto e este é novamente destilado. Neste sistema, a bebida geralmente não tem o mesmo padrão que a bebida produzida no processo anterior ou no processo seguinte, uma vez que a composição das cachaças fornecidas pelos produtores artesanais é variável.

No Brasil, a produção artesanal cresce cerca de 5% ao ano e seu consumo cresce na ordem de 7% ao ano (FEDERAÇÃO NACIONAL DAS ASSOCIAÇÕES DE PRODUTORES DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE - FENACA, 2004). Neste sistema produtivo, por motivos econômicos, geralmente os procedimentos de controle de qualidade não são respeitados, como a não esterilização do caldo da cana-de-açúcar e a reutilização do fermento em novas fermentações (MORAIS et al., 1997; PATARO et al., 1998). O preparo artesanal do fermento iniciador, de modo geral, consiste na utilização de 1/5 do volume da dorna de caldo de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes e substratos, como arroz, farelo de milho, soja moída e suco de limão ou laranja para o ajuste do pH. A fermentação ocorre com a participação de leveduras selvagens, principalmente *Saccharomyces cerevisiae*, e bactérias presentes no próprio caldo e na dorna de fermentação. Um volume adicional de caldo é adicionado a cada dia, durante 5 a 10 dias. Após este período, é adicionado o volume total de caldo que a dorna comporta e inicia-se a fermentação, que ocorre durante 24 a 48 horas em temperatura ambiente e geralmente em dornas abertas (MORAIS et al., 1997; PATARO et al., 2000; SCHWAN et al., 2001).

Após a fermentação, o caldo fermentado, chamado de vinho, é destilado em alambiques de cobre e o fermento sedimentado, chamado “pé-de-cuba”, é reutilizado para a fermentação seguinte, levando um grande número de bactérias e produtos de seu metabolismo para o novo processo (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; KAJI; CANHOS, 1989). Esta prática, além de reduzir a

viabilidade das leveduras, despadroniza a bebida pela constante alteração da carga e composição microbiana do processo fermentativo. Além disso, esta variação microbiana influencia na concentração final dos congêneres secundários, que são responsáveis pelo aroma e sabor do produto, como álcoois, aldeídos, ácidos orgânicos e ésteres (PACKOWSKI, 1978) e no teor alcoólico da bebida.

2.1.2 A cachaça no mercado externo

Visando a proteção e valorização do produto, o governo brasileiro decretou, em 2003, que o nome “cachaça” seria de uso exclusivo para o destilado alcoólico de cana-de-açúcar produzido no Brasil (BRASIL, 2003). O nome da bebida passou então a ser relacionado com seu país de origem, como acontece com outras bebidas, de modo que seu reconhecimento internacional possibilitará agregar maior valor ao produto. Essa medida, aliada a um programa de marketing, vem aumentando a cada ano o volume das exportações da bebida, como mencionado anteriormente. A cachaça de fabricação industrial representa 90% das exportações, sendo consumida quase na totalidade como “caipirinha”. Já o produto artesanal é destinado ao consumo puro, sendo seu número inferior devido à falta de hábito do consumo da bebida desta maneira (MAIA, F., 2002) e por apresentar um preço maior que o produto industrial, um reflexo de seu sabor superior e da tradição associada ao modo de preparo, valorizado no exterior.

Apesar dos obstáculos à exportação de cachaça como a taxação nos mercados americano e europeu, o crescente, mais ainda pequeno, marketing e uma inadequada rede de distribuição (FRANCO, 2002), na verdade um dos pontos mais delicados no processo de aceitação da cachaça brasileira no mercado exterior é justamente a falta de padronização da bebida. Este problema é principalmente relacionado com o produto artesanal, o qual muitas vezes não está adequado aos padrões internacionais de qualidade exigidos pelo mercado (ALCARDE et al., 2002). Assim, o aprimoramento da qualidade e da padronização da cachaça nacional é essencial para que a bebida atenda aos padrões internacionais, propiciando condições de abertura e manutenção de um firme mercado de exportação, bem como sua valorização no mercado interno pelas classes de maior poder aquisitivo, que estão dispostas a pagar mais caro por uma bebida desde que de qualidade superior.

Entretanto, os produtores artesanais são reticentes às mudanças no processo de preparo de sua bebida, pois há um costume e uma tradição envolvidos. E é justamente a tradição no modo de

preparo que mantém as características da cachaça de determinado produtor que, paradoxalmente conquista os paladares de muitos consumidores e diferencia uma cachaça de outra. Possíveis mudanças na forma de preparo da bebida ou associações em modelos cooperativos, visando a padronização e o aprimoramento da sua qualidade, poderiam ao mesmo tempo valorizar o produto no exterior, como também descaracterizar a bebida de determinados produtores.

Desta maneira, a aplicação de estratégias e tecnologias no processo artesanal de produção da cachaça exige um aprofundamento nos estudos, tanto para adaptá-las à realidade do pequeno produtor como também para não descaracterizar seu produto. Neste contexto, o conhecimento da microbiota associada ao processo de produção de cachaça compreende um primeiro e importante passo.

2.1.3 Composição e qualidade da cachaça

A composição da cachaça está submetida à Legislação Nacional (BRASIL, 1997) sob responsabilidade do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, o qual estabelece os denominados padrões de identidade e de qualidade da bebida. Esses padrões foram recentemente atualizados e aprovados pela Instrução Normativa número 13 (BRASIL, 2005) e seus respectivos limites têm a finalidade de moderar a influência de cada componente na qualidade organoléptica da bebida, não significando, contudo, que a cachaça que ali se enquadre possa ser considerada um produto de qualidade organoléptica superior.

Na composição da cachaça, o Coeficiente de Congêneres é determinado pela soma de: acidez volátil, expressa em ácido acético; aldeídos, expressos em acetaldeído; ésteres totais, expressos em acetato de etila; álcoois superiores, expressos pela soma do álcool iso-propílico, álcool iso-butílico e álcoois iso-amílicos; e pela soma de furfural e hidroximetilfurfural. Segundo a Instrução Normativa número 13 (BRASIL, 2005), a cachaça deve observar os limites para estes compostos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Coeficiente máximo de congêneres permitidos em cachaça

Congêneres	Limite máximo em mg/100mL de álcool anidro
Acidez volátil	150
Ésteres	200
Aldeídos totais	30
Furfural mais hidroximetilfurfural	5
Álcoois superiores	360

Em relação às substâncias contaminantes, a Instrução Normativa prevê ainda que a cachaça deve atender a certos limites para contaminantes orgânicos, conforme Tabela 2, e para contaminantes inorgânicos, conforme Tabela 3.

Tabela 2 – Limite máximo permitido para contaminantes orgânicos em cachaça

Substância	Limite máximo em álcool anidro
Álcool metílico	20mg/100mL
Carbamato de etila	150µg/L
Acroleína (2-propenal)	5mg/100mL
Álcool sec-butílico (2-butanol)	10mg/100mL
Álcool n-butílico (1-butanol)	3mg/100mL

Tabela 3 – Limite máximo permitido para contaminantes inorgânicos em cachaça

Elemento	Limite máximo em álcool anidro
Cobre	5mg/L
Chumbo	200µg/L
Arsênico	100µg/L

Os teores dos congêneres secundários da fermentação são geralmente inferiores a 0,1% e podem muitas vezes atingir valores da ordem de 0,001% (MAIA, A., 1994). Os compostos orgânicos são produzidos tanto por leveduras quanto por bactérias contaminantes, sendo que quanto maior a concentração de contaminantes, maior será a formação de compostos “não-álcool”, ou seja, produtos que não sejam etanol. O metanol (formado por um carbono) e os

álcoois superiores (iso-amílico, iso-propílico e iso-butírico), que possuem mais de dois carbonos em sua conformação são, portanto, classificados como “não-álcool”, sendo produzidos tanto por leveduras quanto por bactérias. Os álcoois de quatro a cinco carbonos são formados pela degradação de açúcar pelas leveduras e, em parte, pela degradação de aminoácidos. A quantidade de álcoois superiores formados durante a fermentação depende do tipo de bactérias contaminantes e das leveduras presentes, sendo que quanto mais demorada a fermentação, maior é a produção desses compostos (MAIA, A., 1994). Álcoois superiores, com três a cinco carbonos, apresentam odores característicos associados com bebidas destiladas. Acima de cinco carbonos, alguns deles lembram fortemente o aroma de flores (MAIA, A., 1994).

Dentre os diversos ácidos orgânicos, os principais são formados por bactérias, principalmente do gênero *Lactobacillus* (STILES; HOLZAPFEL, 1997), durante a fermentação da glicose, convertendo-a em ácido acético e ácido lático, proporcionando à bebida um sabor desagradável. A principal origem dos ésteres está no metabolismo secundário intracelular das leveduras durante a fermentação alcoólica (NÓBREGA, 2003). De um modo geral, os ésteres são desejáveis, porque favorecem o aroma da cachaça (MAIA, A., 1994). Entretanto, os ésteres presentes na cachaça também podem ser formados pela esterificação durante a destilação entre etanol e ácidos orgânicos produzidos por bactérias, formando principalmente acetato de etila que, em grandes quantidades, confere à bebida odor e gosto desagradáveis.

Aldeídos são compostos intermediários da hetero fermentação de bactérias, como *Lactobacillus* e *Leuconostoc* (STILES; HOLZAPFEL, 1997), que convertem glicose a acetaldeído (dois carbonos). Vários aldeídos podem também ser formados a partir de aminoácidos presentes no caldo de cana. Aldeídos maiores, que contêm acima de dez carbonos, apresentam aroma agradável. Eles podem ser formados pela redução de ácidos graxos, mas são de ocorrência restrita na fermentação alcoólica (PIGGOTT, 1989; POTTER, 1980 apud MAIA, A., 1994). Entretanto, a acroleína, ou aldeído acrílico, é formada pela desidratação do glicerol, produzido pelas bactérias lácticas e pelas leveduras durante a fermentação, na presença de ácido à quente, quando em contato com a superfície metálica durante a destilação, o que confere à bebida um odor indesejável.

2.1.4 Microrganismos contaminantes do processo de produção de cachaça

Os microrganismos do ar e do solo que aderem à cana-de-açúcar, bem como os microrganismos epífitos da planta e os presentes nas dornas de fermentação constituem a potencial carga microbiana contaminante do processo de produção artesanal de cachaça. Aliado a isto, os problemas de inexistência de tratamento térmico e até mesmo filtragem do caldo para retirada de partículas sólidas, associadas com recontaminações pelo re-aproveitamento do fermento sem um controle microbiológico, levam um grande número de bactérias e produtos de seu metabolismo para a fermentação (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; KAJI; CANHOS, 1989).

Dentre os problemas causados por estes contaminantes, destacam-se a competição por açúcares, a inibição, floculação e a queda da viabilidade das leveduras devido a toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio que resultam na queda do rendimento e produtividade da fermentação (AMORIM; OLIVEIRA; CAMPOS, 1981; AMORIM; OLIVEIRA, 1982; ALTERTHUM et al., 1984; KHAN; HOQ, 1990). Por outro lado, a presença de certos contaminantes, tanto leveduras quanto bactérias, está relacionada com a produção de congêneres secundários que contribuem de forma benéfica para a qualidade da bebida, uma vez que esses compostos, em proporções equilibradas, são responsáveis pelo sabor e aroma da bebida (PACKOWSKI, 1978; SCHWAN et al., 2001), chamado “*bouquet*”. Também em estudos em destilarias de *whisky*, Geddes e Riffkin (1989) e van Beek e Priest (2000 apud van BEEK; PRIEST, 2002), consideraram que a fermentação ácido-lática realizada por bactérias contaminantes contribuiu de forma positiva para o aroma e o sabor final da bebida. Entretanto, os parâmetros dessa contribuição não são conhecidos.

Estudos de caracterização dos contaminantes em dornas de fermentação de caldo de cana-de-açúcar têm sido desenvolvidos através de técnicas tradicionais baseadas em isolamento em meios de cultivo. Os organismos bacterianos mais frequentemente associados a tais contaminações são *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Acetobacter* e *Streptococcus* (SERRA et al., 1979; ALTHERTUM et al., 1984; YOKOYA, 1991; GALLO, 1992; OLIVA-NETO; YOKOYA 1994; SCHWAN et al., 2001). No entanto, nem sempre os microrganismos cultiváveis representam as espécies mais numerosas ou funcionalmente significativas do ambiente do qual foram isoladas (HUGENHOLTZ, 2002). Na verdade, estima-se que as espécies cultiváveis representem apenas 1% do total de espécies microbianas presentes em ambientes complexos, como água e solos (STALEY; KONOPKA, 1985).

2.1.5 Avaliação da diversidade bacteriana por meio do seqüenciamento do gene 16S rDNA

Um fator vital para o crescimento, manutenção e reparo celular de todos os microrganismos é a síntese de proteínas, que depende da participação do RNA ribossômico (rRNA) para a formação do ribossomo e tradução da informação genética. A codificação do rRNA é feita pelo chamado DNA ribossômico (rDNA).

O DNA ribossomal de bactérias é objeto de grande número de estudos, com diversas aplicações em genética, evolução e filogenia. Os genes ribossomais são considerados cronômetros evolutivos (WOESE; FOX, 1977), pois a comparação de sua seqüência entre diversos organismos permite inferências filogenéticas entre os mesmos. Isto é possível dado que estes genes estão presentes em todos os seres vivos e são conservados do ponto de vista evolutivo, mas apresentam regiões com variações de nucleotídeos nas diferentes espécies, o que permite comparações mesmo entre organismos filogeneticamente distantes.

Além de estudos evolutivos, o seqüenciamento de genes ribossomais possui outra aplicação prática de inestimável valor científico, qual seja o de determinar a composição de populações microbianas de amostras ambientais sem a necessidade de isolamento dos organismos em cultura pura. Em essência, o método consiste na extração de ácidos nucléicos de amostras ambientais e amplificação parcial do gene ribossomal 16S (16S rDNA) utilizando iniciadores universais para este gene. Os produtos amplificados são separados em vetores plasmidiais por meio de clonagem, e então seqüenciados. As seqüências gênicas assim geradas podem ser identificadas por meio de comparações com seqüências gênicas de organismos conhecidos depositados em bancos gênicos. A adoção de técnicas que utilizam o gene 16S rDNA para identificar e até mesmo classificar uma bactéria foi sugerida e incentivada pelo comitê de sistemática bacteriana em 2002 (STACKEBRANDT et al., 2002). Esta abordagem é amplamente utilizada para estudar comunidades microbianas complexas de solo, ar e água (HONGO et al., 2003).

O método de seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA apresenta uma grande vantagem sobre o método tradicional de cultivo de isolados em meios de cultura, pelo simples fato de que grande parte das bactérias presentes em amostras ambientais não são cultiváveis ou são de difícil cultivo (RONDON; GOODMAN; HALDESMAN, 1999). Um exemplo de como esta ferramenta possui grande aplicação na identificação de microrganismos pode ser observado no trabalho de

Venter et al. (2004), onde amostras de DNA extraídas do Mar de Sargasso foram seqüenciadas, revelando a presença de mais de 1400 espécies de bactérias, sendo quase 150 desconhecidas. Em outro estudo (LAMBAIS et al., 2006) sobre a diversidade bacteriana na filosfera de árvores da Floresta Atlântica, os autores seqüenciaram parcialmente 418 genes 16S rDNA, revelando que aproximadamente 97% dessas seqüências pertenciam à espécies desconhecidas.

Não só em ambientes complexos, como também em alimentos e bebidas fermentadas, esta técnica tem recebido grandes aplicações na identificação de microrganismos de interesse científico e industrial. Escalante et al. (2004) utilizaram esta técnica para identificar bactérias contaminantes em *pulque*, uma tradicional bebida fermentada alcoólica mexicana. Estudando três diferentes produtores, foi identificada uma diversa população bacteriana, composta por *Lactobacillus acetotolerans*, *L. plantarum*, *L. hilgardii* e *Leuconostoc mesenteroides*, entre outras. Também estudando uma bebida típica, Endo e Okada (2005), analisaram o produto fermentado de *shochu*, uma bebida destilada japonesa, e identificaram *L. casei*, *L. plantarum*, *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. citreum* e *Lactococcus lactis*. Em outro trabalho semelhante, com *whisky*, van Beek e Priest (2003) amostraram duas destilarias, onde identificaram principalmente a presença de bactérias dos gêneros *Lactobacillus* (*L. brevis* e *L. casei*) e *Weissella*, como também a presença de *Lactococcus lactis*, entre outras. Baruzzi et al. (2000), estudando a comunidade de bactérias durante a produção de queijos na Itália, identificou, a partir do gene 16S rDNA, 10 espécies de *Lactobacillus*, entre eles *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. zeae*, *L. acetotolerans* e *L. hilgardii*. Essa diversidade e estrutura também foram identificadas em produtos lácteos romenos (ZAMFIR et al., 2005) e na produção de salsichas fermentadas na Grécia (RANTSIOU et al., 2006). Na área de produção de álcool combustível, Skinner e Leathers (2004), em um trabalho para identificar bactérias contaminantes em dornas de milho fermentado, também identificaram uma comunidade bacteriana parecida com os trabalhos citados acima. Esses resultados revelam que as comunidades bacterianas presentes nestes processos fermentativos são bastante semelhantes, independentes da matéria-prima utilizada, e caracterizadas pela presença de espécies ácido-láticas, principalmente dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella* e *Lactococcus*. Algumas espécies desses gêneros possuem a característica de serem resistentes a baixos valores de pH e a altas concentrações de álcool (HUHTAMELLA et al., 2007), o que explica a presença e ampla distribuição em diferentes processos fermentativos tanto alcoólicos quanto lácticos.

2.1.6 Filogenia

Filogenia é o estudo das relações evolucionárias entre os seres vivos. Análises filogenéticas estimam essas relações e as representam sob a forma de árvores (dendogramas) com ramos que identificam o organismo. A premissa básica de um cladograma, como certas árvores construídas também são chamadas, é que os membros de um clado compartilham uma história evolucionária próxima e são mais relacionados uns com os outros do que com membros de clados mais distantes. Geralmente, análises filogenéticas ou cladísticas são realizadas por comparação de múltiplas características ou caracteres, como por exemplo, seqüências de DNA.

Ao menos dois requisitos devem ser seguidos na construção das relações filogenéticas utilizando DNA: as seqüências devem ser homólogas, ou seja, origem evolutiva em comum, e a variabilidade nestas deve conter sinais filogenéticos adequados para resolver o problema de interesse.

Há quatro passos a serem realizados em análises filogenéticas de seqüências nucleotídicas: alinhamento das mesmas, determinação do modelo de substituição dos nucleotídeos, construção da árvore filogenética e avaliação da árvore. Cada passo é crítico para as análises e devem ser determinados corretamente de acordo com o tipo de amostra, sendo aconselhável a utilização de mais de um método para verificar a consistência dos resultados.

2.1.7 Alinhamento de seqüências

A inferência evolutiva entre táxons a partir de seqüências de genes homólogos requer que estas estejam alinhadas para se determinar posições homólogas nas regiões analisadas e, a partir daí, o grau de similaridade entre elas. Um dos programas mais utilizados para alinhamento de múltiplas seqüências é o CLUSTAL (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). O alinhamento permite a identificação de substituição de nucleotídeos e regiões que sofreram eventos de deleção e inserção de bases. Estas regiões geralmente são consideradas por programas de inferência filogenética como um quinto estado de caracter, além dos quatro nucleotídeos, e também utilizadas para determinação de divergências evolutivas.

2.1.8 Modelos de substituição de nucleotídeos

Seqüências nucleotídicas alinhadas podem ser comparadas através de vários métodos que estimam sua similaridade e, posteriormente, utilizadas para inferências filogenéticas. Mutações ao longo do tempo resultam em eventos de especiação. Essas modificações recebem dois nomes: transições, que são substituições entre pirimidinas (T e C) ou entre purinas (A e G); e transversões, que são substituições entre uma purina e uma pirimidina e vice-versa. Considerando-se todas as possíveis substituições entre purinas e pirimidinas, há quatro tipos de transições e oito tipos de transversões (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática para os possíveis tipos de transição e transversão

Em geral, as transições são mais frequentes que as transversões, pois a substituição ocorre entre bases biologicamente mais semelhantes: entre purinas, com dois anéis de carbono, e entre pirimidinas, que possuem apenas um. Neste caso, a alteração afeta menos a conformação da molécula de DNA, passando mais facilmente pela maquinaria de reparo da célula. Além disso, a maior parte das transversões altera o aminoácido a ser codificado, sendo assim eliminadas por seleção negativa (DICKERSON, 1971).

Diferentes modelos foram propostos para estimar a probabilidade da ocorrência de substituição de nucleotídeos. Um dos mais simples, a distância p (p -distance), baseia-se apenas na porcentagem de bases discrepantes entre duas seqüências devidamente alinhadas. Além deste, dois modelos são bastante utilizados em análises de diversidade microbiana. O modelo Jukes-Cantor (JC), proposto por Jukes e Cantor em 1969, sugere que as taxas de substituição de nucleotídeos ocorrem em frequências iguais. Já o modelo de 2 parâmetros proposto por Kimura (1980), leva em consideração que as taxas de transição ocorrem em maior frequência que as taxas de transversão, dando a estas substituições valores diferenciados.

O modelo de substituição a ser escolhido influenciará diretamente na construção da árvore filogenética, devendo se dar grande ênfase nesta escolha. Um outro ponto a ser levado em consideração é que quanto mais parâmetros forem inseridos no modelo, maior será a variância associada à estimativa, ou seja, modelos com muitos parâmetros possuem muita acurácia, mas pouca precisão (LI, 1997).

2.1.9 Métodos de reconstrução filogenética

Há três métodos de reconstrução filogenética: o método de máxima parcimônia, o método de máxima verossimilhança e o método de distância. Um método para construir uma árvore pelo método de distância através do modelo de evolução mínima é o Neighbor-Joining (NJ) (SAITOU; NEI, 1987). Neste método, uma árvore é primeiramente construída em estrela. A seguir, é procurado um par de vizinhos que minimize a soma total dos ramos da árvore para formar um nó interno, sendo agora considerado como uma unidade taxonômica operacional (UTO) e sua distância, ou seja, a quantidade de dissimilaridade entre o par, é calculada. No próximo passo, é feito o mesmo procedimento para procurar o segundo par e formar uma nova UTO. O procedimento é então seguido até que toda a árvore em estrela tenha sido resolvida de maneira a minimizar a soma dos comprimentos dos ramos. O Neighbor-Joining é um método rápido e bastante eficaz na reconstrução da topologia correta.

Outro método de distância é o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) (SNEATH; SOKAL, 1973). Esse método constrói o cladograma de maneira semelhante ao NJ, entretanto ele assume que todas as linhagens evoluem a uma taxa constante de evolução, o que pode ser problemático em casos onde a taxa de substituição de nucleotídeos varia muito de uma espécie para outra.

O método de máxima parcimônia baseia-se no conceito de que a melhor explicação para a resolução das relações filogenéticas é a mais simples, ou seja, uma mutação é mais provável do que duas. Assim, a árvore formada é a que explica a filogenia envolvendo o menor número possível de eventos de especiação, onde menos mudanças ocorrem. Em variações do método, é possível a atribuição de pesos às mudanças, como por exemplo, na razão entre transição:transversão.

Já no princípio do método de máxima verossimilhança, o objetivo é procurar pelo modelo evolucionário que tem a melhor probabilidade de produzir os dados observados. A

verossimilhança é obtida pela soma das probabilidades de cada possível reconstrução das substituições sob um particular modelo de substituição. Uma árvore é considerada adequada quando as probabilidades são altas. Os resultados são muito dependentes do modelo de substituição escolhido, além disso, o método exige grande tempo computacional.

2.1.10 Teste de confiança

O método de *bootstrap* foi criado por Efron em 1979 e introduzido em análises filogenéticas por Felsenstein (1985). O fundamento do método consiste na reamostragem aleatória com reposição dos dados e construção de várias árvores filogenéticas. Em cada réplica, o número dos dados amostrados é o mesmo, porém algumas seqüências podem ser aleatoriamente amostradas mais de uma vez. Ao final de todas as réplicas, o valor de *bootstrap* revela a porcentagem de vezes que uma determinada topologia apareceu nas réplicas. Esse método revela a consistência dos dados.

2.1.11 Métodos de estimativa de riqueza de espécies

Métodos de estimativa de riqueza de espécies em um dado ambiente permitem a estimativa do aumento do número de espécies relativo ao número de amostras analisadas, ou seja, o quanto é necessário amostrar para que a amostra seja representativa e não redundante ou sub-representativa. Há dois modelos para estimativa de riqueza de espécies. Modelos paramétricos são recomendados para avaliar a abundância de UTOs em grandes amostras. Por outro lado, modelos não-paramétricos são utilizados para pequenas amostras, considerando a presença de espécies raras, como *singletons* e *doubletons*, que são, respectivamente, o número de espécies representadas por somente um e dois indivíduos (KEMP; ALLER, 2004).

O estimador não-paramétrico ACE (*Abundance-based Coverage Estimator*) é baseado no conceito de abundância e utiliza, para as estimativas de riqueza, espécies com dez ou menos indivíduos por amostra, sendo recomendado para amostras que apresentem uma maior abundância de indivíduos de uma mesma espécie. (LEE; CHAO, 1994). O estimador Chao1 é também baseado em abundância, entretanto utiliza a relação entre o número de *singletons* e *doubletons* para as estimativas de riqueza (COLWELL, 1997).

Esses estimadores são largamente utilizados em estudos de diversidade de microrganismos nos mais diferentes ambientes e proporcionam uma idéia do tamanho da comunidade presente no ambiente em estudo, mesmo sem a identificação de seus representantes. Venter et al. (2004) utilizaram essas ferramentas e estimaram uma população de mais de 1800 espécies de bactérias em amostras no Mar de Sargasso. Em ambientes também complexos, como em amostras de solos, a estimativa é que este número possa atingir valores de mais de 3000 espécies de microrganismos (TRINGE et al., 2005). Em amostras menos complexas estas estimativas são geralmente menores. Comunidades de bactérias formadoras de biofilmes em indústrias de cerveja foram estimadas também utilizando a técnica do seqüenciamento do gene 16S rDNA por Timke et al. (2005). Nesse estudo foram estimadas comunidades com 113 e 203 espécies presentes em biofilmes de duas indústrias. Esta estimativa foi próxima da encontrada por Gill et al. (2006) na identificação de bactérias presentes em canais de lactação de vacas produtoras de leite (81 UTOs) e destinadas a produção de carne (167 UTOs).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Coleta de amostras

Amostras de fermento sedimentado (pé-de-cuba) foram coletadas em um alambique no município de Monte Alegre do Sul – SP. Nesta propriedade, o preparo do fermento iniciador é realizado com a adição de milho triturado a aproximadamente 20 litros de caldo de cana-de-açúcar. Não há controle da identidade microbiana do inóculo e a fermentação ocorre naturalmente em um recipiente aberto de plástico. A cada dia, à medida que a fermentação aumenta, é adicionado mais caldo de cana-de-açúcar até que o fermento esteja preparado para suportar um volume maior de caldo a ser fermentado. Isso ocorre em aproximadamente 10 dias, quando então o fermento iniciador é transferido para uma dorna de aço inox, cujo volume é completado com caldo. As fermentações ocorrem sob temperatura ambiente em dornas abertas e o pé-de-cuba é trocado por um novo fermento a cada 30 dias.

As amostras foram obtidas em três coletas realizadas ao longo de 30 dias, sendo uma no primeiro dia de fermentação (NP), outra após 15 dias (NS) e a terceira após 30 dias de utilização do mesmo fermento (NT). Uma outra coleta (NA) foi realizada um ano anterior a estas no mesmo alambique para efeito comparativo. Todas as coletas foram realizadas ao término de cada dia de fermentação e após homogeneização do pé-de-cuba. Para cada amostra, foram coletados 100mL de pé-de-cuba dividido em dois tubos de 50mL, que foram transportados imersos em gelo para minimizar a alteração microbiana das amostras.

2.2.2 Extração de DNA das amostras e amplificação parcial do gene 16S rDNA

A extração de DNA foi adaptada do protocolo de Hoisington et al. (1994). As amostras foram transferidas para microtubos de 1,5mL e centrifugadas por 5 minutos a 13.000 rpm em microcentrífuga de bancada. Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se 600µL de solução CTAB (0,7M NaCl, 1% CTAB, 50mM Tris pH 8.0, 10mM EDTA, 0,1% 2-mercaptoetanol). As amostras foram incubadas a 65°C por 60 minutos, agitando os microtubos a cada 10 minutos. A seguir, acrescentou-se solução clorofórmio:álcool isoamílico (CIA) (24:1), na quantidade de 600µL por microtubo, seguido de uma nova centrifugação por 10 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo ao qual foi acrescentado 600µL de CIA,

seguido de nova centrifugação. Ao sobrenadante retirado, acrescentou-se 500µL de etanol 100%, mantendo os microtubos por uma hora a -20°C para precipitação do DNA. Após este período, os microtubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 12 minutos, ocorrendo assim a precipitação do DNA. O precipitado foi lavado com etanol 90% por 1 minuto e a seguir com etanol absoluto por mais 1 minuto. Em seguida, com o DNA seco e ressuspendido em 50µL de água estéril, realizou-se uma digestão a temperatura ambiente por 12 horas com 2µL da enzima RNase (1mg/mL) por amostra para degradação de RNA.

Para a amplificação parcial do gene ribossomal bacteriano 16S realizou-se uma reação da polimerase em cadeia (PCR) com as seguintes condições: 20ng de DNA; 2,5µL de tampão 10X (*Invitrogen Life Technologies*); 1U de ThermalAce DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies*); 1µL do iniciador universal 968 *forward* (5' AAC GCG AAG AAC CTT AC 3') e igual quantidade do iniciador 1401 *reverse* (5' CGG TGT GTA CAA GAC CC 3') (NUBEL et al., 1996) na concentração inicial de 5pmol; 0,2µL de dNTP (10mM) e quantidade de água Milli-Q suficiente para completar 25µL de reação. O programa de amplificação consistiu de 3 minutos de desnaturação a 94°C seguido de 25 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C e 1 minuto a 72°C. Após os 25 ciclos, realizou-se uma extensão final por 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR, com aproximadamente 430 pares de bases, foram purificados utilizando o kit GFX de purificação (*Amersham Biosciences*), conforme instruções do fabricante.

2.2.3 Clonagem e seqüenciamento do gene 16S rDNA

Para o seqüenciamento dos produtos da PCR, os fragmentos foram ligados em vetor pGEM *T-Easy Vector Systems*, conforme instruções do fabricante (*Promega*). Os plasmídeos foram transformados em *Escherichia coli* DH10β (*Invitrogen Life Technologies*) através de eletroporação utilizando aparelho Micro Pulser (*Bio Rad*) a 1,8kV por 4,5ms. As bactérias foram então transferidas para meio Luria Bertani (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%, ágar 1,8%) com 0,1% de ampicilina (100mg/mL), 0,03% de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósideo), na concentração de 100mM e 0,02% de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósideo), na concentração 20mg/mL. A extração dos plasmídeos para posterior seqüenciamento de seus insertos foi realizada pelo método da lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Na PCR realizada para o seqüenciamento, utilizou-se aproximadamente 400ng de DNA, 1µL do iniciador M13 *forward* (5'TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3') na concentração de 3,2pmol, 2µL de tampão *Save Money* (200mM de Tris-HCl pH 9 e 5mM de MgCl₂), 2µL do kit *Big Dye Terminator* (*Applied Biosystem*) e quantidade de água Milli-Q suficiente para completar 10µL de reação. O programa consistiu de 25 ciclos de 10 segundos à 96°C, 5 segundos à 50°C e 4 minutos à 60°C. Após a reação, o produto foi estocado sob refrigeração à 4°C. Os dNTPs não incorporados foram eliminados por precipitação com álcool isoamílico 75% e etanol 70% gelado.

Após a secagem completa do DNA, acrescentou-se 3µL da solução *Blue Dextran Loading Solution* (*Promega*). Depois de ressuspendido, a solução com DNA foi desnaturada a 95°C durante 5 minutos e imediatamente imersa em gelo até o momento do seqüenciamento, realizado em seqüenciador Prism ABI 377, conforme protocolo do fabricante (*Applied Biosystems*).

2.2.4 Determinação e análise das unidades taxonômicas operacionais

As seqüências foram analisadas pelos programas Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998; GORDON; DESMARAIS; GREEN, 2001). Seqüências com menos de 300 bases foram descartadas e somente seqüências com ao menos 200 bases com qualidade Phred igual ou maior a 20 (probabilidade de um erro para cada 1000 bases) foram utilizadas. As seqüências dos *primers* iniciadores foram identificadas e excluídas utilizando o programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>).

Uma análise prévia das seqüências foi realizada através do programa BlastN para identificação das mesmas junto ao banco de dados do Genbank e caracterização das amostras. Para a determinação das unidades taxonômicas operacionais (UTOs), as seqüências foram alinhadas através do programa CLUSTAL X, versão 1.81 (THOMPSON et al., 1997), utilizando os parâmetros “*gap-opening penalty*” de 10.0 e “*gap-extention penalty*” de 0.1. A matriz de distância evolutiva foi calculada através do programa DNADIST do *software* PHYLIP versão 3.63 (FELSENSTEIN, 1995) utilizando o modelo de Jukes-Cantor. Toda a definição de distância evolucionária utilizada para diferenciar espécies é arbitrária e controversa, entretanto, 3% de diferença ($D = 0.03$) para seqüências de 16S rDNA é considerada uma definição válida (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Assim, seqüências com 3% ou menos de diferença foram

agrupadas em uma mesma UTO através do programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005).

A identificação taxonômica das UTOs foi determinada através do programa *Bayesian Sequence Classifier* do banco de seqüências ribossomais do *Ribosomal Database Project II* (RDP II) (<http://rdp.cme.msu.edu/>). Esse programa classifica taxonomicamente as seqüências de acordo com o padrão do Manual de Sistemática Bacteriológica Bergey. A saída do programa RDP II é estruturada de acordo com os níveis taxonômicos encontrados, fornecendo, desta maneira, uma visão bastante abrangente dos organismos presentes na amostra. Este classificador utiliza um limite de confiança de 80%. Quando possível, as UTOs foram identificadas em nível de espécie através de comparação de similaridade com seqüências de outros organismos depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio do programa BlastN (ALTSCHUL, et al., 1990). Segundo López et al. (2006), a identificação das bactérias em nível de espécie pode ser inferida quando a seqüência do fragmento, comparada a outras seqüências de 16S rDNA, apresentar valores acima de 97% de similaridade.

Para as estimativas de riqueza de espécies, as UTOs, além das identificadas anteriormente, foram também determinadas separadamente por amostra. As estimativas de riqueza foram realizadas pelo programa SPADE (*Species Prediction and Diversity Estimation*) (CHAO; SHEN, 2003) utilizando os métodos não-paramétricos ACE e Chao 1. Os índices de diversidade de Shannon, o recíproco de Simpson, para identificação de presença de UTOs dominantes na amostra, e a cobertura de amostragem dos clones seqüenciados foram também calculados através do programa SPADE.

As seqüências das bibliotecas de cada amostra foram analisadas quanto ao grau de diferenças significativas entre elas pela comparação de suas curvas homólogas, através do programa S-LIBSHUFF (SCHLOSS; TARGET; HANDELSMAN, 2004). Nesta análise, as curvas homólogas das amostras, formadas pela relação entre as distâncias evolutivas e as coberturas de amostragem, são comparadas, sendo calculadas as diferenças entre os pontos equivalentes das curvas.

Para a construção da árvore filogenética foram selecionadas apenas as UTOs de *Lactobacillus* não identificadas em nível de espécie pelos procedimentos descritos anteriormente. Seqüências referências de espécies de *Lactobacillus* depositadas no GenBank foram incluídas na análise. A seqüência do grupo externo, representado por *Sulfolobus acidocaldarius*, também foi

extraída do GenBank. Todas as seqüências foram alinhadas através do programa CLUSTAL W, com os mesmos parâmetros anteriores. Relações filogenéticas entre as espécies foram determinadas utilizando 1000 réplicas para cálculo de valor de *bootstrap*, tanto pelos métodos de distâncias Neighbor-Joining e UPGMA, através dos modelos de substituição de Kimura 2-parâmetros, Jukes-Cantor e *p-distance*, como pelo método de máxima parcimônia, utilizando o programa MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) versão 3.1 (KUMAR; TAMURA; NEI, 2004).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Análises das seqüências de 16S rDNA

Foram analisadas, através do programa BlastN, 707 seqüências com média de 430 bases cada. Destas, 120 foram identificadas como sendo de cloroplasto de cana-de-açúcar e o restante como de bactérias, sendo que, destas, 560 foram identificadas como de bactérias cultivadas e 27 foram identificadas como de bactérias não conhecidas. Ao todo, foram identificados por esta análise 17 gêneros e 17 espécies. Apenas a espécie *Lactobacillus brevis* foi encontrada nas quatro amostras. As espécies *L. hilgardii*, *L. casei* e *Leuconostoc mesenteroides* foram identificadas em três amostras.

Pelas análises de similaridade pelo programa BlastN, a amostra NA, apesar do menor número de seqüências, apresentou o maior número de gêneros (10), e espécies (10). Na amostra NP, foi identificada a menor diversidade, com 4 gêneros e 7 espécies, predominantemente composta por *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus spp.*, além de 3 bactérias não conhecidas. Na amostra NS, 5 gêneros foram identificados, representados por 7 diferentes espécies, onde a espécie *Lactobacillus hilgardii* esteve presente em um número muito elevado em relação às outras, representando quase metade da amostra. Também nesta amostra, não foi possível a identificação de um grande número de bactérias: 16, sendo que, destas, 6 seqüências foram relacionadas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. A amostra NT apresentou 5 gêneros e 8 espécies, sendo que, dessas, 4 espécies foram predominantes: *Lactobacillus brevis*, *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Leifsonia xyli* e *Lactobacillus hilgardii*, respectivamente. Nesta amostra, apenas duas seqüências foram identificadas como de bactérias desconhecidas.

2.3.2 Análises das unidades taxonômicas operacionais

As 587 seqüências de bactérias foram classificadas em 170 UTOs através do programa DOTUR. Estas foram representadas por um número variável de seqüências, conforme Tabela 4.

Tabela 4 – Número de seqüências representativas de UTOs

Número de UTOs	Número de seqüências
6	26 - 62
6	10 - 14
12	5 - 9
9	3 - 4
23	2
114	1

Das 170 UTOs caracterizadas taxonomicamente através dos programas RDP *Bayesian Sequence Classifier* e BlastN, não foi possível a classificação em nível de Filo de 7 UTOs. As demais foram divididas em três Filos: *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Chlamydiae*, conforme apresentado na Tabela 5. Duas Classes destacaram-se nas amostras: *Bacilli*, com 435 seqüências em 123 UTOs; e *Actinobacteria*, com 119 seqüências em 33 UTOs.

Análises filogenéticas das UTOs de *Lactobacillus* não identificadas em nível de espécie realizadas com diferentes métodos revelaram resultados semelhantes. A árvore foi representada pelo método de UPGMA–JC, conforme Figura 2.

Tabela 5 – Número e identidade de UTOs de bactérias contaminantes de fermento para produção de cachaça identificadas através dos bancos de dados RDP e GenBank (continua)

Taxonomia*						Nº de UTOs
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie	
<i>Chlamydiae</i>	<i>Chlamydiae</i>	<i>Chlamydiales</i>	<i>Parachlamydiaceae</i>	<i>Parachlamydia</i>	Não identificada	2
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Lactobacillales</i>	<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	11
					<i>hilgardii</i>	11
					<i>casei</i>	5
					<i>plantarum</i>	5
					<i>acetotolerans</i>	1
					<i>spicheri</i>	1
					Não identificada	65
				Não identificado	-	2
			<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	6
					<i>citreum</i>	4
					Não identificada	4
				<i>Weissella</i>	<i>cibaria</i>	1
			<i>Streptococcaceae</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	1
			Não identificada	-	-	2
		Não identificada	-	-	-	2
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Dermabacteraceae</i>	<i>Brachybacterium</i>	Não identificada	1
			<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Curtobacterium</i>	<i>flaccumfaciens</i>	5
					Não identificada	9
				<i>Leifsonia</i>	<i>xyli</i>	6
					Não identificada	6
				<i>Microbacterium</i>	Não identificada	1
			<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>acidipropionici</i>	1

Tabela 5 – Número e identidade de UTOs de bactérias contaminantes de fermento para produção de cachaça identificadas através dos bancos de dados RDP e GenBank (conclusão)

Taxonomia*						Nº de UTOs
Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie	
<i>Firmicutes</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomycetales</i>	<i>Streptomyetaceae</i>	Não identificado	-	1
			Não identificada	-	-	2
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bifidobacteriales</i>	<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>psychroaerophilum</i>	1
		<i>Rhodobacterales</i>	<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Amaricoccus</i>	<i>tamworthensis</i>	1
		Não identificada	-	-	-	1
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	Não identificada	1
				<i>Cupriavidus</i>	Não identificada	1
	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Buttiauxella</i>	<i>izardii</i>	1
				<i>Kluyvera</i>	Não identificada	1
		<i>Xanthomonadales</i>	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>albineans</i>	1
Não identificado	-	-	-	-	-	7
Total						170

* Identidade das UTOs obtida através de comparação com seqüências ribossomais de outros organismos depositadas nos bancos de dados do RDP Classifier e GenBank.

Figura 2 - Árvore filogenética de UTOs do gênero *Lactobacillus* não identificadas em nível de espécie. A sequência 16S rDNA de *Sulfolobus acidocaldarius* serviu como um grupo externo e as de espécies de *Lactobacillus* serviram como referências. O número em cada ramificação do cladograma representa a porcentagem de réplicas iguais dentro de 1.000 réplicas de *bootstrap* usados para a análise do cladograma pelo método UPGMA, utilizando o modelo de substituição de Jukes-Cantor

Um número semelhante de UTOs foi encontrada nas quatro amostras, com um total de 43, 38, 57 e 38, na amostra referência (NA), na primeira (NP), na segunda (NS) e na terceira amostra (NT), respectivamente. Destas, 152 UTOs estavam presentes em uma única amostra. Do restante, apenas dezessete foram identificadas duas vezes em diferentes amostras e somente uma, representada por 10 seqüências de *Lactobacillus hilgardii*, foi identificada três vezes, sendo comum nas amostras NA, NS e NT. As amostras NS e NT compartilharam o maior número de UTOs, conforme Tabela 6.

Tabela 6 – Número de UTOs comuns entre amostras

Amostra	Amostras			
	NA	NP	NS	NT
NA	-	1	1	3
NP	-	-	3	2
NS	-	-	-	9

A estimativa da riqueza de UTOs nas amostras, utilizando uma distância evolutiva de 0.03 pelo estimador ACE, revelou os seguintes valores: 177 UTOs para a amostra NA, 76 para NP, 173 para NS e 129 para NT, com uma porcentagem de cobertura de 59%, 89%, 76% e 85%, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 7. As estimativas de riqueza de UTOs, através dos métodos não-paramétricos ACE a Chao 1, revelou ainda que não houve diferença significativa (intervalo de confiança de 95% de probabilidade) em relação ao número de UTOs entre as amostras.

Tabela 7 – Estimativa de riqueza de UTOs identificadas nas quatro amostras e seus respectivos índices de diversidade e porcentagem de cobertura

Amostra	Estimativa de riqueza de UTOs				Índices de diversidade		
	NSeq	NU	ACE	Chao 1	Shannon	1/D	ECA
NA	81	43	177 (98; 368)	179 (88; 456)	3.340 (3.122; 3.558)	17,49 (30,21; 12,31)	0.593
NP	177	38	76 (54; 132)	67 (47; 125)	2.658 (2.449; 2.867)	6,82 (13,34; 4,58)	0.887
NS	159	57	173 (109; 313)	129 (87; 230)	3.055 (2.804; 3.305)	7,63 (16,42; 4,97)	0.761
NT	170	38	129 (72; 277)	194 (77; 672)	2.723 (2.534; 2.913)	9,00 (16,24; 6,22)	0.853
Todas	587	170	519 (391; 720)	453 (333; 660)	4.107 (3.984; 4.230)	25,95 (37,33; 19,88)	0.806

NA: coleta referência, amostrada um ano anterior às demais; NP: coleta ao final do primeiro dia de fermentação; NS: coleta após quinze dias utilizando o mesmo fermento; NT: coleta ao final de trinta dias utilizando o mesmo fermento. NSeq: número de seqüências por amostra; NU: número de UTOs identificadas pelo programa DOTUR. ECA: estimativa da porcentagem de cobertura da amostra. Shannon: estimador de máxima semelhança. 1/D: estimador de máxima semelhança de Simpson, recíproca do índice. Valores entre parênteses representam o intervalo com 95% de confiança.

Para o índice de Shannon, conforme apresentado na Tabela 7, não foram observadas diferenças significativas entre níveis de diversidade de espécies das amostras NA e NP e das amostras NA e NT. Entretanto, a amostra NA apresentou um maior índice de diversidade que as outras amostras, mas que não foi significativamente diferente da amostra NS. Esse resultado foi similar ao encontrado nas análises de identidade das seqüências, através do programa BlastN, onde a amostra NA apresentou uma maior diversidade de espécies em relação às demais e a amostra NS apresentou um elevado número de bactérias não cultivadas.

A amostragem do trabalho foi representativa, com uma boa cobertura por amostra, em média 77%. A amostra NA apresentou o menor valor, com 59% de porcentagem de cobertura. Além do menor número de clones seqüenciados, a maior diversidade da amostra NA contribuiu para este resultado.

Os valores para a recíproca de Simpson não foram significativamente diferentes entre as amostras em relação à presença de UTOs dominantes nas comunidades bacterianas. Os resultados revelaram que todas as amostras apresentaram comunidades bem diversificadas e poucas UTOs representadas por grandes quantidades de seqüências.

As análises estatísticas através do programa S-LIBSHUFF revelaram que todas as amostras diferiram significativamente umas das outras ($p < 0.05$) em comparação com suas curvas homólogas. Esse resultado indica que as comunidades bacterianas das amostras são qualitativamente diferentes umas das outras.

2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 Diversidade bacteriana nas amostras de fermento

Bactérias não conhecidas foram encontradas em pequeno número nas amostras: aproximadamente 5% do total. Isto se deve ao fato das dornas de caldo de cana-de-açúcar fermentado não constituírem um ambiente muito complexo, quando comparado com amostras ambientais onde, por exemplo, a porcentagem de bactérias desconhecidas é de quase 99% (STALEY; KONOPKA, 1985).

A quantidade de seqüências de cloroplasto (17% do total), reduziu a quantidade de bactérias identificadas nos fermentos, principalmente na amostra NA, onde metade da amostra foi assim identificada. Este resultado deve-se ao fato de cloroplastos possuírem o gene 16S rDNA. Segundo a teoria endossimbiônica, uma primitiva cianobactéria teria invadido uma célula eucariótica e passado a viver em simbiose com esta célula (MERESCHKOWSKY, 1905). Como o gene 16S rDNA possui regiões muito conservadas, essa condição foi preservada no DNA dessa organela, sendo assim detectada pelo *primer* utilizado para amplificação dos fragmentos. Sua grande concentração na amostra NA pode ter sido ocasionada pelo fato deste fermento possuir uma quantidade menor de bactérias em relação às outras amostras, uma vez que todas foram coletadas de maneira semelhante. Assim, a alta quantidade de seqüências de cloroplastos seria detectada em três etapas durante o preparo das amostras: PCR, ligação e transformação. Na primeira etapa, quanto maior a presença de DNA de um determinado organismo, maior será a probabilidade deste ser amplificado. Na segunda, há uma competição entre os fragmentos amplificados durante a PCR para se ligarem ao vetor. E finalmente na terceira etapa, há uma competição entre os insertos para serem inseridos nas células competentes. Assim, quanto maior a quantidade de determinado DNA, maior será a probabilidade deste ser amplificado, ligado ao vetor e inserido na célula competente, e assim selecionado para ser seqüenciado, o que explica a possibilidade da amostra possuir um menor número de bactérias em relação às outras amostras.

As estimativas de riqueza de UTOs para as amostras não foram significativamente diferentes em número de UTOs. Todas apresentaram uma elevada estimativa, em média 132 UTOs, segundo o estimador ACE. Entretanto, foi observado, através dos resultados das análises do programa S-LIBSHUFF, que as amostras apresentaram diferenças significativas entre elas em

relação à composição das comunidades a cada ciclo fermentativo. Esta variedade de espécies encontradas nas diferentes amostras comprovou que há uma variação dinâmica na composição contaminante durante a fermentação e conseqüente ausência de padronização microbiológica do processo (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; KAJI; CANHOS, 1989; GALLO, 1989, 1992; SCHWAN et al., 2001). A identificação de certas UTOs comuns às amostras indica que algumas espécies bacterianas são freqüentes, sendo até mesmo identificadas num período ao longo de um ano, como foi observado entre a amostra NA e as demais. Isto sugere que possa haver, apesar da dinâmica e da diversidade, uma certa constância de algumas espécies na sucessão das comunidades bacterianas presentes no fermento.

Os resultados revelaram ainda a presença de bactérias ainda não descritas na literatura neste ambiente e espécies não conhecidas da comunidade bacteriana associados a fermentos para produção de cachaça. Com estes resultados, conclui-se que a comunidade bacteriana contaminante é muito maior, mais dinâmica e complexa que a relatada na literatura.

2.4.2 Contaminantes do fermento de cachaça e relação a outros processos fermentativos

As análises de identidade das seqüências através do programa BlastN revelaram que as bactérias ácido-láticas estavam presentes em quantidades abundantes. Essas bactérias fermentam glicose e produzem ácido láctico como seu principal produto do metabolismo (LIU, 2003), reduzindo desta maneira o rendimento da fermentação alcoólica. Entre as bactérias, destacaram-se os gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, encontrados em todas as amostras em grande número e diversidade de espécies.

Como em trabalhos anteriores (ALTHERTUM et al., 1984; GALLO, 1989; YOKOYA, 1991; GALLO, 1992; OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994), o gênero *Lactobacillus* predominou nas amostras, respondendo por aproximadamente 66% das seqüências, sendo que, destas, não foi possível a identificação em nível de espécie de 32%. Foram detectadas duas espécies deste gênero (*L. acetotolerans* e *L. hilgardii*) ainda não descritas em fermentos de cana-de-açúcar. O gênero *Lactobacillus*, além ser comum em ambientes ricos em açúcares e propícios à fermentação, possui a característica de adaptar-se ao meio, sendo algumas espécies mais resistentes ao álcool presente ao final da fermentação (GOLD et al., 1992), o que explica a maior quantidade e diversidade de espécies identificadas nas amostras em relação aos outros gêneros.

Espécies de *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum* e *L. brevis* haviam sido descritas na literatura como contaminantes de dornas de fermentação de cachaça (OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994; SCHWAN et al., 2001). Entretanto, a grande maioria das bactérias presentes nas amostras não havia sido descrita neste ambiente, mas sim relacionadas com fermentação de outras bebidas alcoólicas e alimentos fermentados, como *Lactobacillus acetotolerans*, identificado em silagens (CAI et al., 1999), queijo (BARUZZI et al., 2000) e em *pulque*, uma bebida alcoólica mexicana (ESCALANTE et al., 2004); *Lactobacillus hilgardii*, em *pulque* (ESCALANTE et al., 2004), queijos (BARUZZI et al., 2000) e em vinhos (RODAS; FERRER; PARDO, 2005); *Leuconostoc citreum*, identificado em *kimchi*, um alimento a base de repolho fermentado (CHOI et al., 2003), *shochu*, uma bebida destilada japonesa (ENDO; OKADA, 2005) e em leites fermentados na África do Sul (BEUKES; BESTER; MOSTERT, 2001); *Weissella cibaria*, isolada de cana de açúcar e comidas fermentadas típicas da Malásia (BJORKROTH et al., 2002). Esses resultados revelaram que as comunidades bacterianas presentes nestes processos fermentativos são bastante semelhantes, independentes da matéria-prima utilizada, e caracterizadas pela presença de espécies ácido-láticas, principalmente dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella*. Muitas espécies desses gêneros possuem a característica de serem resistentes a baixos valores de pH e a altas concentrações de álcool (HUHTAMELLA et al., 2007), o que explica a presença e ampla distribuição em diferentes processos fermentativos tanto alcoólicos quanto lácticos.

Skinner e Leathers (2004), em um trabalho semelhante na identificação de bactérias contaminantes em dornas de milho fermentado para produção de álcool, encontraram uma população bacteriana semelhante a este trabalho, os quais compartilharam nove espécies e seis gêneros em comum e uma comunidade também predominante em *Lactobacillus*. Resultados semelhantes também foram observados para outras amostras de fermentação alcoólica, como em *pulque* (ESCALANTE et al., 2004), *shochu* (ENDO; OKADA, 2005), *whisky* (van BEEK; PRIEST, 2003). Esses resultados revelam que há um padrão de espécies participando da fermentação alcoólica nos mais variados processos.

A comunidade microbiana presente na fermentação é responsável pela produção de compostos secundários, como álcoois, aldeídos, ácidos orgânicos e ésteres. Estes compostos, em quantidades equilibradas, são responsáveis pela formação do sabor e aroma do produto (*bouquet*), (PACKOWSKI, 1978). Bactérias ácido-láticas heterofermentativas, como *Lactobacillus*

acetotolerans, *L. hilgardii*, *L. brevis* e *Leuconostoc mesenteroides* (STILES; HOLZAPFEL, 1997), além de ácido láctico podem produzir CO₂, etanol, manitol, ácido acético e pequenas quantidades de acetaldeídos, que muito provavelmente contribuem para a composição química final da bebida (ESCALANTE et al., 2004).

Segundo Schwan et al. (2001), espécies de *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Propionibacterium* contribuem para a formação do *bouquet* da cachaça, entretanto em grandes quantidades são considerados prejudiciais. Geddes e Riffkin (1989), em um estudo sobre a influência de bactérias lácticas na fermentação para produção de *whisky*, observaram que a presença de *Lactobacillus* durante a fermentação é também essencial para o desenvolvimento do *bouquet* desta bebida. Qualitativamente, os componentes do aroma da cachaça são os mesmos encontrados nas demais bebidas alcoólicas fermentadas e destiladas. Em diversos aspectos, a fermentação é mais determinante do que a matéria-prima na formação dos componentes secundários da bebida (MAIA, A., 1994). Nestes casos, a presença de bactérias durante a fermentação, em quantidades equilibradas, poderia não ser considerada como um elemento contaminante e sim como um componente fundamental para a qualidade final da bebida. Entretanto, não há muitas informações em relação à composição e concentração desses microrganismos para uma contribuição positiva na fermentação para produção de cachaça. Assim, sugere-se uma maior diversidade de estudos nesta área para a melhor compreensão da relação entre os microrganismos envolvidos no processo fermentativo e a qualidade química final da bebida produzida.

As bactérias *Leifsonia xyli* e *Curtobacterium flaccumfaciens* são endofíticas naturais de cana-de-açúcar (DAVIS et al., 1980; MAGNANI, 2005) e foram encontradas em grandes quantidades nas amostras NS (42%) e NT (64%). A presença destes microrganismos sugere que o caldo de cana-de-açúcar pode ser um ambiente propício para seu crescimento, apesar de ainda não haver relatos deste fato. Neste caso, esses microrganismos estariam influenciando no processo fermentativo, principalmente pelo fato de estarem presentes em quantidades abundantes.

A topografia da árvore, representada na Figura 2, revelou a distribuição das espécies de *Lactobacillus* não identificadas juntas à algumas espécies conhecidas. Esta distribuição permitiu a observação de seqüências que apresentaram relações filogenéticas próximas com as espécies conhecidas utilizadas como referências. Nesta análise também foi possível observar seqüências filogeneticamente distantes das bactérias referências utilizadas. Pela distribuição dessas

seqüências, infere-se a possibilidade da presença de novas espécies de *Lactobacillus* na amostra, uma vez que não foi possível a identificação em nível de espécie pelos bancos de dados.

A utilização do método de seqüenciamento do gene 16S rDNA para identificação de bactérias presentes nas amostras de fermento de cachaça permitiu a identificação de bactérias ainda não descritas neste ambiente e a presença de bactérias não conhecidas. Os resultados ampliaram o conhecimento sobre os microrganismos presentes neste tipo de fermentação. Este trabalho deverá guiar futuros estudos que visem à compreensão da contribuição desses microrganismos para a qualidade organoléptica da cachaça. Além disso, o conhecimento do papel desses microrganismos ajudará a preservar o modo de preparo artesanal do produto que a cada dia é mais valorizado sendo caracterizado pela diversidade de microrganismos durante a fermentação.

3 CONCLUSÕES

O gênero *Lactobacillus* foi dominante em todas as amostras.

Foi encontrada uma maior diversidade de bactérias em relação a outros trabalhos e a presença de novas espécies em fermentos para produção de cachaça.

Revelou-se que a sucessão da comunidade bacteriana contaminante ocorre de uma forma muito dinâmica em condições de reutilização de um mesmo fermento para vários ciclos fermentativos.

A composição da comunidade bacteriana identificada foi semelhante às comunidades encontradas em trabalhos com produtos fermentados, sugerindo haver um padrão desses microrganismos participando nos mais diferentes processos fermentativos.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, A. R.; ROSSI, P. ; HORII, J. ; BÍSCOLA, V. . Cultivo misto de levedura e bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18., 2002, Porto Alegre. **Anais ...** Porto Alegre, SBCTA, 2002, p 52.

ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, D.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB**. Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v.3, n.1, p.42-49, 1984.

ALTSCHUL, S.F; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v.215, p.403-410, 1990.

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; CAMPOS, H. Infecção, problema sério na produção de álcool. **STAB**. Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, p.158-168, 1981.

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool e Açúcar**, São Paulo, v.2, n.5, p.12-18, 1982.

ASSOCIAÇÃO MINEIRA DOS PRODUTORES DE CACHAÇA DE QUALIDADE – AMPAQ. Disponível em: <<http://www.ampaq.com.br>>. Acesso em 16 nov. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Decreto nº 2.314 de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 171, seção I, p.19556, 1997.

_____. Decreto nº 4851 de 02 de outubro de 2003. Altera dispositivos do regulamento aprovado pelo decreto 2.314, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas de 4 de setembro de 1997, **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 6, 2003.

_____. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para Aguardente de Cana e para Cachaça. **Diário Oficial da União**, Brasília, s. 1, p. 3, 2005.

BARUZZI, F.; MOREA, M.; MATARANTE, A.; COCCONCELLI, P.S. Changes in the *Lactobacillus* community during ricotta forte cheese natural fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, p. 807-814, 2000.

BEUKES, E.M.; BESTER, B.H.; MOSTERT, J.F. The microbiology of South African traditional fermented milks. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 63, p. 189-197, 2001.

BJORKROTH, K.J.; SCHILLINGER, U.; GEISEN, R.; WEISS, N.; HOSTE, B.; HOLZAPFEL, W.H.; KORKEALA, H.J.; VANDAMME, P. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Berks, v. 52, p.141-148, 2002.

CAI, Y.; KUMAI, S.; OGAWA, M.; BENNO, Y.; NAKASE, T. Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n.7, p. 2901–2906, 1999.

CHAO, A.; SHEN, T.J. 2003. **Program SPADE**: Species Prediction and Diversity Estimator. Disponível em: <<http://chao.stat.nthu.edu.tw/softwareCE.html>>. Acesso em: 02 abr. 2007.

CHOI, I.K.; JUNG, S.H.; KIM, B.J.; PARK, S.Y.; KIM, J.; HAN, H.U. Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimchi, a fermented cabbage product. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.84, n.4, p. 247-53, 2003.

COLWELL, R.K. 1997. **EstimateS**: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Versão 5. Disponível em: <<http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>>. Acesso em: 13 fev. 2007.

DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G.; HARRIS, R.W.; LAWSON, R.H. Ratoon stunting disease of sugarcane: isolation of the causal bacterium. **Science**, Washington, v. 210, p.1365-1367. 1980.

DICKERSON, R.E. The structure of cytochrome c and the rates of molecular evolution. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 1, p. 26-45, 1971.

EFRON, B. Bootstrap methods. **Annals of Statistics**, Philadelphia, v. 7, p. 1-26, 1979.

ENDO, A.; OKADA, S. Monitoring the lactic acid bacteria diversity Shochu fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Orlando, vol. 99, n.3, p. 216-221, 2005.

ESCALANTE, A.; RODRÍGUEZ, M.E; MARTÍNEZ, A; LÓPEZ-MUNGUÍA, A; BOLÍVAR, F; GOSSET, G. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.235, p. 273-279, 2004.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using Phred I and Phred II. Accuracy assessment and error probabilities. **Genome Research**, Long Island, v. 8, p.175-185, p. 186-194, 1998.

FEDERAÇÃO NACIONAL DAS ASSOCIAÇÕES DE PRODUTORES DE CACHAÇA DE ALAMBIQUE - FENACA. Disponível em: < <http://www.fenaca.org.br>>. Acesso em: 12 jan. 2004.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approaching using the bootstrap. **Evolution**, Washington, v.39, p. 783-791, 1985.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP**: Phylogeny Inference Package. Version 3.61. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 1995.

FRANCO, C. De gole em gole, a cachaça ganha mercado. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 24 fev. 2002. Economia, p.b-12.

GALLO, C.R.. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. 1989. 388 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1989.

GALLO, C.R. Identificação de bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **STAB**. Açúcar, Alcool e Subprodutos, Piracicaba, v.2, p.30-34, 1992.

GEDDES, P.A.; RIFFKIN, H.L. Influence of lactic acid bacteria on aldehyde, ester and higher alcohol formation during Scotch whisky fermentation. In: PIGGOT, J.R.; PATERSON, A. (Ed.). **Distilled beverage flavours**. Chichester: Ellis Horwood, 1989. chap. 17, p. 193-199.

GILL, J.J.; SABOUR, P.M.; GONG, J.; YU, H.; LESLIE, K.E.; GRIFFITHS, M.W. Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v.56, n.3, p.471-481, 2006.

GOLD, R.S.; MEAGHER, M.M.; HUTKINS, R.; CONWAY T. Ethanol tolerance and carbohydrate metabolism in *Lactobacilli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.10, n.1, p. 45-54, 1992.

GORDON, D.; DESMARAIS, C.; GREEN, P. Automated Finishing with Autofinish. **Genome Research**, Long Island, v.11, n.4, p.614-625, 2001.

HOISINGTON, D.; KAIRHALLAH, M.; GONZALEZ-DE LEON, D. 2nd ed. **Laboratory protocols**. México: D. F. CIMMYT, 1994. 51p. (Applied Molecular Genetics Laboratory).

HONGO, Y.; YUZAWA, H.; OHKUMA, M.; KUDO, T. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v.221, p.299-304. 2003.

HUGENHOLTZ, P. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. **Genome Biology**, London, v.3, n.2, 2002.

HUHTAMELLA, S.; LEINONEN, M.; NIEMINEN, T.; FAHNERT, B.; MYLLYKOSKI, L.; BREITENSTEIN, A.; NEUBAUER P. RNA-based sandwich hybridisation method for detection of lactic acid bacteria in brewery samples. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.68, p.543-553, 2007.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R.. Evolution of protein molecules. In: MUNRO H. N. (Ed.) **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969. chap.24, v.3, p. 21-132.

KAJI, D.A.; CANHOS, V.P. Contaminantes do processo de produção de açúcar e álcool. In: EGUCHI, S.Y.; YOKOYA, F.; CANHOS, V.P.; GALLO, C.R. **Pontos críticos microbiológicos em usinas de açúcar e álcool**. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”.1989. cap.1, p.1-9.

KEMP, P.F.; ALLER, J.Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v.47, p.161-177, 2004.

KHAN, A.R.; HOQ, M.M. Lactic acid bacteria as contaminant in alcohol fermentation. **Bangladesh Journal of Microbiology**, Dacca, v.7, n.2, p.119-121, 1990.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, p.111-120, 1980.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v.5, n.2, p.150-163, 2004.

LAMBAIS, M.R.; CROWLEY, D.E.; CURY, J.C.; BÜLL, R.C.; RODRIGUES, R.R. Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic Forest. **Science**, Washington, v.312, p.1917, 2006.

LEE, S.M.; CHAO, A . Estimating population size via sample coverage for closed capture-recapture models. **Biometrics**, Arlington, v.50, p.88-97, 1994.

LI, W.H. **Molecular evolution**. Sunderland: Sinauer Associates. 1997. 84 p.

LIU, S.Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.83, p.115–131, 2003.

LÓPEZ, M.A.; SERNA, F.J.Z.D.; JAN-ROBLERO, J.; ROMERO, J.M.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Phylogenetic analysis of a biofilm bacterial population in a water pipeline in the Gulf of Mexico. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v.58, p.145-154, 2006.

MAGNANI, G.S. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana-de-açúcar**. 2005. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MAIA, A.B. Componentes secundários da aguardente. **STAB**. Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v.12, n.6, jul./ago., 1994.

MAIA, F.S. **Alternativas para exportação de cachaça**: um exemplo da Alemanha. Lavras. Universidade Federal de Lavras, 2002. (Boletim Técnico, n.57).

MERESCHKOWSKY, C. Über Natur und Ursprung der Chromatoporen im Pflanzenreiche. **Biologisches Centralblatt**, Berlin, v.25, p.593–604, 1905.

MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; LINARDI, V.R.; PATARO, C.; MAIA, A.B.R.A. Characterization and succession of yeast populations associated with spontaneous fermentations during the production of the Brazilian sugar-cane aguardente. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v.13, p. 241-243, 1997.

NÓBREGA, I.C.C. Análise dos compostos voláteis da aguardente de cana por concentração dinâmica do "headspace" e cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.2, p.210-216, 2003.

NOVAES, F.V. Testes e análises realizados para assegurar a qualidade da aguardente brasileira. **Engarrafador Moderno**, São Caetano do Sul, v.4, n.2, p.79-81, 1996.

NUBEL, U. ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.178, n.19, p.5636–5643, 1996.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v.10, p.697- 699, 1994.

PACKOWSKI, G.W. Beverage spirits, distilled. In: KIR-OTHMER (Ed.) **Encyclopedia of chemical technology**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons, 1978. v.3, p.830-863.

PATARO, C.; SANTOS, A.; CORREA, S.R.; MORAIS, P.B.; LINARDI, V. R.; ROSA, C.A. Physiological characterization of yeasts isolated from artisanal fermentation in an aguardente distillery. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, n.29, p.69-73, 1998.

PATARO, C.; GUERRA, J.B.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L.; MENDONÇA-HAGLER, L.C.; LINARDI, V.R.; ROSA, C.A. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.89, Issue 1, p.24, 2000.

PROGRAMA BRASILEIRO DE DESENVOLVIMENTO DA CACHAÇA - PBDAC. Disponível em: <<http://www.pbdac.com.br>>. Acesso em: 18 abr. 2006.

RANTSIOU, K.; DROSINOS, E.H.; GIALITAKI, M.; METAXOPOULOS, I.; COMI, G.; COCOLIN, L. Use of molecular tools to characterize *Lactobacillus* spp. isolated from Greek traditional fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.112, p. 215-222, 2006.

RONDON, M.R.; GOODMAN, R.M.; HALDESMAN, J. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. **Trends in Biotechnology**, London, v.17, p.403-409, 1999.

RODAS, A.M; FERRER, S; PARDO, I. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v.55(Pt 1), p.197-207, 2005.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.4, p.406-25, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.3. 1659 p.

SCHLOSS, P.; LARGET, B.R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.9, p.5485-5492, 2004.

SCHLOSS, P.; HANDELSMAN, J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n.3, p.1501-1506, 2005.

SCHWAN, R.F.; MENDONÇA, A.T.; SILVA-JR, J.J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A.E. Microbiology and physiology of Cachaça (Aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v.79, p.89-96, 2001.

SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.F.; BERTOZO, M.T.; VICENTE, A.L. Contaminação da fermentação alcoólica: floculação do fermento. **Brasil Açucareiro**, Rio de Janeiro, v.93, n.6, p.336-341, 1979.

SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.31, p.401-408, 2004.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: W.H. Freeman, 1973, 573 p.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P.A.D.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M.C.J.; NESME, X.; ROSSELLÓ-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H.G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Berks, v.52, p.1043-1047, 2002.

STALEY, J.T.; KONOPKA, A. Measurement of in situ activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.39, p.321-346, 1985.

STILES, M.E; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.36, p.1- 29, 1997.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.22, p.4673–4680, 1994.

THOMPSON, J.D., GIBSON,T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, n.24, p.4876-4882, 1997.

TIMKE, M.; WANG-LIEU, N.Q.; ALTENDORF, K.; LIPSKI, A. Community structure and diversity of biofilms from a beer bottling plant as revealed using 16S rRNA gene clone libraries. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.71, p.6446-6452, 2005.

TRINGE, S.G.; VON MERING, C.; KOBAYASHI, A.; SALAMOV, A.A.; CHEN, K.; CHANG, H.W.; PODAR, M.; SHORT, J.M.; MATHUR, E.J.; DETTER, J.C.; BORK, P.; HUGENHOLTZ, P.; RUBIN, E.M. Comparative Metagenomics of Microbial Communities. **Science**, Washington, v.308, n.5721, p.554-557, 2005.

VAN BEEK, S.; PRIEST, F.G. Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.5322-5328, 2000.

VAN BEEK, S.; PRIEST, F.G. Bacterial diversity in Scotch whisky fermentations as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, St. Paul, v.61, n.1, p.10-14, 2003.

VENTER, J.C. et. al. Environmental genome ghotgun gequencing of the Sargasso Sea. **Science**, Washington, v.304, n.5667, p.66-74, 2004.

YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB**. Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, v.9, n.6, p.38-39, jul./ago., 1991.

WOESE, C.R.; FOX, G.E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdom. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.74, n.11, p. 5088-5090, 1977.

ZAMFIR, M.; VANCANNEYT, M.; MAKRAS, L.; VANINGELGEM, F.; LEFEBVRE, K.; POT, B.; SWINGS, J.; VUYST, L. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. **Systematic and Applied Microbiology**, Berlin, v.29, p.487-495, 2006.