**AVALIAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS NA GERMINAÇÃO
DE ESPOROS E NA MULTIPLICAÇÃO DE BACTÉRIAS
ISOLADAS DE PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA**

VALMIR EDUARDO ALCARDE

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. CLÁUDIO ROSA GALLO

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Maio de 1995

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ"/USP

Alcarde, Valmir Eduardo

Avaliação de antimicrobianos na germinação de esporos e na multiplicação de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica. Piracicaba, 1995.

114p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Antimicrobiano 2. Bactéria - Multiplicação 3. Esporo - Germinação - Efeito de antimicrobiano 4. Fermentação alcoólica I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 663.13

**AVALIAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS NA GERMINAÇÃO
DE ESPOROS E NA MULTIPLICAÇÃO DE BACTÉRIAS
ISOLADAS DE PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA**

VALMIR EDUARDO ALCARDE

Aprovada em 07.08.1995

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo

ESALQ/USP

Prof.^a. Dr.^a. Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner

ESALQ/USP

Prof. Dr. Jorge Horii

ESALQ/USP

Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo

À BEL, pela dedicação demonstrada,

compreensão e amor

Dedico

Aos meus pais JOSÉ CARLOS e

NIUZA e ao meu irmão ANDRÉ

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser o meu guia em todas as etapas da vida.

Agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo, pela sabedoria na orientação, amizade e confiança constante ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Joaquim de Oliveira, pela amizade e contribuição prestada no desenvolvimento deste trabalho.

À Fermentec S/C Ltda, Assistência Técnica em Fermentação Alcoólica, e em especial ao Prof. Dr. Henrique Vianna de Amorim, pela amizade e apoio financeiro às pesquisas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudo.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", de modo particular ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, seus professores e funcionários, pelas facilidades oferecidas para a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente e à Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Stolf Nogueira, pelas análises estatísticas dos resultados.

Aos amigos Carlos Eduardo Garcia, Cleomar Maria de Carvalho e Maria da Graça Stupiello, pela convivência e colaboração e à Maria Luciana Massi de Moraes Santos, pela amizade e auxílios prestados.

Às bibliotecárias Beatriz Helena Giongo e Mídiam Gustinelli, pela colaboração e auxílios prestados.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....	xvi
SUMMARY.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. CONTAMINANTES DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ÁLCOOL	3
2.2. ENDOSPOROS.....	8
2.3. ATIVAÇÃO E GERMINAÇÃO DE ESPOROS	9
2.4. FATORES QUE AFETAM A ATIVAÇÃO E GERMINAÇÃO DE ESPOROS ...	14
2.4.1. pH	15
2.4.2. Temperatura.....	16
2.4.3. Tensão de oxigênio	17
2.4.4. Atividade de água	18
2.4.5. Composição do meio de cultivo.....	19
2.4.6. Inibidores químicos.....	20
2.5. PERDAS ECONÔMICAS CAUSADAS	22

2.6. ANTIMICROBIANOS.....	24
2.6.1. Compostos fenólicos.....	27
2.6.2. Compostos clorados.....	27
2.6.3. Quaternário de amônio.....	28
2.6.4. Aldeídos.....	29
2.6.5. Antibióticos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. Meio para a germinação e multiplicação bacteriana	32
3.2. Culturas.....	32
3.3. Antimicrobianos.....	33
3.4. Meios de cultivo.....	34
3.5. Esporulação.....	35
3.6. Coleta de esporos	37
3.7. Ativação dos esporos	37
3.8. Germinação dos esporos	38
3.9. Avaliação dos antimicrobianos na germinação de esporos e na multiplicação bacteriana.....	39
3.10. Delineamento experimental e análise estatística dos dados	42

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. AÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS E NA MULTIPLICAÇÃO BACTERIANA.....	44
4.1.1. Virginiamicina	44
4.1.2. Penicilina V Potássica.....	51
4.1.3. Kamoran HJ.....	58
4.1.4. Tetraciclina	64
4.1.5. Bactol Q.....	70
4.1.6. Adesol A-207.....	76
5. CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
APÊNDICE	102

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº	Página
01	Esquema da esporulação 36
02	Esquema para ativação e determinação do número de esporos ativados 40
03	Esquema para avaliação dos antimicrobianos na germinação de esporos e na multiplicação bacteriana..... 41
04	Ação do antimicrobiano Virginiamicina (concentração= 1,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= <i>B. subtilis</i> , BST= <i>B. stearothermophilus</i> , BCO= <i>B. coagulans</i> , BME= <i>B. megaterium</i> , BBR= <i>B. brevis</i> , e SPO= <i>Sporolactobacillus</i> sp.) 48
05	Ação do antimicrobiano Virginiamicina (concentração= 2,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= <i>B. subtilis</i> , BST= <i>B. stearothermophilus</i> , BCO= <i>B. coagulans</i> , BME= <i>B. megaterium</i> , BBR= <i>B. brevis</i> , e SPO= <i>Sporolactobacillus</i> sp.) 49

- 06 Ação do antimicrobiano Virginiamicina (concentração= 3,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.)50
- 07 Ação do antimicrobiano Penicilina V Potássica (concentração= 1,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.).....55
- 08 Ação do antimicrobiano Penicilina V Potássica (concentração= 2,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.).....56
- 09 Ação do antimicrobiano Penicilina V Potássica (concentração= 3,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.).....57

- 10 Ação do antimicrobiano Kamoran HJ (concentração= 1,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.)..... 61
- 11 Ação do antimicrobiano Kamoran HJ (concentração= 2,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.)..... 62
- 12 Ação do antimicrobiano Kamoran HJ (concentração= 3,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.)..... 63
- 13 Ação do antimicrobiano Tetraciclina (concentração= 25,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.)..... 67

- 14 Ação do antimicrobiano Tetraciclina (concentração= 50,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.).....68
- 15 Ação do antimicrobiano Tetraciclina (concentração= 100,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.).....69
- 16 Ação do antimicrobiano Bactol Q (concentração= 20,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.).....73
- 17 Ação do antimicrobiano Bactol Q (concentração= 30,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.).....74

- 18 Ação do antimicrobiano Bactol Q (concentração= 40,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.) 75
- 19 Ação do antimicrobiano Adesol A-207 (concentração= 20,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.) 79
- 20 Ação do antimicrobiano Adesol A-207 (concentração= 30,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.) 80
- 21 Ação do antimicrobiano Adesol A-207 (concentração= 40,0 ppm; tempos de contato= 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU= *B. subtilis*, BST= *B. stearothermophilus*, BCO= *B. coagulans*, BME= *B. megaterium*, BBR= *B. brevis*, e SPO= *Sporolactobacillus* sp.) 81

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº	Página
01 Doses utilizadas para cada um dos antimicrobianos testados	34
02 Ação do produto Virginiamicina sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana, nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas (porcentuais de redução/aumento).....	47
03 Ação do produto Penicilina V Potássica sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana, nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas (porcentuais de redução/aumento)	54
04 Ação do produto Kamoran HJ sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana, nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas (porcentuais de redução/aumento).....	60
05 Ação do produto Tetraciclina sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana, nas concentrações de 25,0; 50,0 e 100,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas (porcentuais de redução/aumento).....	66

06	Ação do produto Bactol Q sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana, nas concentrações de 20,0; 30,0 e 40,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas (porcentuais de redução/aumento).....	72
07	Ação do produto Adesol A-207 sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana, nas concentrações de 20,0; 30,0 e 40,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas (porcentuais de redução/aumento).....	78
08	Ação dos diferentes antimicrobianos testados sobre as bactérias esporuladas utilizadas (porcentuais de redução/aumento)	82
09	Contagens de UFC x 10^6 /ml frente ao produto Virginiamicina nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas	103
10	Contagens de UFC x 10^6 /ml frente ao produto Penicilina V Potássica nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas	104
11	Contagens de UFC x 10^6 /ml frente ao produto Kamoran HJ nas concentrações de 1,0; 2,0; e 3,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas.....	105

12	Contagens de UFC x 10^6 /ml frente ao produto Tetraciclina nas concentrações de 25,0; 50,0 e 100,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas.....	106
13	Contagens de UFC x 10^6 /ml frente ao produto Bactol Q nas concentrações de 20,0; 30,0 e 40,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas.....	107
14	Contagens de UFC x 10^6 /ml frente ao produto Adesol A-207 nas concentrações de 20,0; 30,0 e 40,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas.....	108
15	Análise de Variância para <i>Bacillus subtilis</i>	109
16	Análise de Variância para <i>Bacillus stearothermophilus</i>	110
17	Análise de Variância para <i>Bacillus coagulans</i>	111
18	Análise de Variância para <i>Bacillus megaterium</i>	112
19	Análise de Variância para <i>Bacillus brevis</i>	113
20	Análise de Variância para <i>Sporolactobacillus</i> sp.....	114

AVALIAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS E CÉLULAS VEGETATIVAS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Autor: Valmir Eduardo Alcarde

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo

RESUMO

O aumento do nível de contaminação no caldo de cana após tratamento térmico, desde a saída do decantador até as dornas de fermentação, tem sido um dos problemas que ocorrem durante o processo de produção de álcool. Uma das possíveis causas para isto seria a germinação de esporos ativados pelo tratamento térmico do caldo.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de alguns antimicrobianos utilizados em indústrias sucro-alcooleiras na germinação de esporos bacterianos e em suas respectivas células vegetativas.

Suspensões de esporos contendo 10^7 - 10^8 esporos/ml de *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus* e *Sporolactobacillus* sp. foram testadas. Após ativação a 80°C por 10 minutos, foram cultivados em caldo de cana (10% de ART) e então os seguintes antimicrobianos, com suas

respectivas concentrações, foram dosados: Virginiamicina (1,0; 2,0 e 3,0 ppm), Penicilina V Potássica (1,0; 2,0 e 3,0 ppm), Kamoran HJ (1,0; 2,0 e 3,0 ppm), Tetraciclina (25,0, 50,0 e 100,0 ppm), Bactol Q (20,0, 30,0 e 40,0 ppm) e Adesol A-207 (20,0, 30,0 e 40,0 ppm).

Após a adição dos antimicrobianos as suspensões de esporos foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 6 horas. Amostras foram coletadas a cada 3 horas, diluídas serialmente, plaqueadas e incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

O número de colônias desenvolvidas foi tomado como sendo o número de esporos ativados e germinados.

A análise estatística dos dados mostrou um efeito significativo ($p \leq 0,001$) entre produtos (antimicrobianos), concentração e hora (tempo de contato com o antimicrobiano) para todas as espécies estudadas.

Desta forma, as porcentagens de redução no número de esporos bacterianos e em suas respectivas células vegetativas foram maiores para as concentrações mais elevadas de cada antimicrobiano, sendo que todos eles apresentaram melhores resultados quando permaneceram em contato com os microrganismos durante um período de tempo de 6 horas.

Dos produtos testados, o qual se mostrou mais eficiente para inativar esporos e células vegetativas de bactérias foi o Bactol Q, podendo ser utilizado para controlar o aumento de contaminação em caldo de cana após aquecimento e decantação.

EVALUATION OF ANTIMICROBIALS ON SPORES GERMINATION AND OUTGROWTH OF BACTERIA ISOLATED FROM ALCOHOL FERMENTATION PROCESS

Candidate: Valmir Eduardo Alcarde

Adviser: Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo

SUMMARY

The increase of the contamination level of sugar-cane-juice after heat treatment has been one of the main problem faced by alcohol industry today.

One of the most probable source of it is the spores germination which are activated by the heating of the sugar-cane-juice. It has also observed that contamination levels increase since the sugar-cane-juice leaves the decanter till it reach the fermentation reactors.

Basing in the assumptions, this work was undertaken to evaluate the activity of some antimicrobials on the bacterial spores germination and outgrowth.

Spores suspensions having 10^7 - 10^8 spores/ml of *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus* and *Sporolactobacillus* sp. were tested. After activated by heating at 80°C for 10 minutes they were cultivated in sugar-cane-juice (10% T.S.) and tested against Virginiamycin 1,0; 2,0 and 3,0 ppm, Penicillin V

Potassic 1,0; 2,0 and 3,0 ppm, Kamoran HJ 1,0; 2,0 and 3,0 ppm, Tetracilin 25,0; 50,0 and 100,0 ppm and Quaternary Ammonium (Bactol Q and Adesol A-207) 20,0; 30,0 and 40,0 ppm.

After the addition of the antimicrobials to the spores suspensions these were incubated at $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 6 hours. Samples were taken at 3 hours intervals, serial diluted, plated and incubated at $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ for 48 hours.

The number of colonies developed was taken as the number of spores activated, germinated and outgrown.

The statistical treatment of data showed a significative effect ($p \leq 0,001$) on spore germination and outgrowth inhibition, among antimicrobials, concentrations and incubation time for all species tested.

Higher spore germination and outgrowth percentage of inhibition occurred for all antimicrobials at the higher concentrations and 6 hours of incubation.

The most effective antimicrobial for spore germination and outgrowth inhibition was Bactol Q, pointing out that it could be a usefull antimicrobial for controlling the increase of contamination after sugar-cane-juice heat treatment.

1. INTRODUÇÃO

A agroindústria canavieira situa-se entre as principais agroindústrias do mundo e, em nosso país seguramente ocupa a liderança do setor, além de representar para várias regiões a base de sua economia.

No caso do Brasil, basicamente três agroindústrias se destacam na área canavieira: a do açúcar, a do álcool e a da aguardente. São produzidos anualmente cerca de 12,5 milhões de litros de álcool, resultado da industrialização de 4,5 milhões de hectares de cana-de-açúcar (CANA/AÇÚCAR e álcool, 1992).

Concomitantemente à evolução da indústria sucro-alcooleira, trabalhos no sentido de isolar, caracterizar e combater agentes contaminantes deste processo têm sido realizados, uma vez que estes são causadores de problemas como: consumo de açúcar, queda de viabilidade de células de leveduras devido às toxinas excretadas no meio, floculação do fermento que acarreta perda de células de leveduras pelo fundo de dorna ou na centrífuga e queda no rendimento industrial (ALTERTHUM et al, 1984; AMORIM et al, 1989). Além disso, a formação de gomas provocada pela infecção aumenta a viscosidade do caldo, causando problemas operacionais na fábrica (FOSTER, 1969; TILBURY, 1975).

Trabalhos de caracterização destes microrganismos contaminantes mostram que as bactérias do grupo Gram-positiva predominam no processo, sendo os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* os de maior ocorrência (RODINI, 1985; ROSALES, 1989; GALLO, 1989; OLIVA-NETO, 1990). Além disso, parte das bactérias até agora isoladas da fermentação alcoólica são produtoras de esporos como *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus brevis* e *Bacillus stearothermophilus* (GALLO, 1989).

Um dos grandes problemas que vêm ocorrendo durante o processo de produção de álcool é a sobrevivência de microrganismos após o tratamento térmico e a recontaminação do mosto desde a saída do decantador, passando pelos trocadores de calor, até a chegada às dornas de fermentação, onde há um aumento da população bacteriana que chega a atingir centenas e até milhares de vezes. Uma das hipóteses é que este aumento seja causado pela germinação de esporos bacterianos que foram ativados pelo tratamento térmico do caldo.

Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade de alguns antimicrobianos utilizados em indústrias sucro-alcooleiras, na germinação de esporos bacterianos e em suas respectivas células vegetativas, contribuindo deste modo com informações que poderão auxiliar no controle ou combate destes contaminantes, visando assim melhoria no rendimento industrial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Contaminantes do Processo de Produção de Álcool

O caldo de cana-de-açúcar contém quantidades variáveis de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água, pH e temperatura favoráveis que proporcionam o crescimento de uma grande flora microbiana (LOPEZ et al, 1988).

DUNCAN & COLMER (1964) citaram que em cana saudável foram encontrados 10^4 a 10^8 bactérias por grama e 10^3 a 10^4 fungos por grama. Estes autores isolaram 198 microrganismos de várias partes da cana-de-açúcar, sendo encontrados principalmente *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* e *Aerobacter cloacae*.

BEVAN & BOND (1971) isolaram da cana-de-açúcar sadia 50 diferentes microrganismos, encontrando bactérias dos gêneros *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*; leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia*.

Os microrganismos mais comumente encontrados no colmo da cana são bactérias dos gêneros *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Corynebacterium* (TILBURY, 1975).

A prática da queima da cana-de-açúcar visa reduzir as impurezas e facilitar o corte. No entanto, a cana depois de queimada parece ficar ainda mais susceptível, uma vez que a cera que envolve o colmo é destruída com a queima.

BEVAN & BOND (1971) relataram que as temperaturas de 55-85°C alcançadas pela queima não parecem ser problema para as bactérias, uma vez que 17 diferentes tipos de microrganismos foram isolados após 10 minutos de queima da cana. Destes isolados 5 foram resistentes ao calor, 2 produziram dextrana e 2 eram formadores de esporos.

O tempo de armazenamento da matéria-prima após a queima e o corte no barracão da usina/destilaria é outro fator importante no que se refere à contaminação desta matéria-prima.

TILBURY (1975) estudou o efeito da estocagem no crescimento de bactérias láticas, mostrando que até o quarto dia níveis de 10^7 a 10^8 /ml são alcançados, predominando *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc dextranicum* e a partir daí, provavelmente devido à queda de pH, passaram a ser encontrados *Lactobacillus*.

A lavagem da cana-de-açúcar na esteira com a finalidade de remover as impurezas grosseiras (terra, bagacilhos) pode também se tornar um foco de contaminação para a matéria-prima. Estudos realizados por SERRA et al (1979) mostraram que em unidades que não recirculavam água de lavagem de cana, a carga microbiana era 10 a 20 vezes menor em relação às unidades que recirculavam essa água. Estes autores constataram a presença de *Bacillus* sp. nesta água.

Durante a operação de extração do caldo da cana pelos ternos da moenda, as perdas variam de 1,0 a 2,0 kg açúcar/tonelada de cana, sendo que deste total 62% estão associados à atividade microbiana (TILBURY et al, 1977). Do caldo de cana, estes autores isolaram *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, coliformes e leveduras.

YOKOYA (1989) estudou o crescimento de microrganismos nas moendas e na linha de caldo, os quais geralmente causam formação de gomas nas tubulações, peneiras e parede de reservatórios. Dentre os microrganismos encontrados nesta linha de caldo estão *Leuconostoc*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acetobacter* e *Bacillus*.

LIMA¹, citado por GALLO & CANHOS (1991), encontrou como principais contaminantes do caldo misto *L. mesenteroides*, *L. dextranicum*, *E. aerogenes*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. megaterium* e *Pseudomonas*.

GALLO (1989) citou que as próprias condições de cada etapa do processo de produção de álcool selecionam o desenvolvimento de microrganismos.

Com isso, em situações de pH baixo associado a altas temperaturas os termófilos esporulados são favorecidos, como é o caso de *B. stearothermophilus* (MacMASTER & RAVNO, 1975). *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, por serem acidófilos e resistentes às condições do processo, normalmente estão presentes (BEVAN & BOND, 1971).

¹ LIMA, U.A. et. al. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, 4: 337-43, 1974.

O processo de clarificação do caldo misto auxilia na eliminação de células vegetativas, uma vez que durante o processo de aquecimento a temperatura atinge 100-105°C; entretanto formas esporuladas e bactérias formadoras de dextrana continuam viáveis (LUCREDI et al, 1984). Assim, após o decantador foram isolados bastonetes esporulados identificados como *B. megaterium* (BEVAN & BOND, 1971).

SILVA (1988) estudando a microbiota do caldo clarificado, pasteurizado e pré-resfriado encontrou: 38% de *Lactobacillus*; 23% pertencente à família *Micrococcaceae*; 12% do gênero *Leuconostoc* e 3% do gênero *Bacillus*. O mesmo autor, caracterizando a microbiota bacteriana contaminante do caldo de cana durante seu resfriamento no processo de produção de álcool, encontrou os gêneros *Lactobacillus* (38%), *Staphylococcus* (23%), *Leuconostoc* (12%), *Bacillus* (3%) e *Klebsiella* (1%).

SERRA et al (1979) isolaram de mosto fermentado várias espécies de *Bacillus* e também *Sporolactobacillus* sp., associando estes microrganismos à floculação do fermento.

Os principais contaminantes da fermentação, segundo AMORIM & OLIVEIRA (1982) são os gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*.

Estudos de RODINI (1985) em mosto fermentado, constataram uma contaminação de até 10^7 bactérias por ml. As bactérias Gram-positivas abrangiam 65% do total, sendo 62% delas pertencentes ao gênero *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium* e *B. brevis*).

Numa amostragem das etapas da fermentação, os gêneros que predominaram no processo foram *Lactobacillus* sp. (45,04%), *Leuconostoc* (14,41%), *Bacillus* sp. (9,46%), *Acetobacter* sp. (7,21%), *Enterobacter* sp. (6,75%); *Sporolactobacillus* sp. (3,60%) entre outros (ROSALES, 1989).

Num estudo de caracterização da microbiota bacteriana em amostras de "leite de levedura" diluído antes e após o tratamento ácido, de mosto de alimentação e de vinho final, GALLO (1989) utilizando matrizes de similaridade, constatou a predominância de bactérias Gram-positivas (98,52%), sendo o gênero *Lactobacillus* o mais freqüente (59,75%), com a identificação de: *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. animales*, *L. buchneri*, *L. acidophilus*, *L. vitulinus*, *L. viridescens*, *L. amylophilus*, *L. agilis*, *L. reuteri*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. murinus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. coryniformis* subsp. *torquens* e *L. sake*. O gênero *Bacillus* correspondeu a 26,58% das bactérias identificadas, com as seguintes espécies: *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. lentus* e *B. pasteurii*. Ainda entre os isolados foram caracterizadas bactérias dos gêneros: *Staphylococcus* (8,76%), *Micrococcus* (1,56%), linhagens da família *Enterobacteriaceae* (1,48%), *Pediococcus* (1,26%) e *Streptococcus* (0,70%).

Análises em "leite de levedura" sem tratamento ácido, apresentaram *L. fermentum* (62%), *L. murinus* (9%), *L. vaccinostercus* (9%), *L. plantarum* (2%) e *Leuconostoc* (2%) (OLIVA-NETO, 1990).

2.2. Endosporos

Algumas bactérias têm a capacidade de produzir um corpo de parede espessa que é chamado de endosporo ou mais comumente esporo, sendo que todas as bactérias do gênero *Bacillus* e *Clostridium* são caracterizadas, em parte, pela produção de endosporos (PELCZAR et al, 1980; BERKELEY & ALI, 1994).

Entre os elementos típicos dos esporos bacterianos nota-se em sua composição química grandes quantidades de ácido dipicolínico, substância esta não identificada nas células vegetativas. A ocorrência deste ácido parece ser restrita aos esporos das bactérias, correspondendo de 5 a 10% do seu peso total. Observa-se também grandes quantidades de cálcio e acredita-se que um complexo cálcio-ácido dipicolínico-peptoglicano constitui a camada cortical. A síntese do ácido dipicolínico e a incorporação do cálcio ocorrem durante as fases avançadas da formação do esporo. O esporo maduro, geralmente esférico ou oval, representa apenas uma fração da célula vegetativa e possui propriedades completamente diferentes, especialmente no que se refere à resistência aos efeitos destrutivos de agentes físicos e químicos (PELCZAR et al, 1980).

Quando os esporos são transferidos para um ambiente favorável ao seu crescimento ocorre a germinação, rompendo-se a parede do esporo, a qual se desprende à medida que o esporo se desenvolve formando uma nova célula vegetativa (PELCZAR et al, 1980).

As bactérias capazes de esporular podem crescer e multiplicar-se por muitas gerações como células vegetativas, sendo que em alguma etapa do desenvolvimento da cultura em ambiente nutritivo adequado ocorre no interior do citoplasma a síntese de um novo protoplasto, destinado a se tornar o esporo (FOSTER, 1994).

Comparado com as formas vegetativas, os esporos são extremamente resistentes aos agentes físicos e químicos. Estudos demonstraram que a capacidade de sobrevivência dos esporos é devida à sua parede ou capa impermeável, a qual por sua vez, está associada ao complexo ácido dipicolínico-cálcio (SETLOW, 1994).

2.3. Ativação e Germinação de Esporos

Há muito tempo se têm informações de que suspensões de esporos bacterianos praticamente não germinam a menos que sejam aquecidos por um determinado período de tempo. CURRAN & EVANS (1945) fizeram os primeiros trabalhos demonstrando que o calor subletal induzia a germinação de esporos dormentes. Mais tarde, outros autores mostraram que esporos também podem ser ativados através de pH (KEYNAN et al, 1964; ISSAHARY et al, 1970; GOMBAS, 1987); por exposição à solução de dipicolinato de cálcio (KIRK & HAMBLETON, 1982) e por radiação ionizante (GOULD & ORDAL, 1968; GOMBAS, 1987).

A ativação, segundo MORAN et al (1990), é dependente do meio de esporulação, tempo de estocagem, natureza do agente germinante e fatores ambientais. Desta

forma, estudando o efeito de várias temperaturas de ativação na germinação de esporos de *Bacillus* sp., estes autores constataram que a 80°C por 10 minutos a porcentagem de germinação foi maior que a 90°C por 10 minutos; 100°C por 10 minutos e 100°C por 1,0 minuto.

A ativação térmica de esporos pode ser perdida durante o armazenamento (POWELL & HUNTER, 1955). Assim, por exemplo, a desativação de esporos de *Bacillus cereus* ocorreu lentamente a 20°C e foi ausente a 4°C, indicando que a reação é dependente da temperatura.

Já foi determinado que o grau de ativação pelo calor é dependente do pH, ou seja, pH baixo pode ativar esporos para a germinação. ISSAHARY et al (1970) mostraram que *B. cereus* e *B. subtilis*, que requerem 30 minutos e 3 horas respectivamente para a ativação em água destilada, foram completamente ativados durante 12 minutos em pH 1,0 na mesma condição de temperatura.

A definição clássica de germinação de esporos bacterianos inclui todas as mudanças que os esporos sofrem no desenvolvimento da forma dormente para a típica forma vegetativa (POWELL & HUNTER, 1955). Entretanto, outros trabalhos definiram germinação como compreendendo somente mudanças iniciais dos esporos, envolvendo baixa resistência aos agentes químicos, baixa refratividade, exudação de ácido dipicolínico, aumento na capacidade de coloração, decréscimo na densidade óptica, aumento na atividade metabólica e excreção de peptideoglicano. As mudanças nos esporos pós-germinação são

alongamento celular e divisão celular (LEVINSON & HYATT, 1966; SMOOT & PIERSON, 1982; ERRINGTON, 1993).

Segundo SMOOT & PIERSON (1982) é provável que certas reações envolvidas, por exemplo a rápida despolimerização e excreção dos constituintes dos esporos, como ácido dipicolínico, cálcio, manganês e peptidoglicano, ocupem sítios específicos nos esporos durante a germinação. Muitas mudanças observadas na germinação de esporos, como decréscimo na densidade óptica e fase de escurecimento são provavelmente um resultado desta despolimerização.

A comunidade científica tem aceito algumas teorias a respeito da natureza do processo de iniciação da germinação dos esporos, bem como o desencadeamento das reações. DRING & GOULD (1975) levantaram a hipótese de que o desencadeamento das reações seria naturalmente metabólico, baseado na inibição da germinação por agentes inibidores das vias metabólicas. O estudo feito por estes autores, com *B. cereus*, indicou que uma grande variedade de inibidores da cadeia de transporte de elétrons e da formação de trifosfato de adenosina inibiram a germinação.

Outros estudos mostraram que a germinação pode ocorrer na ausência de metabolismo, sugerindo então que estes inibidores provavelmente estariam afetando alguns estágios tardios na germinação ou o processo de crescimento pós-germinativo (SMOOT & PIERSON, 1982).

Com relação às reações iniciais de desencadeamento da germinação, segundo JOHNSTONE (1994) a hipótese mais aceita indica que este evento é um processo alostérico

ao invés de metabólico. VARY & HALVORSON (1965) em seus estudos, utilizaram agentes germinantes não metabolizáveis (análogos à glicose) para induzir germinação em esporos de *B. megaterium* e determinaram que estes agentes não metabolizáveis foram capazes de induzir germinação.

Outros trabalhos mostraram que sais inorgânicos e agentes quelantes (não metabolizáveis), agiram como iniciadores da germinação, sugerindo assim que o processo de desencadeamento da germinação é um evento físico-químico (LEVINSON & HYATT, 1962; GOMBAS, 1987).

Desta forma, há indícios de que estímulos físico-químicos sejam capazes de induzir a germinação de esporos e atualmente tem sido possível a classificação dos iniciadores em diferentes grupos. No primeiro grupo estão os nutrientes iniciadores metabolizáveis (aminoácidos, purina, ribosídeos, bases e açúcares). Dentre estes, o nutriente germinante mais estudado tem sido a L-alanina, que sozinha ou na presença de determinados íons pode iniciar a germinação de esporos das espécies de *Bacillus* e de *Clostridium* (GOULD, 1970).

Os demais grupos de iniciadores de germinação de esporos são constituídos pelos não nutrientes germinantes (íons metálicos, bicarbonatos, surfactantes, dipicolinato de cálcio); os germinantes enzimáticos (subtilisina, lisozima, enzimas líticas dos esporos) e finalmente os germinantes físicos (abrasão e deformação por pressão hidrostática) (GOULD, 1970).

O mecanismo através do qual os aminoácidos iniciam a germinação ainda não é bem conhecido, mas foi sugerido por alguns autores que L-alanina desidrogenase é importante na germinação de esporos pois catalisa a produção de piruvato de amônio e a transformação de NADH para NAD. Outros estudos sugeriram que L-alanina inicia a germinação ativando alostericamente as enzimas dos esporos. A identidade destas enzimas alostéricas possivelmente seriam proteases dos esporos e enzimas líticas dos esporos (FREESE et al, 1964; WOESE et al, 1968).

KANDA et al (1991) verificaram que L-asparagina, assim como L-alanina, estimulam a germinação de esporos, podendo inclusive ser parcialmente substituídas por NH_4^+ , mas não por L-glutamina.

Outros nutrientes germinantes como ribosídeos e açúcares parecem ter uma forte influência sobre os aminoácidos, induzindo a germinação, possivelmente devido ao aumento de permeabilidade dos esporos para os aminoácidos (HYATT & LEVINSON, 1962; SMOOT & PIERSON, 1982).

HASHIMOTO et al (1969) estudando a germinação de esporos de *B. cereus* e *B. megaterium*, citaram que este processo compreende duas fases. A primeira, mais rápida, representa as mudanças que ocorrem devido à hidratação parcial do esporo e liberação de ácido dipicolínico no meio. A segunda, mais lenta, compreende a degradação do córtex e a hidratação do seu núcleo. Desta forma, estes autores mostraram que para *B. cereus*, a primeira fase dura 75 ± 15 segundos e a segunda fase 3 a 4 minutos. Para a germinação de

esporos de *B. megaterium*, estas fases duram, respectivamente, 2 minutos e mais que 7 minutos.

COOTE et al (1995) mostraram que a duração média para a germinação de esporos de *B. cereus* é de 14 minutos, embora alguns deles tenham demorado mais que 60 minutos para germinar.

A germinação de esporos pode ser definida, segundo GOMBAS (1987), como um processo específico durante o qual o esporo ativado muda para um esporo apto a ser transformado em célula vegetativa, ou seja, é um processo caracterizado por um metabolismo degradativo. Já o crescimento de células vegetativas originadas da germinação do esporo, é caracterizado por biossíntese e restauração, ou seja, envolve entumescimento do protoplasto, dissolução e ruptura do córtex e emergência de uma nova célula. Esta célula jovem, segundo este mesmo autor, é mais sensível a antibióticos, nitrito e sais.

2.4. Fatores que Afetam a Ativação e Germinação de Esporos

A ativação e germinação de esporos bacterianos podem ser controladas ou inibidas através da variação de pH, temperatura, potencial de oxidação e redução, tensão de oxigênio, umidade disponível, bem como pela composição do meio de cultivo (SMOOT & PIERSON, 1982; MORAN et al, 1990).

2.4.1. pH

Os valores de pH ótimos para germinação de esporos variam amplamente e são dependentes da espécie e linhagem, bem como do germinante utilizado. Segundo MORAN et al (1990) a faixa ótima para a germinação dos esporos da maioria das espécies de *Bacillus* encontra-se entre 6,8 a 7,3.

O efeito do pH na presença de glicose e L-alanina e sua influência na germinação de esporos após choque térmico em duas linhagens de *B. subtilis*, foi objetivo do estudo realizado por WOLF & MAHMOUND (1957). Os resultados mostraram que em presença de glicose as linhagens 6281 e 2588 germinaram melhor em pH ácido que em pH neutro e responderam lentamente a pH 8,5, no período de 3 a 5 horas de incubação. Já no experimento com L-alanina, para *B. subtilis* linhagem 2588, o pH ótimo foi 7,5, ocorrendo 82% de germinação. Os autores explicam que esta diferença pode estar relacionada com a distribuição das enzimas necessárias para as várias vias de germinação.

No estudo feito com *B. megaterium* QMB 551 foi observado uma melhor germinação na presença de L-alanina em pH 6,0, mas na presença de glucosamina ou L-prolina, o pH ótimo passou a ser maior que 8,0 (HYATT & LEVINSON, 1962).

No caso de bactérias anaeróbias, como *Clostridium botulinum*, vários autores demonstraram que o pH ótimo para a germinação estava próximo a 7,0, sendo que o limite mínimo para germinação de seus esporos estava em pH entre 4,6 e 4,8 (GOULD,

1970; ANDO, 1973). Para *Clostridium sporogenes* e *Clostridium tetani* o pH ótimo foi 8,8 (UEHARA & FRANK, 1967).

2.4.2. Temperatura

Temperatura é outro fator que afeta a germinação de esporos bacterianos. Em geral, estudos mostram que a germinação pode ocorrer em temperaturas fora dos limites ideais para o crescimento das células vegetativas. Dessa forma, WOLF & MAHMOUD (1957) encontraram para algumas espécies de *Bacillus* mesofílicos a temperatura de 50°C como a ótima para a germinação de esporos.

FINLEY & FIELDS (1962) constataram que linhagens de *B. megaterium* requerem somente poucos minutos a 60°C para uma ótima taxa de germinação, enquanto microrganismos termofílicos, como *B. stearothermophilus*, podem requerer até 115°C ou mais para ótima ativação.

Para a maioria das espécies de *Bacillus*, a temperatura de germinação ideal se encontra na faixa de 30 a 37°C, com pH na faixa de 6,8 a 7,3 (LEE & ORDAL, 1963; LEVINSON & HYATT, 1970).

Durante estudos sobre o efeito da temperatura de ativação, pH e tempo de incubação na germinação de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica, DUQUE (1991) encontrou que o melhor tratamento para a ativação e germinação dos esporos das espécies investigadas (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. coagulans* e *B. brevis*)

foi 80°C e pH 5,5, o que demonstra a possibilidade de germinação destes esporos nas condições de tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar para a produção de álcool e açúcar. Estes resultados estão de acordo com MORAN et al (1990) que encontraram uma maior porcentagem de germinação a 80°C por 10 minutos para *Bacillus* spp..

2.4.3. Tensão de Oxigênio

Muitos estudos relacionados ao efeito do oxigênio afirmam que a germinação de esporos de bactérias anaeróbias pode, algumas vezes, ser interrompida pelo oxigênio. No entanto, há uma grande variabilidade entre espécies de *Clostridium* com relação à sua habilidade de germinar na presença de oxigênio.

Estudos de GIBBS (1964) demonstraram que esporos de *Clostridium* germinaram sob condições aeróbias, mas segundo HITZMAN et al (1957) esporos de *C. botulinum*, *C. butyricum* e *C. acetobutylicum* somente germinaram sob condições totalmente anaeróbias.

ANDO & LIDA (1970) citaram que o processo de germinação de esporos de *Clostridium* está menos sujeito à inibição pelo oxigênio que o subsequente crescimento das células vegetativas.

ROTH & LIVELY (1956) demonstraram que a germinação de esporos de bactérias aeróbias não é inibida pelo oxigênio, mas pode ser afetada sob condições de anaerobiose.

2.4.4. Atividade de Água

HAGEN et al (1967) no estudo do efeito da atividade de água (A_w) na germinação de esporos, determinaram que com uma baixa A_w nenhuma germinação de esporos bacterianos pode ocorrer. Com uma A_w média somente a germinação acontece, mas não ocorrem as fases de crescimento pós-germinativo e multiplicação de células vegetativas e, na presença de alta A_w a germinação e suas fases subsequentes podem ocorrer. Estes processos podem variar dependendo do organismo, mas em geral a germinação de esporos ocorre em valores mais baixos de A_w que aqueles requeridos para crescimento das células vegetativas. Estes autores relataram que esporos de *B. cereus* e *B. subtilis* germinaram em valores de A_w menor que 0,80, mas somente puderam se multiplicar a níveis de A_w maiores que 0,90.

Esporos de *C. botulinum*, quando plaqueados em condições ótimas para crescimento, germinaram a níveis de A_w de 0,85. Foi observado também que a germinação de esporos de *C. botulinum* tipos A e E foi mais sensível a níveis mais baixos de A_w quando em valores de pH abaixo do ótimo (BAIRD-PARKER & FREAME, 1967).

2.4.5. Composição do Meio de Cultivo

Outro fator que exerce influência na germinação de esporos bacterianos é a composição do meio de cultivo. Nem sempre os meios favoráveis à germinação de esporos são favoráveis ao crescimento de esporos germinados (O'BRIEN & CAMPBELL, 1957; LEVINSON & HYATT, 1960; BAYLISS et al, 1981).

PULVERTAFT & HAYNES (1951) estudaram o efeito da adenosina na germinação de esporos de *B. cereus* e *B. subtilis*, concluindo que esporos recentemente germinados foram mais exigentes nutricionalmente do que as células vegetativas.

LEVINSON & HYATT (1955) constataram que a germinação de esporos do gênero *Bacillus* pode ser estimulada por calor, L-alanina e manganês. Para *B. megaterium*, L-alanina atuou rapidamente proporcionando o máximo de germinação, enquanto o manganês atuou apenas após a fase Lag. Estes autores propuseram que para esporos ativados em presença de manganês, as enzimas proteolíticas promovem a liberação de aminoácidos, incluindo L-alanina que, por sua vez, estimula a germinação.

Esporos de *B. megaterium* normalmente germinam em meio de glicose, mas segundo HYATT & LEVINSON (1957) não sofrem desenvolvimento pós-germinativo a menos que uma fonte de enxofre e fosfato estejam disponíveis.

As exigências nutricionais para crescimento das células vegetativas de *B. stearothermophilus* e *B. coagulans*, após a germinação de esporos, também foram estudadas por O'BRIEN & CAMPBELL (1957). Os resultados mostraram que os

requerimentos para germinação e crescimento pós-germinativo de esporos de *B. stearothermophilus* foram leucina, metionina, histidina, arginina, tiamina, ácido nicotínico e biotina. As exigências para células vegetativas foram as mesmas, exceto para leucina e ácido nicotínico. As exigências para germinação e crescimento pós-germinativo para *B. coagulans* foram metionina, tiamina, biotina, ácido fólico, ácido glutâmico, histidina, isoleucina, leucina e valina. As células vegetativas foram menos exigentes.

Estudos de ZECHAMAN & PFLUG (1991) mostraram que o uso de meio de cultivo dextrose-tryptone-agar e soybean-casein digest-agar, com baixa concentração de nutrientes, permitiram maior sobrevivência de esporos de *B. stearothermophilus* após tratamento térmico, devido principalmente aos baixos teores de NaCl presentes nestes meios.

2.4.6. Inibidores Químicos

A procura de substâncias capazes de inibir o desenvolvimento de esporos tem sido bastante estudada. Os primeiros esforços para a elucidação do mecanismo de inibição da germinação de esporos envolveram estudos de agentes germinantes simples e seus derivados. WOESE et al (1968) constataram a possibilidade de D-alanina e seus análogos inibirem o processo germinativo de esporos, sendo que posteriormente resultados semelhantes também foram obtidos com outros D-aminoácidos.

Devido a suposição de que a inibição da germinação poderia ser um evento metabólico, já foi determinado que o processo de desenvolvimento pós-germinativo pode ser inibido por inibidores metabólicos. Por outro lado, SMOOT & PIERSON (1982) determinaram que a germinação somente poderá ser inibida ou retardada através de substâncias ou fatores capazes de interferirem nas reações iniciais do desencadeamento ou no processo degradativo.

A germinação espontânea de esporos de *Bacillus* sp. foi inibida por sais de cobre, ferro, mercúrio, prata e soluções com pH baixo (LEVINSON & HYATT, 1966; ANDO, 1973). Em contraste, a ativação de esporos de *B. megaterium* foi estimulada na presença de Ca^{++} , Sr^{++} e Ba^{++} , enquanto esporos de *B. stearothermophilus* foram ativados na presença de íons H^+ (LEVINSON & SEVAG, 1953).

CURRAN & KANAYSI (1962) estudando inibidores metabólicos, observaram que o etanol é um antagonista eficiente na germinação de *B. subtilis*. O mesmo foi observado por HYATT et al (1966), com relação a esporos de *B. megaterium*.

A atividade inibitória do álcool na germinação de esporos pode ser revertida através da sua remoção do ambiente no qual a germinação está ocorrendo. Foi sugerido então, por TRUJILLO & LAIBLE (1970), que o álcool age inibindo enzimas requeridas para a germinação.

PARKER & BRADLEY (1968) determinaram que clorocresol inibiu o início da germinação de esporos de *B. subtilis* em meio nutriente. Entretanto, esta inibição foi completamente revertida quando os esporos foram lavados com água ou quando

adicionou-se Tween 80 ao meio. Estes autores acreditam que essa reversibilidade é uma evidência de que os inibidores interferem em algumas enzimas requeridas para germinação.

2.5. Perdas Econômicas Causadas

O maior prejuízo causado pelas bactérias contaminantes no processo de fermentação alcoólica é a degradação de sacarose. Desta degradação resulta a formação de ácido láctico e ácido acético como principais ácidos orgânicos (BEVAN & BOND, 1971). Desta forma, o papel destes microrganismos não pode ser ignorado devido às perdas de açúcar disponível, bem como pelos problemas que seus metabólicos causam na indústria. Já se verificou que os caldos deteriorados demandam maior quantidade de cal para a sua alcalinização, a sua sedimentação é mais lenta e a qualidade do caldo é mais pobre. A formação de goma causa problemas nas operações da indústria por aumentar a viscosidade do caldo, dificultando a clarificação, evaporação, cozimento, cristalização, bem como leva ao entupimento nas tubulações, centrífugas, peneiras e trocadores de calor (TILBURY, 1975).

O rendimento da fermentação é expresso em quantidade de produto formado (etanol) por unidade de açúcar consumido (YOKOYA, 1989). Em função disto, todo açúcar que não é convertido em álcool e sim em outros produtos faz com que ocorra diminuição neste rendimento.

SERRA et al (1979) constataram que a presença de bactérias que produzem mucilagem pode acarretar queda no rendimento da fermentação na ordem de 15%.

AMORIM et al (1981) associaram às bactérias contaminantes perdas a níveis de 55% do valor teórico.

ALTERTHUM et al (1984) mostraram que quedas no rendimento alcoólico variáveis de 14 a 90% do teórico foram verificadas quando a concentração bacteriana atingiu 10^8 a 10^9 células/ml.

Segundo KHAN & HOQ (1990) fermentações conduzidas em presença de $5,05 \times 10^6$ bactérias, sendo $5,0 \times 10^3$ produtoras de ácido, apresentaram rendimento 11,4% menor que quando estas não estavam presentes.

Os metabólicos produzidos pelas bactérias contaminantes ocasionam não só perdas no rendimento como interferência no metabolismo da levedura utilizada no processo industrial.

As fermentações secundárias que ocorrem paralelamente à alcoólica têm sido estudadas desde os primeiros trabalhos associados à produção de álcool (GALLI, 1961; AMORIM & OLIVEIRA, 1982; MAIORELLA et al, 1983; GUTIERREZ et al, 1991).

AMORIM & OLIVEIRA (1982) citaram que a presença de ácido láctico e outros ácidos orgânicos são os responsáveis pelo fracasso da fermentação.

GUTIERREZ et al (1991) citaram que os ácidos acético e láctico podem ser formados por bactérias contaminantes e leveduras.

Outro problema sério no processo de fermentação alcoólica é a floculação, que acarreta problemas cinéticos, ou seja, diminui a velocidade de fermentação uma vez que diminui a área de contato entre a levedura e substrato, e ainda problemas operacionais, tais

como: aumento de fundo de dorna e dificuldades de operação das centrífugas (SERRA et al,1979; YOKOYA, 1989).

SERRA et al (1979) associaram floculação à presença de bactérias do gênero *Sporolactobacillus*, e explicaram o mecanismo desta devido a uma capa proteica, de natureza gelatinosa, acarretando assim a fixação mecânica das células de levedura.

YOKOYA (1989) apontou como agentes de floculação linhagens de *Lactobacillus*, e ainda defendeu a tese que não somente bactérias são promotoras de floculação mas também algumas linhagens de leveduras. Em trabalhos mais recentes, YOKOYA & OLIVA-NETO (1991) estudaram entre outros fatores a influência de *Lactobacillus fermentum* no fenômeno da floculação. Concluíram que existem linhagens que são promotoras de fixação e que existem outras linhagens que não a promovem, e ainda que a floculação está associada à presença de células bacterianas, uma vez que quando estas são retiradas do meio de cultivo o sobrenadante não apresenta poder floculante.

2.6. Antimicrobianos

Na tentativa de controle de infecções na fermentação alcoólica, diversas práticas envolvendo a utilização de agentes antimicrobianos vêm sendo adotadas. A aplicação de ácido sulfúrico no preparo do pé-de-cuba é uma prática comumente utilizada em nossas destilarias.

A penicilina V ácida é normalmente empregada no controle de cocos e micrococos (AMORIM & OLIVEIRA, 1982). Outros compostos testados e recomendados são o pentaclorofenol (GAI² 1945; citado por GALLO & CANHOS, 1991; AYRES³ 1960; citados por GALLO & CANHOS, 1991), associação de penicilina e cloranfenicol (AQUARONE⁴ et al, 1968; citado por GALLO & CANHOS, 1991) e penicilina G potássica/ hexaclorofenol/ cloranfenicol associados (SATO⁵ et al, 1980; citado por GALLO & CANHOS, 1991).

WILLIAMS & RUSSELL (1993) verificaram o potencial de recuperação e germinação de esporos de *B. subtilis* injuriados por tratamento com biocida. Neste experimento esporos de *B. subtilis* foram tratados com glutaraldeído, iodo, hipoclorito de sódio e com dicloroisocianureto, sendo posteriormente recuperados em nutriente agar suplementado com subtilisina, lisozima, dipicolinato de cálcio e lactato de cálcio. Destes somente lactato de cálcio não apresentou resultados satisfatórios. Os mesmos autores

² GAI, F. Os antissépticos na fermentação alcoólica. *Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia*. Rio de Janeiro, 8: 377-82, 1945.

³ AYRES, G.C.M. Fatores físicos e químicos que influem sobre a fermentação alcoólica. In: CURSO SOBRE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, Piracicaba, 1: 103-18, 1960.

⁴ AQUARONE, E. et. al. Emprego de associações de antibióticos na fabricação de álcool por fermentação. *Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP*. 6: 257-308, 1968.

⁵ SATO, S. et. al. Estudo comparativo entre vários desinfetantes para controle de contaminações nas fermentações alcoólicas de mostos de melaço de cana. *Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP*, 16: 133-44, 1980.

também estudaram outros tratamentos para recuperação de esporos injuriados por biocidas, sendo que hidróxido de sódio proporcionou pequeno aumento na germinação de esporos tratados com glutaraldeído mas não de esporos expostos a formaldeído, iodo, hipoclorito de sódio e dicloroisocianureto. Tratamento térmico a 70-80°C promoveu aumento no número de colônias germinadas em esporos tratados com formaldeído.

Estudos realizados por BLOOMFIELD & ARTHUR (1994) indicam que a menor sensibilidade apresentada pelos esporos bacterianos aos biocidas químicos, quando comparados com suas respectivas células vegetativas, parece estar relacionada a capa proteica que os envolve e ao seu córtex, uma vez que estas estruturas limitam a penetração do produto. Estes autores citaram que peróxido de hidrogênio é eficiente para inativar esporos mesmo em soluções pouco concentradas devido a sua habilidade em degradar estas estruturas de resistência.

BLOOMFIELD & MEIGID (1994) estudaram o efeito da interação do iodo com esporos de *B. subtilis*, concluindo que soluções tamponadas de iodo (pH 7,0) foram efetivas para controlar a germinação de esporos embora as concentrações necessárias e o tempo de contato para isto sejam elevados. Concentrações de 500 a 1000 ppm de iodo disponível com tempo de contato de 30-45 minutos promoveram reduções de 3 a 5 ciclos logarítmicos na população de *B. subtilis*.

Segundo EGUCHI (1989), os principais desinfetantes químicos são: fenol e compostos fenólicos, álcoois, halogênios e halogenados, metais pesados e seus compostos, corantes, detergentes, compostos de amônio quaternário, aldeídos e agentes gasosos.

Vários são os desinfetantes químicos utilizados pela indústria sucro-alcooleira. A seguir são citados alguns destes com seus respectivos modos de ação.

2.6.1. Compostos Fenólicos

Estes compostos, quando em altas concentrações, agem penetrando e rompendo a parede celular do microrganismo resultando na precipitação das proteínas situadas no protoplasma. Quando em concentrações baixas, estes agem de forma a promover a inativação de enzimas essenciais para a manutenção da célula (EGUCHI, 1989).

2.6.2. Compostos Clorados

A ação destes compostos sobre os microrganismos tem sido relatada por vários pesquisadores (LAWRENCE & BLOCK, 1968), e muitas teorias têm sido descritas em literatura referente a estes compostos. São descritas algumas destas teorias: (a) ocorre liberação de oxigênio nascente o qual passa a se combinar com componentes do protoplasma celular, destruindo o microrganismo; (b) combinação do cloro com proteínas da membrana celular formando N-cloro, o qual interfere no metabolismo celular levando assim à morte do microrganismo; (c) o cloro consegue modificar a membrana celular permitindo a difusão do conteúdo do interior da célula para o meio externo e (d) inibição de enzimas "chaves" das reações celulares.

Existem muitas outras teorias citadas na literatura sobre o mecanismo de ação destes compostos clorados, entretanto todos concordam que a ação destes compostos é rápida, ocorrendo logo após a adição deste ao meio.

BLOOMFIELD & ARTHUR (1992) citaram que soluções de cloro (CRAs) mostraram atividade variável contra esporos de *B. subtilis*; hipoclorito de sódio (NaOCl) apresentou melhor atividade que dicloroisocianureto de sódio (NaDCC), o qual foi mais ativo que cloroamina-T. Segundo estes autores as variações ocorrem devido a maior ou menor habilidade destes agentes químicos em degradar a capa proteica dos esporos.

ANDRADE & SERRANO (1993) investigaram o uso de esporos de *B. subtilis* para avaliar a eficiência do hipoclorito de sódio e sua ação sobre esporos armazenados em diferentes condições. Diante dos resultados obtidos, concluíram que a melhor e mais simples forma de armazenamento foi a refrigeração a 4°C, onde o seu número permaneceu constante por 180 dias e a resistência ao cloro ficou inalterada por 150 dias.

2.6.3. Quaternário de Amônio

Entre outras formas de ação destes compostos sobre os microrganismos, EGUCHI (1989) descreveu: desnaturação de proteínas, interferência com a glicólise e danos na membrana.

2.6.4. Aldeídos

Normalmente utilizados na forma formaldeído e glutaraldeído. A forma de ação do formaldeído parece estar relacionada com o crescimento desbalanceado, onde funções específicas são bloqueadas, como por exemplo síntese de parede celular, ou ainda pelo acúmulo de substância celular, que inibe a formação de metionina a qual tem função vital para a célula. Quando utilizados na forma de glutaraldeído, estes têm atuação nas proteínas superficiais da célula (EGUCHI, 1989).

POWER & RUSSELL (1990) realizaram estudos para verificar a eficiência do glutaraldeído a 2% (w/v) na inibição da germinação de esporos bacterianos, comparando-o com outros aldeídos comercialmente disponíveis no mercado. Concluíram que Cidex (glutaraldeído) e Sporocidin (glutaraldeído + fenol) foram os mais efetivos, seguidos por formaldeído a 8% (w/v) e Gigasept a 10% (v/v) (produto contendo formaldeído).

POWER et al (1990) verificaram que tratamento com hidróxido de sódio (15 minutos, 22°C) promoveu a germinação de esporos de *B. subtilis* injuriados por várias formulações comerciais contendo aldeídos.

Segundo GRAZIANO et al (1990) entre formaldeído e glutaraldeído, o primeiro é de ação bactericida mais lenta. De acordo com estes autores, o paraformaldeído mostrou atividade esporocida na concentração de 3%, por um período de exposição de 4 horas, para *B. subtilis* e *C. sporogenes*.

2.6.5. Antibióticos

Segundo EGUCHI (1989) antibióticos são tipos especiais de agentes quimioterapêuticos, geralmente obtidos a partir de metabólicos de microrganismos vivos e que em quantidades muito pequenas, podem matar ou inibir outros microrganismos. O mesmo autor citou que os antibióticos mais utilizados na fermentação alcoólica são tetraciclina, cloranfenicol, penicilina e virginiamicina. As formas de ação destes, assim como microrganismos produtores são respectivamente: inibição da ação de cofatores enzimáticos, *Streptomyces* (tetraciclina); inibição de síntese proteica, *Streptomyces venezuelae* (cloranfenicol); inibição da biosíntese de constituintes essenciais da membrana, interferindo no transporte ativo da mesma, *Penicillium notatum* (penicilina); e inibição de síntese proteica, *Streptomyces virginiae* (virginiamicina).

Recentemente foi introduzido no mercado um novo e potente antimicrobiano eficaz contra as principais bactérias prejudiciais ao processo de fermentação alcoólica, chamado Kamoran HJ. Este produto fabricado pela Elanco Química Ltda foi testado durante a safra 93/94 em escala industrial pela Usina da Pedra (Serrana - SP) e pela Fermentec S/C Ltda em laboratório. Os resultados obtidos nestes ensaios mostraram que este antimicrobiano foi eficiente para controlar as principais espécies contaminantes dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* encontradas em fermentação alcoólica.

Kamoram HJ, utilizado nos níveis recomendados (1,0 a 3,0 ppm) atua como bactericida ao alterar a característica da membrana das bactérias sensíveis ao

produto. Desta forma interfere na habilidade de transportar nutrientes para dentro da célula da bactéria levando à destruição da mesma (ANTIBIÓTICO HJ - Elanco, 1994).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Meio para a germinação e multiplicação bacteriana

Como meio para germinação de esporos bacterianos foi utilizado mosto, a 10% de ART (g/100 ml), preparado a partir de xarope concentrado de caldo de cana-de-açúcar esterilizado em autoclave a 1,0 atmosfera de pressão, a 121°C durante 20 minutos.

3.2. Culturas

Suspensões de esporos bacterianos das seguintes espécies foram utilizadas nos experimentos: *B. subtilis* (FT 014B), *B. coagulans* (FT 026B), *B. megaterium* (FT 022B), *B. brevis* (FT 013B), *B. stearothermophilus* (FT 009B) e *Sporolactobacillus sp.* (FT 002B). Estas bactérias foram isoladas de processo fermentativo para a produção de álcool de cana-de-açúcar por RODINI (1985) e GALLO (1989), encontrando-se as mesmas conservadas em estado liofilizado, fazendo parte da coleção de bactérias do Departamento de

Ciência e Tecnologia Agroindustrial, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

3.3. Antimicrobianos

Os antimicrobianos estudados foram os de uso rotineiro nas indústrias de álcool: virginiamicina, penicilina V potássica, tetraciclina, kamoran HJ e quaternários de amônio (Bactol Q e Adesol A-207).

As concentrações empregadas foram aquelas recomendadas pelos fabricantes para o combate aos contaminantes nas unidades industriais, e ainda uma concentração superior e uma inferior.

A dosagem final dos antimicrobianos foi realizada a partir de uma solução estoque para cada um dos produtos testados. O solvente utilizado foi água esterilizada (no caso da virginiamicina foi utilizado álcool para obtenção de uma pasta antes de se adicionar a água). Para as dosagens finais utilizou-se pipeta de alta precisão (GILSON P200).

Os antimicrobianos e as concentrações utilizadas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Doses utilizadas para cada um dos antimicrobianos testados.

ANTIMICROBIANO	CONCENTRAÇÃO (ppm)
VIRGINIAMICINA (Solustaf 1000)	1,0 - 2,0 - 3,0
PENICILINA V POTÁSSICA (1500 UI/mg)	1,0 - 2,0 - 3,0
KAMORAN HJ (90% p.a.)	1,0 - 2,0 - 3,0
BACTOL Q (50% p.a.)	20,0 - 30,0 - 40,0
ADESOL A-207 *	20,0 - 30,0 - 40,0
TETRACICLINA (980 UI/mg)	25,0 - 50,0 - 100,0

* p.a. não fornecido pelo fabricante

3.4. Meios de Cultivo

Para a esporulação das bactérias utilizou-se o meio de cultivo completo para esporulação (Difco 0582).

Para todos os ensaios foi utilizado o meio de cultivo Plate Count Agar (PCA Difco 0479), bem como o mesmo meio de cultivo sem o agar (GLT) (exceto para *B. brevis*, o qual foi realizado com o meio "De Man, Rogosa, Sharpe" - MRS Difco 0881-01-3 e MRSA).

Estes meios de cultivo foram escolhidos uma vez que se mostram adequados para a multiplicação de todas as bactérias estudadas.

3.5. Esporulação

As culturas liofilizadas foram reativadas em tubos de cultura contendo 5 ml de caldo GLT. Depois de incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas, as culturas foram repicadas e incubadas novamente nas mesmas condições, por mais 24 horas. A partir daí, para a obtenção dos esporos realizou-se espalhamento das suspensões das culturas com uma espátula de Drigalsky, em placas de Petri (145 mm x 25 mm), contendo meio de cultivo completo para esporulação. A incubação foi feita em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de 48 a 72 horas, até obter-se esporulação completa com liberação dos mesmos (Figura 1). Esta esporulação foi determinada através do método de coloração de BARTHOLOMEW & MITTWER (1950).

Para a bactéria *B. brevis* realizou-se o mesmo procedimento, utilizando o meio de cultivo MRSA.

FIGURA 1 - ESQUEMA PARA OBTENÇÃO DA ESPORULAÇÃO BACTERIANA

3.6. Coleta dos Esporos

Inicialmente os esporos foram ressuspensos em água destilada esterilizada adicionada de 1 a 2% de Tween 80, resfriada a $\pm 5^{\circ}\text{C}$. Em seguida, as suspensões de esporos foram centrifugadas a 3600 g por 10 minutos. Depois de eliminado o sobrenadante, a massa de esporos foi novamente ressuspensa e centrifugada em água + Tween 80, nas mesmas condições citadas anteriormente, de forma que a temperatura da suspensão não ultrapassou $\pm 15^{\circ}\text{C}$ após a centrifugação. Esta operação foi repetida por 5 vezes com a finalidade de eliminar o máximo possível de "debris" celulares. Os esporos foram posteriormente armazenados em água a $\pm 5^{\circ}\text{C}$ até o momento de serem utilizados, com o volume da suspensão estoque destes esporos constituindo-se de aproximadamente 50 ml.

3.7. Ativação dos Esporos

Para o tratamento de ativação, 5 ml da suspensão de esporos considerada foram transferidos para tubos de ensaio esterilizados. Em seguida, foram submetidos ao aquecimento em banho-maria regulado termostaticamente à temperatura de 80°C por 10 minutos. Após o aquecimento, a suspensão foi rapidamente resfriada em água corrente até atingir a temperatura ambiente. Da suspensão coletou-se amostra de 1,0 ml, a qual foi serialmente diluída e plaqueada em meio de cultivo PCA, com a finalidade de se estimar a população de esporos ativados (Figura 2). As placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e as

contagens das mesmas realizadas após 24 horas de incubação, em contador de colônias com lupa tipo QUEBEC.

3.8. Germinação dos Esporos

Após a determinação da população de esporos ativados, 10 ml da suspensão destes esporos foram transferidos para tubo de ensaio esterilizado e submetido ao tratamento de ativação, como descrito anteriormente. Logo em seguida, inoculou-se 1,0 ml da suspensão de esporos ativados em tubos de ensaio (200 mm x 20 mm) contendo 20 ml de mosto esterilizado (10% ART; pH 5,1-5,2), homogeneizou-se e daí foi retirado 1,0 ml para diluições em série e plaqueamento a fim de se estimar a população de esporos ativados inicialmente presente neste frasco.

Imediatamente após a coleta das amostras para se determinar a população inicial de esporos dosou-se, com pipeta de alta precisão (GILSON P200), os antimicrobianos no mosto inoculado e os mesmos foram pré-incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 6 horas, sendo que novos plaqueamentos foram realizados a cada 3 horas até se completar 6 horas de pré-incubação. Os meios de cultivo e as condições de incubação foram as mesmas citadas anteriormente.

3.9. Avaliação dos Antimicrobianos na Germinação de Esporos Bacterianos

Para avaliação dos antimicrobianos na germinação de esporos o trabalho foi dividido em etapas, sendo que cada uma foi constituída pela utilização de uma suspensão de esporos bacterianos, uma concentração de cada antimicrobiano e dos seis produtos testados. Dessa forma, foi possível avaliar dentro de cada etapa qual o melhor produto para uma determinada suspensão de esporos na concentração estudada.

Como o experimento completo se constituiu na determinação da sensibilidade de seis suspensões diferentes de esporos bacterianos, de seis produtos antimicrobianos e de três concentrações de cada um destes produtos, foram necessárias dezoito etapas, as quais foram realizadas independentemente e em duplicata (Figura 3).

FIGURA 2: ESQUEMA PARA ATIVAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE ESPOROS ATIVADOS

FIGURA 3 - ESQUEMA PARA AVALIAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS NA GERMINAÇÃO DE ESPOROS E NA MULTIPLICAÇÃO BACTERIANA

3.10. Delineamento Experimental e Análise Estatística dos

Dados

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial 6x6x3x3, para a análise da capacidade de germinação dos esporos. Inicialmente optou-se por uma transformação dos dados, porém não se obteve homogeneidade e normalidade dos mesmos. Assim sendo, foi utilizado para a análise estatística a técnica de Modelos Lineares Generalizados, uma vez que os dados apresentavam distribuição de Poisson. Para esta análise o software utilizado foi o SAS 6.8 e o PROC. GENMOD. A execução do programa foi feita no computador SUN ligado em rede através do servidor carpa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das contagens de UFC/ml das espécies de *Bacillus* e *Sporolactobacillus* estudadas, submetidas aos diferentes tratamentos com antimicrobianos em suas respectivas concentrações, encontram-se nas Tabelas 9,10,11,12,13 e 14 do Apêndice e nas Figuras 4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20 e 21.

Nas Tabelas 15,16,17,18,19 e 20 do Apêndice são apresentadas as análises de variância com seus respectivos níveis de significância. De acordo com estas Tabelas, para todos os microrganismos estudados houve efeito significativo ao nível de 1% entre produtos (antimicrobianos), concentração e hora (tempo de contato com o antimicrobiano); e também as suas interações de segunda ordem foram significativas a 1% de significância.

Dentro das interações, houve efeito significativo dos fatores entre si. Desta forma para identificar o melhor antimicrobiano, a concentração mais eficaz e o seu respectivo tempo de atuação foram observados os dados de contagem de UFC/ml.

4.1. Ação dos Antimicrobianos na Germinação de Esporos e Multiplicação das Bactérias

Os valores médios da porcentagem de redução/aumento obtidos no estudo do efeito dos antimicrobianos na germinação de esporos bacterianos e multiplicação de suas respectivas células vegetativas são apresentados nas Tabelas 2,3,4,5,6,7 e 8. De uma forma geral, os resultados obtidos mostraram uma grande variação em relação à sensibilidade das bactérias frente aos produtos testados.

Para efeito de padronização dos resultados, será considerado como ineficiente ou de baixa eficiência o produto que proporcionar redução na população bacteriana de até 50,0%. Será denominado como de razoável eficiência o produto que apresentar de 50,0 a 75,0% de redução e de boa ação ou eficiência aquele produto com percentual de redução acima de 75,0%.

4.1.1. Virginiamicina

Os resultados apresentados nas Figuras 4,5 e 6 e na Tabela 2 mostram que a virginiamicina na concentração de 1,0 ppm, com 3 horas de contato provocou uma razoável redução na população de *B. stearothermophilus* (-64,30%); baixa eficiência para *Sporolactobacillus* sp. (-38,36%), *B. brevis* (-25,71%), *B. subtilis* (-2,86%) e permitiu desenvolvimento para *B. coagulans* (+15,05%) e *B. megaterium* (+67,59%). Aumentando o

período de ação do produto para 6 horas, observou-se razoável redução na população de *B. stearothermophilus* (-68,73%), *Sporolactobacillus* sp. (-65,09), *B. brevis* (-54,03%); baixa eficiência sobre *B. subtilis* (-20,71%) e permitiu o desenvolvimento para *B. coagulans* (+32,52%) e *B. megaterium* (+98,02%).

Na concentração de 2,0 ppm, o antimicrobiano atuando por 3 horas provocou redução apenas razoável para *B. stearothermophilus* (-61,08%); baixa eficiência para *Sporolactobacillus* sp. (-41,47%), *B. brevis* (-34,22%), *B. subtilis* (-14,75%) e permitiu aumento nas contagens de *B. coagulans* (+15,34%) e *B. megaterium* (+19,83%). Já com 6 horas de atuação houve boa redução para *B. subtilis* (-81,15%); razoável controle para *Sporolactobacillus* sp. (-73,50%), *B. stearothermophilus* (-69,40%), *B. brevis* (-66,31%) e desenvolvimento de *B. coagulans* (+14,81%) e *B. megaterium* (+32,78%).

Com 3,0 ppm e 3 horas de contato o produto atuou bem sobre *B. subtilis* (-87,58%) e *B. stearothermophilus* (-77,19%); razoavelmente sobre *B. brevis* (-61,66%); com baixa eficiência sobre *Sporolactobacillus* sp. (-37,13%) e não controlou *B. megaterium* (+9,09%) e *B. coagulans* (+15,60%). Com 6 horas de contato com o produto observou-se boas reduções para *B. subtilis* (-88,98%) e *B. stearothermophilus* (-87,58%); razoáveis reduções para *Sporolactobacillus* sp. (-72,77%) e *B. brevis* (-69,69%) e incremento populacional para *B. megaterium* (+0,83%) e *B. coagulans* (+10,09%).

Portanto para o antimicrobiano Virginiamicina, na concentração de 1,0 ppm, a bactéria mais sensível foi o *B. stearothermophilus* (-68,73%). Já nas

concentrações de 2,0 e 3,0 ppm, a bactéria mais sensível foi *B. subtilis*, com porcentagens de redução de 81,15% e 88,98%, respectivamente.

Estes resultados diferem daqueles encontrados em PRINCIPAIS bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, suas características e sensibilidade a antimicrobianos (1991), onde a virginiamicina na concentração de 1,0 ppm, com 3 horas de contato reduziu a população de *B. brevis* em 2,80%, *B. coagulans* em 48,40%, *B. megaterium* em 41,20% e *B. stearothermophilus* em 73,70%. Quando o tempo de ação do produto aumentou para 6 horas houve redução na população de *B. brevis* de 5,60%, *B. coagulans* de 65,70%, *B. megaterium* de 64,70% e *B. stearothermophilus* de 76,30%. Já *B. subtilis* não apresentou sensibilidade a este produto uma vez que não foi observado redução em sua população.

STUPIELLO (1993) verificou que para a inibição de *B. brevis*, *B. megaterium*, *B. coagulans* e *B. subtilis* foram necessários 0,25 ppm, 0,25 ppm, 0,5 ppm e 0,5 a 1,0 ppm de virginiamicina, respectivamente. Para se atingir a concentração bactericida mínima foram requeridos 16,0 ppm para *B. brevis*, 2,0 ppm para *B. megaterium*, 2,0 ppm para *B. coagulans* e também 2,0 ppm para *B. subtilis*.

Tabela 2: Ação do produto Virginiamicina sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana, nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas (porcentuais de redução/aumento).

VIRGINIAMICINA						
BACTÉRIA	TEMPO = 3 hs			TEMPO = 6 hs		
	CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO		
	1,0ppm	2,0 ppm	3,0 ppm	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm
<i>B. subtilis</i>	- 2,86	- 14,75	- 87,58	- 20,71	- 81,15	- 88,98
<i>B. stearothermophilus</i>	- 64,30	- 61,08	- 77,19	- 68,73	- 69,40	- 87,58
<i>B. coagulans</i>	+ 15,05	+ 15,34	+ 15,60	+ 32,52	+ 14,81	+ 10,09
<i>B. megaterium</i>	+ 67,59	+ 19,83	+ 9,09	+ 98,08	+ 32,78	+ 0,83
<i>B. brevis</i>	- 25,71	- 34,22	- 61,66	- 54,03	- 66,31	- 69,69
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	- 38,36	- 41,47	- 37,13	- 65,09	- 73,50	- 72,77

Figura 4: Ação do antimicrobiano virginiamicina (concentração = 1 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

Figura 5: Ação do antimicrobiano virginiamicina (concentração = 2 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

Figura 6: Ação do antimicrobiano virginiamicina (concentração = 3 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

4.1.2. Penicilina V Potássica

As Figuras 7,8 e 9 e a Tabela 3 mostram a ação do antibiótico penicilina V potássica para os microrganismos estudados. Com 1,0 ppm deste produto e 3 horas de contato houve uma razoável redução no número de *B. stearothermophilus* (-61,24%); pouca redução para *Sporolactobacillus* sp. (-39,29%), *B. brevis* (-35,05%), *B. subtilis* (-18,62%) e desenvolvimento para *B. coagulans* (+16,74%) e *B. megaterium* (+54,42%). Aumentando-se para 6 horas o período de contato com o antimicrobiano houve redução satisfatória para *B. brevis* (-77,36%) e razoáveis reduções para *B. stearothermophilus* (-65,71%) e *Sporolactobacillus* sp. (-65,66%); baixa eficiência no controle para *B. subtilis* (-47,24%) e aumento nas contagens de *B. megaterium* (+56,36%) e *B. coagulans* (+63,72%).

Quando este produto foi utilizado na concentração de 2,0 ppm, com um período de ação de 3 horas foi observado redução satisfatória apenas para *B. stearothermophilus* (-78,16%); baixa eficiência para *B. subtilis* (-49,30%), *B. brevis* (-48,83%), *Sporolactobacillus* sp. (-32,47%) e novamente foi costatado aumento nas contagens para *B. coagulans* (+9,90%) e *B. megaterium* (+10,03%). Com 6 horas de ação foram observadas boas reduções para *B. subtilis* (-93,50%), *B. brevis* (-85,52%), *B. stearothermophilus* (-80,90%), *Sporolactobacillus* sp. (-80,90%) e verificado que *B. megaterium* e *B. coagulans* se mostraram pouco sensíveis uma vez que apresentaram índices de crescimento de 9,70% e 33,33%, respectivamente.

A penicilina V potássica na dosagem de 3,0 ppm, com 3 horas de ação, ocasionou satisfatória redução no número de *B. stearothermophilus* (-80,13%); razoável controle sobre *B. subtilis* (-57,19%), *B. brevis* (-56,13%); baixa eficiência sobre *Sporolactobacillus* sp. (-36,55%), *B. coagulans* (-3,62%) e desenvolvimento apenas para *B. megaterium* (+9,70%). Já com 6 horas de contato com o produto, a população de *B. subtilis* foi reduzida em 96,93%, *B. stearothermophilus* em 89,22%, *B. brevis* em 88,04%, que se constituem em bons níveis de reduções; houve razoável redução na população de *Sporolactobacillus* sp. (-74,45%); baixa eficiência para *B. coagulans* (-9,95%); sendo constatado desenvolvimento para *B. megaterium* (+7,84%).

Portanto a bactéria mais sensível à Penicilina V Potássica, na concentração de 1,0 ppm, foi *B. brevis* (-77,36%). Quando este produto foi utilizado nas concentrações de 2,0 e 3,0 ppm, a maior porcentagem de redução foi obtida para *B. subtilis* (93,50% e 96,93%, respectivamente).

Estes resultados estão de acordo com RODINI (1989) onde a autora citou que *B. megaterium* tem capacidade de se desenvolver quando colocado em doses de até 400 ppm de penicilina. Já a população de *B. subtilis*, segundo ROSALES (1989) é reduzida em 60,50% quando permanece cerca de 180 minutos em contato com 30 ppm deste antimicrobiano, resultados estes semelhantes aos encontrados no presente estudo, onde obtiveram-se reduções de 57,19% com 3 horas de contato para este produto.

De acordo com PRINCIPAIS bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, suas características e sensibilidade a antibióticos (1991), a penicilina

na concentração de 1,0 ppm, com 3 horas de contato, causou redução na população de *B. coagulans* em 14,40%, *B. megaterium* em 8,0%. Com 6 horas de atuação a população destes microrganismos foram reduzidas em 10,80% e 44,00%, respectivamente. Já *B. subtilis*, *B. brevis* e *B. stearothermophilus* apresentaram crescimento quando foram colocados em contato com este produto durante um período de tempo de 6 horas, diferindo dos resultados encontrados no presente trabalho.

Segundo STUPIELLO (1993), para a inibição de *B. brevis* e *B. megaterium* foram necessários 0,5 ppm de penicilina; para a inibição de *B. subtilis* 2,0 ppm e *B. coagulans* apresentou desenvolvimento mesmo com 16,0 ppm deste produto. Para se atingir a concentração bactericida mínima foram requeridos 8,0 ppm de penicilina para *B. brevis*; já para *B. megaterium*, *B. coagulans* e *B. subtilis* esta dose letal não foi obtida com as maiores concentrações utilizadas (16,0 ppm), resultados estes que concordam com os baixos níveis de controle obtidos para *B. coagulans* e *B. megaterium* no presente estudo.

Tabela 3: Ação do produto Penicilina V Potássica sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana, nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas (porcentuais de redução/aumento).

PENICILINA V POTÁSSICA						
BACTÉRIA	TEMPO = 3 hs			TEMPO = 6 hs		
	CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO		
	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm
<i>B. subtilis</i>	- 18,62	- 49,30	- 57,19	- 47,24	- 93,50	- 96,93
<i>B. stearothermophilus</i>	- 61,24	- 78,16	- 80,13	- 65,71	- 85,06	- 89,22
<i>B. coagulans</i>	+ 16,74	+ 9,90	- 3,62	+ 63,72	+ 33,33	- 9,95
<i>B. megaterium</i>	+ 50,42	+ 10,03	+ 9,70	+ 56,36	+ 9,70	+ 7,84
<i>B. brevis</i>	- 35,05	- 48,83	- 56,31	- 77,36	- 85,82	- 88,04
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	- 39,29	- 32,47	- 36,55	- 65,66	- 80,90	- 74,45

Figura 7: Ação do antimicrobiano penicilina V potássica (concentração = 1 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

Figura 8: Ação do antimicrobiano penicilina V potássica (concentração = 2 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

Figura 9: Ação do antimicrobiano penicilina V potássica (concentração = 3 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

4.1.3. Kamoran HJ

De acordo com as Figuras 10,11 e 12 e a Tabela 4, o antimicrobiano kamoran HJ na concentração de 1,0 ppm, com 3 horas de contato causou redução razoável em *B. stearothermophilus* (-56,18%); apresentou baixa eficiência na redução de *B. subtilis* (-25,52%), *Sporolactobacillus* sp. (-25,17%), *B. coagulans* (-10,33%), *B. brevis* (-1,66%) e desenvolvimento para *B. megaterium* (+106,11%). O produto atuando por 6 horas reduziu razoavelmente a população de *B. subtilis* (-63,76%), *B. stearothermophilus* (-60,31%), *Sporolactobacillus* sp. (-55,24%); apresentou baixa eficiência sobre *B. brevis* (-44,32%), *B. coagulans* (-23,18%) e permitiu desenvolvimento para *B. megaterium* (+55,46%).

Quando se utilizou a dosagem de 2,0 ppm e 3 horas de ação a população de *B. stearothermophilus* foi reduzida satisfatoriamente em 76,36%; *B. subtilis* apresentou razoável redução de 52,73% e foi baixa a eficiência do produto para *Sporolactobacillus* sp. (-48,38%), *B. brevis* (-41,31%), *B. megaterium* (-17,63%) e *B. coagulans* (-15,93%). Com esta mesma concentração, porém atuando durante 6 horas as reduções obtidas foram boas para *B. stearothermophilus* (-83,36%) e *Sporolactobacillus* sp. (-79,31%); razoáveis para *B. brevis* (-65,24%) e *B. subtilis* (-55,80%) e, baixa eficiência para *B. coagulans* (-28,15%) e *B. megaterium* (-23,66%).

Já com 3,0 ppm e 3 horas de contato as porcentagens de redução foram bem maiores, sendo boa para *B. stearothermophilus* (-78,75%); razoáveis para *B. subtilis* (-70,91%) e *Sporolactobacillus* sp. (-52,42%) e, baixas para *B. brevis* (-48,82%), *B.*

coagulans (-18,07%) e *B. megaterium* (-5,32%). Com 6 horas de contato com o produto foram obtidas as seguintes porcentagens de redução: *Sporolactobacillus* sp. (-96,29%), *B. subtilis* (-91,34%), *B. stearothermophilus* (-87,92%), mostrando boa eficiência do produto; razoável ação para *B. brevis* (-70,24%) e baixa eficiência para *B. coagulans* (-37,75%) e *B. megaterium* (-36,12%).

Desta forma a bactéria *B. subtilis* foi a mais sensível ao antimicrobiano Kamoran HJ na dosagem de 1,0 ppm, com 63,76% de redução. Quando a concentração deste produto aumentou para 2,0 ppm, a bactéria mais sensível foi *B. stearothermophilus* (-83,36%). Já na concentração de 3,0 ppm, a maior porcentagem de redução foi encontrada para *Sporolactobacillus* sp. (- 96,29%).

De acordo com ANTIBIÓTICO HJ - Elanco (1994) o produto kamoran HJ na concentração de 1,0 ppm, com 6 horas de atuação provocou redução na população de *B. subtilis* ao nível de 13,90%, para *B. brevis* a redução foi de 99,60%, *B. megaterium* (-29,70%) e *B. coagulans* (-15,60%). Aumentando-se a dosagem para 3,0 ppm os percentuais de redução para *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. megaterium* e *B. coagulans* foram de 82,30%, 99,99%, 55,40% e 44,60%, respectivamente. Já *B. stearothermophilus* mostrou-se muito pouco sensível ao produto, não sendo por ele inibido em concentração de 6,0 ppm.

Estes resultados, de uma maneira geral, estão de acordo com os obtidos neste trabalho (principalmente para a dosagem de 3,0 ppm), exceto para *B. stearothermophilus*, a qual apresentou uma das melhores porcentagens de redução para o produto Kamoran HJ.

Tabela 4: Ação do produto Kamoran HJ sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana, nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas (porcentuais de redução/aumento).

KAMORAN HJ						
BACTÉRIA	TEMPO = 3 hs			TEMPO = 6 hs		
	CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO		
	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm
<i>B. subtilis</i>	- 25,52	- 52,73	- 70,91	- 63,76	- 55,80	- 91,34
<i>B. stearothermophilus</i>	- 56,18	- 76,36	- 78,75	- 60,31	- 83,36	- 87,92
<i>B. coagulans</i>	- 10,73	- 15,93	- 18,07	- 23,18	- 28,15	- 37,75
<i>B. megaterium</i>	+106,11	- 17,63	- 5,32	+ 55,46	- 32,66	- 36,12
<i>B. brevis</i>	- 1,66	- 41,31	- 48,82	- 44,32	- 65,24	- 70,24
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	- 25,17	- 48,38	- 52,42	- 55,24	- 79,31	- 96,29

Figura 10: Ação do antimicrobiano Kamoran HJ (concentração = 1 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

Figura 11: Ação do antimicrobiano Kamoran HJ (concentração = 2 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

Figura 12: Ação do antimicrobiano Kamoran HJ (concentração = 3 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

4.1.4. Tetraciclina

Os resultados obtidos com o antimicrobiano tetraciclina são apresentados nas Figuras 13,14 e 15 e na Tabela 5. De acordo com esta Tabela a redução na população de *B. stearothermophilus* exposta a 25,0 ppm deste produto durante 3 horas foi de 65,56%, ou seja apenas razoável. Para as demais bactérias testadas, não houve redução na população após contato com o produto, sendo verificadas os seguintes percentuais de aumentos: *B. brevis* (+6,88%), *B. coagulans* (+7,45%), *B. subtilis* (+8,86%), *Sporolactobacillus* sp. (+33,59%) e *B. megaterium* (+116,67%). Quando o período de contato passou para 6 horas houve razoável redução para *B. stearothermophilus* (-71,79%) e baixa redução para *Sporolactobacillus* sp. (-41,56%). As demais bactérias se desenvolveram apresentando os seguintes percentuais de aumento na população: *B. brevis* (+12,32%), *B. coagulans* (+20,76%), *B. subtilis* (+75,00%) e *B. megaterium* (+123,42%).

Em concentração de 50,0 ppm, com 3 horas de contato houve redução razoável apenas para *B. stearothermophilus* (-61,86%); para *Sporolactobacillus* sp. a redução na população foi baixa (-30,10%), sendo observado desenvolvimento para *B. brevis* (+4,53%), *B. coagulans* (+5,55%), *B. subtilis* (+7,10%) e *B. megaterium* (+39,66%). Atuando por 6 horas o produto controlou bem *B. stearothermophilus* (-86,78%); razoavelmente *Sporolactobacillus* sp. (-62,50%); praticamente não controlou *B. brevis* (-8,89%) e ainda permitiu desenvolvimento de *B. subtilis* (+4,38%), *B. coagulans* (+12,12%) e *B. megaterium* (+33,56%).

Com 100,0 ppm de tetraciclina atuando por 3 horas ocorreu boa redução apenas para *B. stearothermophilus* (-81,56%); *Sporolactobacillus* sp. (-36,49%) e *B. subtilis* (-7,87%) foram ineficientemente controlados; *B. brevis* (+1,39%), *B. coagulans* (+6,41%), *B. megaterium* (+33,33%) apresentaram desenvolvimento durante este período. Finalmente com 6 horas de contato com o produto houve boa redução para *B. stearothermophilus* (-87,23%); razoável para *Sporolactobacillus* sp. (-74,77%); baixa eficiência para *B. brevis* (-35,56%) e para *B. subtilis* (-11,81%); permitindo ainda que houvesse desenvolvimento para *B. coagulans* (+11,11%) e *B. megaterium* (+20,16%).

Portanto o antibiótico Tetraciclina, nas concentrações testadas (25,0; 50,0 e 100,0 ppm), foi mais eficiente no controle de *B. stearothermophilus*, para o qual as porcentagens de redução obtidas foram 71,79%, 86,78% e 87,23%, respectivamente.

De uma maneira geral, a baixa eficiência deste produto sobre as espécies bacterianas testadas estão de acordo com PRINCIPAIS bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, suas características e sensibilidade a antibióticos (1991), onde 10,0 ppm de tetraciclina durante 3 horas praticamente não controlou *B. brevis* (-6,10%), *B. coagulans* (-3,90%) e *B. megaterium* (-24,20%). Com 6 horas de atuação os percentuais de redução para estas bactérias foram de 18,20%, 6,60% e 54,60%, respectivamente. Porém *B. subtilis* e *B. stearothermophilus* não foram controlados com 10,0 ppm de tetraciclina, uma vez que apresentaram percentuais de desenvolvimento com 6 horas de contato da ordem de 9,50% e 13,90%.

No presente trabalho, embora as porcentagens de redução obtidas para *B. stearothermophilus* sejam consideradas boas, as concentrações utilizadas foram bem maiores, ou seja, 25,0; 50,0 e 100,0 ppm.

Tabela 5: Ação do produto Tetraciclina sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana, nas concentrações de 25,0; 50,0 e 100,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas (porcentuais de redução/aumento).

TETRACICLINA						
BACTÉRIA	TEMPO = 3 hs			TEMPO = 6 hs		
	CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO		
	25,0ppm	50,0ppm	100,0ppm	25,0 ppm	50,0 ppm	100,0 ppm
<i>B. subtilis</i>	+ 8,86	+ 7,10	- 7,87	+ 75,00	+ 4,38	- 11,81
<i>B. stearothermophilus</i>	- 65,56	- 61,86	- 81,56	- 71,79	- 86,78	- 87,23
<i>B. coagulans</i>	+ 7,45	+ 5,55	+ 6,41	+ 20,76	+ 12,12	+ 11,11
<i>B. megaterium</i>	+116,67	+ 39,66	+ 33,33	+123,42	+ 33,56	+ 20,16
<i>B. brevis</i>	+ 6,88	+ 4,53	+ 1,39	+ 12,32	- 8,89	- 33,56
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	+ 33,59	- 30,10	- 36,49	- 41,56	- 62,50	- 74,77

Figura 13: Ação do antimicrobiano tetraciclina (concentração = 25 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

Figura 14: Ação do antimicrobiano tetraciclina (concentração = 50 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

Figura 15: Ação do antimicrobiano tetraciclina (concentração = 100 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

4.1.5. Bactol Q

As Figuras 16,17 e 18 e a Tabela 6 mostram a ação do antimicrobiano bactol Q. Na concentração de 20,0 ppm e com tempo de contato de 3 horas foi observada razoável ação para *B. subtilis* (-74,81%), *B. stearothermophilus* (-69,25%), *B. brevis* (-53,74%), *B. megaterium* (-53,24%), *Sporolactobacillus* sp. (-50,94%) e pouca eficiência na redução de *B. coagulans* (-19,62%). Com 6 horas de contato as reduções obtidas foram boas para *Sporolactobacillus* sp. (-94,84%), *B. brevis* (-86,43%) e *B. subtilis* (-78,79%); *B. stearothermophilus* (-72,54%), *B. megaterium* (-54,86%) e *B. coagulans* (-53,59%) foram razoavelmente controlados.

O mesmo produto, porém em concentração de 30,0 ppm , atuando por 3 horas apresentou um bom controle para *B. subtilis* (-93,47%), *B. stearothermophilus* (-81,04%); razoável controle para *B. brevis* (-66,98%), *B. megaterium* (-65,64%), *B. coagulans* (-55,47%) e *Sporolactobacillus* sp. (-50,00%). Com 6 horas de contato foi observado boa ação inibidora para *Sporolactobacillus* sp. (-99,95%), *B. subtilis* (-96,53%), *B. brevis* (-91,05%), *B. megaterium* (-85,42%), *B. stearothermophilus* (-85,19%) e novamente razoável eficiência na inibição de *B. coagulans* (-67,81%).

Em concentração de 40,0 ppm e com 3 horas de atuação ocorreram bons índices de redução para *B. subtilis* (-94,03%), *Sporolactobacillus* sp. (-93,10%), *B. brevis* (-85,83%), *B. stearothermophilus* (-85,42%), enquanto *B. megaterium* e *B. coagulans* apresentaram reduções de 72,17% e 56,60%, respectivamente. Aumentando-se o período de

atuação do produto para 6 horas as porcentagens de redução foram maiores ainda, com boa eficiência do produto para *Sporolactobacillus* sp. (-99,95%), *B. brevis* (-99,60%), *B. subtilis* (-96,79%), *B. stearothermophilus* (-89,31%), *B. megaterium* (-85,19%) e razoável ação para *B. coagulans* (-69,31%).

Desta forma a bactéria *Sporolactobacillus* sp. foi a mais sensível ao produto Bactol Q em todas as dosagens testadas ou seja, com 20,0 ppm de concentração foi observado 94,84% de redução para esta bactéria; já para 30,0 ppm e 40,0 ppm, o percentual de redução foi de 99,95%.

BOONSONG & WIWUT (1985) citaram que com doses de 10,0 a 20,0 ppm de quaternário de amônio a população de *B. subtilis* pode ser controlada, concordando com os dados do presente trabalho. Já OLIVEIRA et al (1987) recomendaram como doses eficientes de 50,0 a 100,0 ppm de quaternário de amônio, quando este produto apresenta de 48,9 a 50,75 % de princípio ativo, respectivamente, para controlar *B. subtilis*.

No trabalho de ROSALES (1989) utilizando concentração de 30,0 ppm de quaternário de amônio, verificou-se redução de 44,30% na população de *B. subtilis*, após 180 minutos de contato com o produto. No presente estudo, a porcentagem de redução obtida para esta espécie bacteriana foi de 93,47% durante o mesmo período de tempo de contato com o produto. Essa diferença poderia ser explicada pela diferente sensibilidade entre as linhagens utilizadas ou pelo percentual de princípio ativo dos produtos testados.

Tabela 6: Ação do produto Bactol Q sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana, nas concentrações de 20,0; 30,0 e 40,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas (porcentuais de redução/aumento).

BACTOL Q						
BACTÉRIA	TEMPO = 3 hs			TEMPO = 6 hs		
	CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO		
	20,0ppm	30,0ppm	40,0ppm	20,0ppm	30,0ppm	40,0 ppm
<i>B. subtilis</i>	- 74,81	- 93,47	- 94,03	- 78,79	- 93,56	- 96,79
<i>B. stearothermophilus</i>	- 69,25	- 81,04	- 85,42	- 72,54	- 85,19	- 89,31
<i>B. coagulans</i>	- 19,62	- 55,47	- 56,60	- 53,59	- 67,81	- 69,34
<i>B. megaterium</i>	- 53,24	- 65,64	- 72,17	- 54,86	- 85,42	- 85,19
<i>B. brevis</i>	- 53,74	- 66,98	- 85,83	- 86,43	- 91,05	- 99,60
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	- 50,94	- 50,00	- 93,10	- 94,84	- 99,95	- 99,95

Figura 16: Ação do antimicrobiano bactol Q (concentração = 20 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp.).

Figura 17: Ação do antimicrobiano bactol Q (concentração = 30 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

Figura 18: Ação do antimicrobiano bactol Q (concentração = 40 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

4.1.6. Adesol A-207

De acordo com as Figuras 19,20 e 21 e com a Tabela 7, onde são apresentados os resultados relativos a avaliação da sensibilidade frente ao antimicrobiano adesol A-207, encontramos que com 20,0 ppm de concentração e 3 horas de contato houve redução razoável para *B. stearothermophilus* (-70,14%); enquanto resultados pouco satisfatórios foram obtidos para *B. subtilis* (-47,64%), *Sporolactobacillus* sp. (-33,96%) e *B. brevis* (-25,90%). As espécies bacterianas *B. coagulans* e *B. megaterium* não foram inibidas nesta situação. Quando o período de contato com o antimicrobiano passou para 6 horas houve um bom controle para *Sporolactobacillus* sp. (-79,56%) e razoáveis eficiências para *B. stearothermophilus* (-74,65%), *B. subtilis* (-73,05%) e *B. brevis* (-69,96%); sendo observado desenvolvimento para *B. coagulans* (+10,50%) e para *B. megaterium* (+46,26%).

Adesol A-207 na concentração de 30,0 ppm e com 3 horas de ação apresentou um controle razoável para *B. subtilis* (-73,05%), *B. stearothermophilus* (-71,62%), *Sporolactobacillus* sp. (-59,48%) e *B. brevis* (-56,37%). *B. coagulans* e *B. megaterium* não apresentaram aumento nas contagens de UFC/ml, porém as porcentagens de redução foram de apenas 9,31% e 7,39%, respectivamente. Quando o período de atuação do produto aumentou para 6 horas houve um bom controle sobre *Sporolactobacillus* sp. (-94,26%), *B. subtilis* (-82,46%), *B. brevis* (-80,41%), *B. stearothermophilus* (-77,49%); *B. coagulans* e *B. megaterium* apresentaram baixas porcentagens de redução, 25,00% e 14,01%, respectivamente.

Aumentando-se a concentração do produto para 40,0 ppm e com 3 horas de ação, houve porcentagem de redução apenas razoável para *B. stearothermophilus* (-74,25%), *B. brevis* (-67,69%), *B. subtilis* (-52,68%), *Sporolactobacillus* sp. (-50,38%). Já *B. coagulans* e *B. megaterium* foram reduzidos ao nível de 15,00%, apenas. Com um período de atuação de 6 horas ocorreu um bom controle para *Sporolactobacillus* sp. (-92,11%), *B. brevis* (-91,31%), *B. subtilis* (-84,49%), *B. stearothermophilus* (-82,18%), sendo que nesta situação o controle foi ineficiente para *B. megaterium* (-30,73%) e para *B. coagulans* (-27,27%).

Portanto o quaternário de amônio Adesol A-207 também controlou melhor *Sporolactobacillus* sp. em todas as dosagens utilizadas. As porcentagens de redução obtidas com 20,0; 30,0 e 40,0 ppm deste antimicrobiano foram 79,56%, 94,26% e 92,11%, respectivamente.

De acordo com STUPIELLO (1993) são necessários 10,0 ppm de quaternário de amônio para inibir *B. brevis*, *B. megaterium*, *B. coagulans* e *B. subtilis*. No que diz respeito à concentração bactericida mínima foram necessários 20,0 ppm para *B. megaterium* e 40,0 ppm para *B. brevis*, *B. coagulans* e *B. subtilis*, resultados estes não concordantes com os citados anteriormente neste trabalho, embora as técnicas utilizadas tenham sido diferentes.

Apesar de no presente trabalho não ter sido testadas doses bactericidas mínimas, os percentuais de redução obtidos para *B. brevis* e *B. subtilis*, na concentração de 40,0 ppm, foram excelentes.

Tabela 7: Ação do produto Adesol A-207 sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana, nas concentrações de 20,0; 30,0 e 40,0 ppm, com tempos de contato de 3 e 6 horas (porcentuais de redução/aumento).

ADESOL A - 207						
BACTERIA	TEMPO = 3 hs			TEMPO = 6 hs		
	CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO		
	20,0ppm	30,0ppm	40,0ppm	20,0ppm	30,0ppm	40,0 ppm
<i>B. subtilis</i>	- 47,64	- 73,05	- 52,68	- 73,05	- 82,46	- 84,49
<i>B. stearothermophilus</i>	- 70,14	- 71,62	- 74,25	- 74,65	- 77,49	- 82,18
<i>B. coagulans</i>	+ 12,79	- 9,31	- 15,15	+ 10,50	- 25,00	- 27,27
<i>B. megaterium</i>	+ 38,79	- 7,39	- 14,15	+ 46,26	- 14,01	- 30,73
<i>B. brevis</i>	- 25,90	- 56,37	- 67,69	- 69,96	- 80,41	- 91,31
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	- 33,96	- 59,48	- 50,38	- 79,56	- 94,26	- 92,11

Uma visão geral da ação dos diferentes antimicrobianos utilizados no presente trabalho sobre todas as bactérias testadas, encontra-se na Tabela 8.

Figura 19: Ação do antimicrobiano adesol A-207 (concentração = 20 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

Figura 20: Ação do antimicrobiano adesol A-207 (concentração = 30 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana (BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

Figura 21: Ação do antimicrobiano adesol A-207 (concentração = 40 ppm; tempos de contato = 3 e 6 horas) sobre a germinação de esporos e multiplicação bacteriana BSU = *B. subtilis*, BST = *B. stearothermophilus*, BCO = *B. coagulans*, BME = *B. megaterium*, BBR = *B. brevis*, SPO = *Sporolactobacillus* sp).

Tabela 8: Ação dos diferentes antimicrobianos testados sobre as bactérias esporuladas utilizadas (porcentuais de redução/aumento)

		ANTIMICROBIANOS																	
		VIRGINIAMICINA			PENICILINA V POTÁSSICA			KAMORAN HJ			TETRACICLINA			BACTOL Q			ADESOL A-207		
BACTERIA	TEMPO	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm	25,0 ppm	50,0 ppm	100,0 ppm	20,0 ppm	30,0 ppm	40,0 ppm	20,0 ppm	30,0 ppm	40,0 ppm
<i>Bacillus</i>	3 h	-2,9	-14,8	-87,6	-18,6	-49,3	-57,2	-25,5	-52,7	-70,9	+8,9	+7,1	-7,9	-74,8	-93,5	-94,0	-47,6	-73,1	-52,7
<i>subtilis</i>	6 h	-20,7	-81,2	-89,0	-47,2	-93,5	-96,9	-63,8	-55,8	-91,3	+75,0	+4,4	-11,8	-78,8	-93,6	-96,8	-73,1	-82,5	-84,5
<i>B. stearo-thermophilus</i>	3 h	-64,3	-61,1	-77,2	-61,2	-78,2	-80,1	-56,2	-76,4	-78,8	-65,6	-61,9	-81,6	-69,3	-81,0	-85,4	-70,1	-71,6	-74,3
	6 h	-68,7	-69,4	-87,6	-65,7	-85,1	-89,2	-60,3	-83,4	-87,9	-71,8	-86,8	-87,2	-72,5	-85,2	-89,3	-74,7	-77,5	-82,2
<i>Bacillus coagulans</i>	3 h	+15,1	+15,3	+15,6	+16,7	+9,9	-3,6	-10,7	-15,9	-18,1	+7,5	+5,6	+6,4	-19,6	-55,5	-56,6	+12,8	-9,3	-15,2
	6 h	+32,5	+14,8	-10,1	+63,7	+33,3	-10,0	-23,2	-28,2	-37,8	+20,8	+12,1	+11,1	-53,6	-67,8	-69,3	+10,5	-25,0	-27,3
<i>Bacillus megaterium</i>	3 h	+67,6	+19,8	+9,1	+50,4	+10,0	+9,7	+116,1	-17,6	-5,3	+116,7	+39,7	+33,3	-53,2	-65,6	-72,2	+38,8	-7,4	-14,2
	6 h	+98,1	+32,8	+0,8	+56,4	+9,7	+7,8	+55,5	-32,7	-36,1	+123,4	+33,6	+20,2	-54,9	-85,4	-85,2	+46,3	-14,0	-30,7
<i>Bacillus brevis</i>	3 h	-25,7	-34,2	-61,7	-35,1	-48,8	-56,3	-1,7	-41,3	-48,8	+6,9	+4,5	+1,4	-53,7	-67,0	-85,8	-25,9	-56,4	-67,7
	6 h	-54,0	-66,3	-70,0	-77,4	-85,8	-88,0	-44,3	-65,2	-70,2	+12,3	-8,9	-33,6	-86,4	-91,1	-99,6	-70,0	-80,4	-91,3
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	3 h	-38,4	-41,5	-37,3	-39,3	-32,5	-36,6	-25,2	-48,4	-52,4	+33,6	-30,1	-36,5	-50,9	-50,0	-93,1	-34,0	-59,5	-50,4
	6 h	-65,1	-73,5	-72,8	-65,7	-80,9	-74,5	-55,2	-79,3	-96,3	-41,6	-62,5	-74,8	-94,8	-99,9	-99,9	-79,6	-94,3	-92,1

5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos permite as seguintes conclusões:

- 5.1. As porcentagens de redução na população bacteriana foram maiores para as concentrações mais elevadas de cada antimicrobiano, com raras exceções.
- 5.2. Todos os antimicrobianos testados foram mais eficientes quando permaneceram em contato com as bactérias durante um período de tempo de seis horas.
- 5.3. Para todos os antimicrobianos testados e em todas as dosagens utilizadas, *B. coagulans* e *B. megaterium* foram as bactérias menos sensíveis.
- 5.4. Dos antimicrobianos testados, o produto que apresentou melhor controle para todas as bactérias utilizadas, com períodos de contato de 3 e 6 horas, foi o Bactol Q.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTERTHUM, F.; CRUZ, M.R.M.; VAIRO, M.L.R.; GAMBASSI, D.M. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. *STAB. Açúcar, Alcool e Subprodutos*, Piracicaba, 3(1): 42-9, 1984.
- AMORIM, H.V. de & OLIVEIRA, A.J. de. Infecção na fermentação: como evitá-la. *Alcool e Açúcar*, São Paulo, 2(5): 12-8, 1982.
- AMORIM, H.V. de; OLIVEIRA, A.J. de; CAMPOS, H. de Infecção, problema sério na produção de álcool. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS DO BRASIL, 2., Rio de Janeiro, 1981. *Anais*. Piracicaba, STAB, 1981. p.158-68.
- AMORIM, H.V. de; OLIVEIRA, A.J. de; ZAGO, E.A.; BASSO, L.C.; GALLO, C.R. *Processos de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento*. Piracicaba, Centro de Biotecnologia Agrícola, 1989. 145p.

- ANDO, Y. Studies on germination of spores of Clostridial species capable of causing food poisoning. I. Factores affecting the germination of spores of *Clostridium botulinum* type A in chemically defined medium. *Journal Food Hygienic Society of Japan*, Tokyo, **14**: 457-61, 1973.
- ANDO, Y. & LIDA, H. Factors affecting the germination of spores of *Clostridium botulinum* type E. *Japan Journal Microbiology*, Tokio, **14**: 361-70, 1970.
- ANDRADE, N.J. de & SERRANO, A. de M. Uso de esporos de *Bacillus subtilis* para avaliar a eficiência do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e valores de pH. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, **24**(1): 26-31, 1993.
- ANTIBIÓTICO HJ - Elanco: Resumo dos testes com bactericida "in vitro" executado pela Fermentec. 1994. s.n.t.
- BAIRD-PARKER, A.C. & FREAME, B. Combined effect of water activity, pH, and temperature on the growth of *Clostridium botulinum* from spore and vegetative cell inocula. *Journal of Applied Bacteriology*, London, **30**: 420, 1967.
- BARTHOLOMEW, J.W. & MITTWER, T. A simplified bacterial spore stain. *Stain Technology*, Geneva, **25**: 153-6, 1950.

BAYLISS, C.E.; WAITES, W.M.; KING, N.R. Resistance and structure of spore of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, London, **50**: 379-90, 1981.

BERKELEY, R.C.W. & ALI, N. Classification and identification of endospore-forming bacteria. IN: SOCIETY FOR APPLIED BACTERIOLOGY SYMPOSIUM, Oxford, Blackwell Scientific Publication. 1994. Proceedings. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, **76**: 1-8, 1994. (Supplement)

BEVAN, D. & BOND, J. Microorganism in field and mill - A preliminary survey. In: QUEENSLAND SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 38., Cairns, 1971. *Proceedings*. Brisbane, Watson Ferguson, 1971. p.137-43.

BLOOMFIELD, S.F. & ARTHUR, M. Interaction of *Bacillus subtilis* spores with sodium hypochlorite, sodium dichloroisocyanurate and chloramine-T. *Journal of Applied Bacteriology*, London, **72**: 166-72, 1992.

BLOOMFIELD, S.F. & ARTHUR, M. Mechanisms of inactivation and resistance of spores to chemical biocides. IN: SOCIETY FOR APPLIED BACTERIOLOGY SYMPOSIUM, Oxford, Blackwell Scientific Publication. 1994. Proceedings. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, **76**: 91-104, 1994. (Supplement)

- BLOOMFIELD, S.F. & MEIGID, R. Interaction of iodine with *Bacillus subtilis* spores and spore forms. *Journal of Applied Bacteriology*, London, **76**: 492-99, 1994.
- BOONSONG, S. & WIWUT, D. Quaternary ammonium compounds. Chemical control of bacteria in sugar cane by using quaternary ammonium compounds. *Kasetsart Journal*, Bangkok **19**(3): 213-20, 1985. Apud *Tate & Lyle's SIA*, Brussels, **49**(3): 97, 1987. (Resumo)
- CANA/AÇÚCAR e álcool. *Informativo quinzenal sobre a indústria sucro-alcooleira*. São Paulo, (18), 1992.
- COOTE, P.J.; BILLON, C.M.P.; PENNELL, S.; McCLUSE, P.J.; FERDINANDO, D.P.; COLE, M.B. The use of confocal scanning laser microscopy (CSLM) to study the germination of individual spores of *Bacillus cereus*. *Journal of Microbiological Methods*. Elsevier, **21**: 193-208, 1995.
- CURRAN, H. R. & EVANS, F.R. Heat activation inducing germination in the spores of thermotolerant and thermophilic aerobic bacteria. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **49**: 335-46, 1945.

CURRAN, H.R. & KANAYSI, G. Survey of fourteen metabolic inhibitors for their effect on endospore germination in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **92**: 793-97, 1962.

DIFCO Manual; dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10 ed. Detroit, Difco, 1984. 1155p.

DRINK, G.L. & GOULD, G. W. Electron transport-linked metabolism during germination of *Bacillus cereus* spores. *Journal of General Microbiology*, London, **98**: 488-94, 1975.

DUNCAN, C.L. & COLMER, A.R. Coliforms associated with sugar cane plants and juice. *Applied Microbiology*, Washington, **12**(2): 173-7, 1964.

DUQUE, C.R.B.G. Efeito da temperatura de ativação, pH e tempo de incubação na germinação de esporos de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica. Piracicaba, 1991. 71p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz" /USP)

- EGUCHI, S.Y. Agentes Antimicrobianos. 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 "André Tosello", 1989. p.1-22.
- ERRINGTON, J. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. *Microbiological Reviews*, Oxford, **57**(1): 1-33, Mar. 1993.
- FINLEY, N. & FIELDS, M.L. Heat activation and heat-induced dormancy in *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied Microbiology*, Washington, **10**: 231-36, 1962.
- FOSTER, D.H. Sugar processing difficulties. *Sugar Journal*, New Orleans, **60**: 529-31, 1969.
- FOSTER, S.J. The role and regulation of cell wall structural dynamics during differentiation of endospore-forming bacteria. IN: SOCIETY FOR APPLIED BACTERIOLOGY SYMPOSIUM, Oxford, Blackwell Scientific Publication. 1994. Proceedings. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, **76**: 25-39, 1994. (Supplement)
- FREESE, E.; PARK, S.W.; CASHEL, M. The developmental significance of alanine dehydrogenase in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Science*, Washington, **51**: 1164-72, 1964.

GALLI, F. Fermentação do mel final das usinas de açúcar. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 2., Piracicaba, 1961. p. 297-304.

GALLO, C.R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. Campinas, 1989, 338p. (Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP)

GALLO, C.R. & CANHOS, V.P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica - revisão. *STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, 9(4/5): 35-40, mar./jun. 1991.

GIBBS, P.A. Factors affecting germination of spores of *Clostridium bifermentans*. *Journal of General Microbiology*, London, 37: 41-48, 1964.

GOMBAS, D.E. Bacterial sporulation and germination. IN: THOMAS, S. ed . *Food microbiology. Concepts in physiology and metabolism*. Moutville, 1987. v.1, cap.5, p.131-55.

GOULD, G.W. Germination and the problems of dormancy. *Journal of Applied Bacteriology*, London, 33: 34-9, 1970.

GOULD, G.W. & ORDAL, Z.J. Activation of spores of *Bacillus cereus* by radiation.

Journal of General Microbiology, London, **50**: 77-84, 1968.

GRAZIANO, K.U.; CIANCIARULLO, T.I.; FILHO, P.P.G. Avaliação da atividade esterilizante de pastilhas de paraformaldeído. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, **21**(2): 167-9, 1990.

GUTIERREZ, L.E.; AMORIM, H.V. de; BASSO, L.C. Inibidores da fermentação alcoólica. *STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, **9**(6): 24-9, 1991.

HAGEN, C.A.; HAWRYLEWCZ, E.J.; EHRLICH, R. Survival of microorganisms in a simulated martian environment. II moisture and oxigen requeriments of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* var. *niger* spores. *Applied Microbiology*, Washington, **15**: 285-91, 1967.

HASHIMOTO, T.; FRIEBEN, W.R.; CONTI, S.F. Germination of single bacterial spores. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **98**(3): 1011-20, 1969.

HITZMAN, D.O.; HALVORSON, H.O.; UKITA, T. Requeriments for production and germination of spores of anaerobic bacteria. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **74**: 1-7, 1957.

HYATT, M.T. & LEVINSON, H.S. Sulfur requirements for post-germinative development of *Bacillus megaterium* spores. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **74**: 87-93, 1957.

HYATT, M.T. & LEVINSON, H.S. Conditions affecting *Bacillus megaterium* spore germination in glucose or various nitrogenous compounds. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **83**: 1231-7, 1962.

HYATT, M.T.; HOLMES, P.K.; LEVINSON, H.S. Activation of *Bacillus megaterium* spore germination by water in the vapor phase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, **24**: 701-4, 1966.

ISSAHARY, G.; EVENCHIK, Z.; KEYNAN, A. Low-pH activation of *Bacillus cereus* spores. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **101**: 418-22, 1970.

JOHNSTONE, K. The trigger mechanism of spore germination: current concepts. IN: SOCIETY FOR APPLIED BACTERIOLOGY SYMPOSIUM, Oxford, Blackwell Scientific Publication. 1994. Proceedings. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, **76**: 17-24, 1994. (Supplement)

KANDA, K.; YASUDA, Y.; TOCHIKUBO, K. Germination response of *Bacillus subtilis* PC 1219 to caramelized sugar and L-asparagine. *Journal of Food Science*, London, **56**(5): 1399-403, 1991.

KEYNAN, A.; EVENCHIK, Z.; HALVORSON, H.O.; HASTINGS, J.W. Activation of bacterial endospores. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **88**: 313-18, 1964.

KHAN, A.R. & HOQ, M.M. Lactic acid bacteria as contaminants in alcohol fermentation. *Bangladesh Journal of Microbiology*, Bangladesh, **7**(2): 119-21, 1990. Apud *Sugar Industry Abstract*, Brussels, **54**(2): 55, 1992. (Resumo)

KIRK, B. & HAMBLETON, R. Optimized dipicolinate activation for viable counting of *Bacillus stearothermophilus* spores. *The Society for Applied Bacteriology*, Baltimore, **53**: 147-54, 1982.

LAWRENCE, C.A. & BLOCK, S.S. *Desinfection, sterilization and preservation*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1968. 808p.

LEE, W.H. & ORDAL, Z.J. Reversible activation for germination and subsequent changes in bacterial spores. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **85**: 207-71, 1963.

- LEVINSON, H.S. & HYATT, M.T. The stimulation of germination and respiration of *Bacillus megaterium* spores by manganese, L-alanine and heat. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **70**: 368-74, 1955.
- LEVINSON, H.S. & HYATT, M.T. Some effects of heat and ionizing radiation on spores of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **80**: 441-51, 1960.
- LEVINSON H.S. & HYATT, M.T. Nitrogenous compounds in germination and post-germination development of *Bacillus megaterium* spores. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **83**: 1224-30, 1962.
- LEVINSON, H.S. & HYATT, M.T. Sequence of events during *Bacillus megaterium* spores germination. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **91**: 1811-8, 1966.
- LEVINSON, H.S. & HYATT, M.T. Effects of temperature on activation, germination and outgrowth of *Bacillus megaterium* spores. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **101**: 58-64, 1970.
- LEVINSON, H.S. & SEVAG, M.G. Stimulation of germination and respiration of the spores of *Bacillus megaterium* by manganese and monovalent ions. *Journal of General Physiology*, New York, **36**: 617-29, 1953.

LOPEZ, Z.O.; MORENO, I.E.; FOGLIATA, F.A.; AYALA, H.G. Microbial population of sugar juice that is neither affected nor deteriorated by frost. *Sugar y Azúcar*, New York, **83**(9): 21-33, 1988.

LUCREDI, H.A.; FINGUERUT, J.; ROSSEL, C.E.V.; YOKOYA, F. Verificação da esterilidade do sistema de tratamento térmico do caldo de cana-de-açúcar para a fermentação. *Boletim Técnico Copersucar*, Piracicaba, **27**(84): 25-8, 1984.

MacMASTER, L.D. & RAVNO, A.B. Sucrose loss in diffusion with reference to thermophilic bacteria and lactic acid. In: SOUTH AFRICAN SUGAR TECHNOLOGY ASSOCIATION. Durban, 1975. *Proceedings*. Mountegcombe, SASTA, **49**: 49-52.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.H. By product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, New york, **25**: 103-21, 1983.

MORAN, L.; ROWE, M.T.; HAGAN, J.A. The effects of various heat activation treatments on fast intermediate and slow germinating spores of *Bacillus* spp. *Letters in Applied Microbiology*, Washington, **10**: 43-6, 1990.

O'BRIEN, R.T. & CAMPBELL, JR.L.L. The nutritional requeriments for germination and outgrowth of spores and vegetative cell growth of some aerobic spore formating bacteria. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **73**: 522-5, 1957.

OLIVA-NETO, P. Influência da contaminação por bactérias láticas na fermentação alcoólica por batelada-alimentada. Campinas, 1990. 199p. (Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP)

OLIVEIRA, M.C.F.L.; ANTUNES, G.M.S.; SACRAMENTO, S. Estudo prévio para normatização de técnicas para avaliação de bactericidas. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB 4; CONVENÇÃO DA ACTALAC 7, Olinda, 1987. *Anais*. Piracicaba, STAB, 1987. p.547-61.

PARKER, M.S. & BRADLEY, T.J. A reversible inhibition of the germination of bacterial spores. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, **14**: 745-6, 1968.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Morfologia e ultra-estrutura das bactérias.

IN:_____. *Microbiologia*. São Paulo, McGraw-Hill do Brasil, 1980. v.1, cap.5, p.105-9.

POWELL, J.F. & HUNTER, J.R. Spore germination in genus *Bacillus*: the modification of germination requirements as a result of pre-heating. *Journal of General Microbiology*, London, **13**: 59-67, 1955.

POWER, E.G.M.; RUSSELL, A.D. Sporocidal action of alkaline glutaraldehyde: factors influencing activity and a comparison with others aldehydes. *Journal of Applied Bacteriology*, London, **69**: 261-8, 1990.

POWER, E.G.M.; DANCER, B.N.; RUSSELL, A.D. Effect of sodium hydroxide and two proteases on the revival of aldehyde-treated spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, Washington, **10**: 9-13, 1990.

PRINCIPAIS bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, suas características e sensibilidade a antibióticos. Piracicaba, Fermentec s/c Ltda, 1991. 41p.

PULVERTAFT, R.J.V. & HAYNES, J.A. Adenosine spore germination: phases contrast studies. *Journal of General Microbiology*, London, **13**: 474-80, 1951.

RODINI, M.A.T. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias contaminantes de dornas de fermentação nas destilarias de etanol. Piracicaba, 1985. 92p. (Mestrado-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz"/USP)

- RODINI, M.A.T. Bactérias contaminantes do processo de fermentação de etanol e sua sensibilidade frente à penicilina e pentaclorofenol. *STAB, Açúcar, Alcool e Subprodutos*, Piracicaba, **8**(2): 52-4, 1989.
- ROSALES, S.Y.R. Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes. Rio Claro, 1989. 200p. (Doutorado - Universidade Júlio de Mesquita Filho/UNESP)
- ROTH, N.G. & LIVELY, D.H. Germination of spores of certain aerobic bacilli under aerobic conditions. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **71**: 162, 1956.
- SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.; BERTOZO, M.T.; VICENTE, A.T. Contaminação da fermentação alcoólica "floculação do fermento". *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, **93**(6): 26-31, 1979.
- SETLOW, P. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus* species. IN: SOCIETY FOR APPLIED BACTERIOLOGY SYMPOSIUM, Oxford, Blackwell Scientific Publication. 1994. Proceedings. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, **76**: 49-60, 1994. (Supplement)

SILVA, N. Influência do resfriamento em torre sobre a microflora do caldo de cana no processo de produção de álcool. Campinas. 1988, 117p. (Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP)

SMOOT, L.A. & PIERSON, M.D. Inhibition and control of bacterial spore germination. *Journal of Food Protection*, Ames **45**(1): 84-92, 1982.

STUPIELLO, M. da G. Avaliação de metodologia para estudo da ação de alguns antimicrobianos frente a bactérias Gram (+) isoladas da fermentação alcoólica. Piracicaba, 1993. 96p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

TILBURY, R.H. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in sugar industry. In: CAN, J.G.; CUTING, C.V.; WHITING, G.C. *Lactic acid bacteria in beverages and foods*. London, Academic Press, 1975. p.177-91.

TILBURY, R.H.; HOLLINGSWORTH, B.S.; GRAHAM, S.D.; POTTAGE, P. Mill sanitation - A fresh approach to biocide evaluation. In: I.S.S.C.T., 16., São Paulo, 1977. *Proceedings*. **3**: 2749-68.

TRUJILLO, R. & LAIBLE, M. Reversible inhibition of spore germination by alcohols.

Applied Microbiology, Washington, **20**: 620-3, 1970.

UEHARA, M. & FRANK, H.A. Sequence of events during germination of putrefactive anaerobic 3679 spore. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **94**: 506-11, 1967.

VARY, J.C. & HALVORSON, H.O. Kinetics of germination of *Bacillus* spores. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, **89**: 1340-7, 1965.

WILLIAMS, N.D. & RUSSELL, A.D. Revival of *Bacillus subtilis* spores from biocide-induced injury in the germination process. *Journal of Applied Bacteriology*, London, **75**: 76- 81, 1993.

WOESE, C.R.; VARY, J.C.; HALVORSON, H.O. A kinetic model for bacterial spore germination. *Proceedings of the National Academy Science*, Washington, **59**: 869, 1968.

WOLF, J. & MAHMOUD, S.A.Z. The effects of L- and D-alanine on the germination of some *Bacillus* spores. *Journal of Applied Bacteriology*, London, **20**: 373, 1957.

- YOKOYA, F. Microbiologia de processo. 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 "André Tosello", 1989. p. 1-22.
- YOKOYA, F. & OLIVA-NETO, P. Caracterização da flocculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum*. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, **22**(1): 12-6, 1991.
- ZECHAMAN, L.G. & PFLUG, I.J. *Bacillus stearothermophilus* spore recovery altered by media concentration and formulation. *Journal of Food Science*, London, **56**: 1408-11, 1991.

APÊNDICE

Tabela 9: Contagens de UFC x 10^6 /ml frente ao produto Virginiamicina nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 ppm, e com tempos de contato de 3 e 6 horas.

VIRGINIAMICINA									
BACTÉRIA	TEMPO = 0 hs			TEMPO = 3 hs			TEMPO = 6 hs		
	CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO		
	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm
<i>B. subtilis</i>	1,40	1,22	1,00	1,36	1,04	0,12	1,11	0,23	0,11
<i>B. stearothermophilus</i>	79,00	83,00	64,00	28,20	32,30	14,60	24,70	25,40	7,95
<i>B. coagulans</i>	20,60	18,90	21,80	23,70	21,80	25,20	27,30	21,70	24,00
<i>B. megaterium</i>	2,53	3,63	2,42	4,24	4,35	2,64	5,01	4,82	2,44
<i>B. brevis</i>	3,85	3,77	1,93	2,86	2,48	0,74	1,77	1,27	0,59
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	15,90	21,70	20,20	9,80	12,70	12,70	5,55	5,75	5,50

Tabela 10: Contagens de UFC x 10^6 /ml frente ao produto Penicilina V Potássica nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 ppm, e com tempos de contato de 3 e 6 horas.

PENICILINA V POTÁSSICA									
BACTÉRIA	TEMPO = 0 hs			TEMPO = 3 hs			TEMPO = 6 hs		
	CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO		
	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm
<i>B. subtilis</i>	1,45	1,42	1,60	1,18	0,72	0,69	0,77	0,09	0,05
<i>B. stearothermophilus</i>	80,50	87,00	74,50	31,20	19,00	14,80	27,60	10,00	8,03
<i>B. coagulans</i>	21,50	19,20	22,10	25,10	21,10	21,30	27,80	25,60	19,90
<i>B. megaterium</i>	2,36	2,99	2,68	3,55	3,29	2,94	3,69	3,28	2,89
<i>B. brevis</i>	3,68	3,42	2,14	2,39	1,75	0,94	0,83	0,49	0,26
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	19,60	24,50	23,80	11,90	8,15	15,10	6,73	4,68	6,08

Tabela 11: Contagens de UFC x 10^6 /ml frente ao produto Kamoran HJ nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0 ppm, e com tempos de contato de 3 e 6 horas.

KAMORAN HJ									
BACTÉRIA	TEMPO = 0 hs			TEMPO = 3 hs			TEMPO = 6 hs		
	CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO		
	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm	1,0 ppm	2,0 ppm	3,0 ppm
<i>B. subtilis</i>	1,49	1,10	1,12	1,08	0,52	0,50	0,54	0,32	0,10
<i>B. stearothermophilus</i>	65,50	71,50	72,00	28,70	16,90	15,30	26,00	11,90	8,70
<i>B. coagulans</i>	23,30	27,00	24,90	20,80	22,70	20,40	17,90	19,40	15,50
<i>B. megaterium</i>	2,29	4,65	2,63	4,72	3,83	2,49	3,56	3,55	1,68
<i>B. brevis</i>	3,61	3,61	2,11	3,55	2,33	1,08	2,01	1,38	0,63
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	14,30	17,30	18,60	10,70	8,93	8,85	6,40	3,58	0,69

Tabela 12: Contagens de UFC x 10^6 /ml frente ao produto Tetraciclina nas concentrações de 25,0; 50,0 e 100,0 ppm, e com tempos de contato de 3 e 6 horas.

TETRACICLINA									
BACTÉRIA	TEMPO = 0 hs			TEMPO = 3 hs			TEMPO = 6 hs		
	CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO		
	25,0 ppm	50,0 ppm	100,0 ppm	25,0 ppm	50,0 ppm	100,0 ppm	25,0 ppm	50,0 ppm	100,0 ppm
<i>B. subtilis</i>	0,88	0,85	1,27	0,96	0,91	1,17	1,54	0,81	1,12
<i>B. stearothermophilus</i>	75,50	59,00	70,50	26,00	22,50	13,00	21,30	7,80	9,00
<i>B. coagulans</i>	23,60	19,80	23,40	25,50	20,90	24,90	28,50	22,20	26,00
<i>B. megaterium</i>	2,22	2,95	2,43	4,81	4,12	3,24	4,96	3,94	2,92
<i>B. brevis</i>	3,49	2,87	1,80	3,73	3,00	1,64	3,92	2,91	1,16
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	12,80	19,60	22,20	17,10	13,70	14,10	7,48	7,35	5,60

Tabela 13: Contagens de UFC x 10^6 /ml frente ao produto Bactol Q nas concentrações de 20,0; 30,0 e 40,0 ppm, e com tempos de contato de 3 e 6 horas.

BACTOL Q									
BACTÉRIA	TEMPO = 0 hs			TEMPO = 3 hs			TEMPO = 6 hs		
	CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO		
	20,0 ppm	30,0 ppm	40,0 ppm	20,0 ppm	30,0 ppm	40,0 ppm	20,0 ppm	30,0 ppm	40,0 ppm
<i>B. subtilis</i>	0,53	0,95	1,59	0,13	0,06	0,10	0,11	0,03	0,05
<i>B. stearothermophilus</i>	67,00	77,00	72,00	20,60	14,60	10,50	18,40	11,40	7,70
<i>B. coagulans</i>	20,90	24,70	21,20	16,80	11,00	9,20	9,70	7,95	6,50
<i>B. megaterium</i>	2,16	2,27	2,12	1,01	0,78	0,59	0,98	0,33	0,31
<i>B. brevis</i>	3,61	3,15	1,63	1,67	1,04	0,23	0,49	0,28	0,007
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	15,90	18,70	22,90	7,75	9,35	1,58	0,82	0,01	0,014

Tabela 14: Contagens de UFC x 10⁶/ml frente ao produto Adesol A-207 nas concentrações de 20,0; 30,0 e 40,0 ppm, e com tempos de contato de 3 e 6 horas.

ADESOL A - 207									
BACTÉRIA	TEMPO = 0 hs			TEMPO = 3 hs			TEMPO = 6 hs		
	CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO			CONCENTRAÇÃO		
	20,0 ppm	30,0 ppm	40,0 ppm	20,0 ppm	30,0 ppm	40,0 ppm	20,0 ppm	30,0 ppm	40,0 ppm
<i>B. subtilis</i>	2,33	2,24	2,87	1,22	1,06	0,70	0,63	0,39	0,45
<i>B. stearothermophilus</i>	71,00	83,50	87,00	21,20	23,70	22,40	18,00	18,80	16,50
<i>B. coagulans</i>	21,90	20,40	19,80	24,70	18,50	16,80	24,20	15,30	14,40
<i>B. megaterium</i>	2,14	2,57	2,05	2,97	2,38	1,76	3,13	2,21	1,42
<i>B. brevis</i>	2,78	3,14	1,30	2,06	1,37	0,42	0,84	0,62	0,11
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	15,90	15,30	13,30	10,50	6,23	6,60	3,25	0,88	1,05

Tabela 15: Análise de Variância para *Bacillus subtilis*

The GENMOD Procedure			
LR Statistics For Type 3 Analysis			
Source	DF	ChiSquare	Pr>Chi
CONC	2	2572.3771	0.0000
HORA	2	22653.3867	0.0000
PROD	5	12171.8217	0.0000
CONC*PROD	10	4023.4175	0.0000
CONC*HORA	4	3870.7421	0.0000
PROD*HORA	10	10251.8129	0.0000
CONTRAST Statement Results			
Contrast	DF	ChiSquare	Pr>Chi Type
conc(prod1)	2	3807.4904	0.0000 LR
conc(prod2)	2	1411.7532	0.0000 LR
conc(prod3)	2	1941.8132	0.0000 LR
conc(prod4)	2	308.8492	0.0000 LR
conc(prod5)	2	126.8403	0.0000 LR
conc(prod6)	2	539.5185	0.0000 LR
sq-conc(prod)	12	7663.9723	0.0000 LR
prod(conc1)	5	7563.1815	0.0000 LR
prod(conc2)	5	4807.2736	0.0000 LR
prod(conc2)	5	7034.5363	0.0000 LR
sq-prod(conc)	15	16168.8751	0.0000 LR
hora(prod1)	2	2960.1670	0.0000 LR
hora(prod2)	2	5917.9565	0.0000 LR
hora(prod3)	2	4686.8829	0.0000 LR
hora(prod4)	2	73.9806	0.0000 LR
hora(prod5)	2	7811.3019	0.0000 LR
hora(prod6)	2	9832.9268	0.0000 LR
sq-hora(prod)	12	30592.8149	0.0000 LR
prod(hora1)	5	6261.2823	0.0000 LR
prod(hora2)	5	6452.6064	0.0000 LR
prod(hora3)	5	8754.0015	0.0000 LR
sq-prod(hora)	15	21455.6463	0.0000 LR

Tabela 16: Análise de Variância para *Bacillus stearothermophilus*

The GENMOD Procedure				
LR Statistics For Type 3 Analysis				
Source	DF	ChiSquare	Pr>Chi	
CONC	2	89284.6847	0.0000	
HORA	2	1970419.22	0.0000	
PROD	5	29427.7302	0.0000	
CONC*PROD	10	37673.1591	0.0000	
CONC*HORA	4	72500.6794	0.0000	
PROD*HORA	10	15544.2550	0.0000	
CONTRAST Statement Results				
Contrast	DF	ChiSquare	Pr>Chi	Type
conc(prod1)	2	50571.3840	0.0000	LR
conc(prod2)	2	38191.2054	0.0000	LR
conc(prod3)	2	22122.3012	0.0000	LR
conc(prod4)	2	32440.7022	0.0000	LR
conc(prod5)	2	17524.8695	0.0000	LR
conc(prod6)	2	2451.0159	0.0000	LR
q-conc(prod)	12	125665.877	0.0000	LR
prod(conc1)	5	16071.6541	0.0000	LR
prod(conc2)	5	38071.2574	0.0000	LR
prod(conc2)	5	19398.0285	0.0000	LR
sq-prod(conc)	15	69076.6091	0.0000	LR
hora(prod1)	2	284265.290	0.0000	LR
hora(prod2)	2	373513.220	0.0000	LR
hora(prod3)	2	298241.623	0.0000	LR
hora(prod4)	2	320336.736	0.0000	LR
hora(prod5)	2	388850.526	0.0000	LR
hora(prod6)	2	335858.488	0.0000	LR
sq-hora(prod)	12	1980937.15	0.0000	LR
prod(hora1)	5	10600.0986	0.0000	LR
prod(hora2)	5	14437.5132	0.0000	LR
prod(hora3)	5	13951.0995	0.0000	LR
sq-prod(hora)	15	38712.8250	0.0000	LR

Tabela 17: Análise de Variância para *Bacillus coagulans*

The GENMOD Procedure				
LR Statistics For Type 3 Analysis				
Source	DF	ChiSquare	Pr>Chi	
CONC	2	8353.7472	0.0000	
HORA	2	11089.4920	0.0000	
PROD	5	73034.4560	0.0000	
CONC*PROD	10	10908.3444	0.0000	
CONC*HORA	4	4984.9769	0.0000	
PROD*HORA	10	54805.9999	0.0000	

CONTRAST Statement Results				
Contrast	DF	ChiSquare	Pr>Chi	Type
conc(prod1)	2	612.8409	0.0000	LR
conc(prod2)	2	1805.7639	0.0000	LR
conc(prod3)	2	1290.3815	0.0000	LR
conc(prod4)	2	3286.0483	0.0000	LR
conc(prod5)	2	3646.0665	0.0000	LR
conc(prod6)	2	7675.8238	0.0000	LR
sq-conc(prod)	12	18288.8676	0.0000	LR
prod(conc1)	5	23147.3636	0.0000	LR
prod(conc2)	5	21093.9642	0.0000	LR
prod(conc2)	5	42530.6433	0.0000	LR
sq-prod(conc)	15	83111.8877	0.0000	LR
hora(prod1)	2	2867.7851	0.0000	LR
hora(prod2)	2	1468.9879	0.0000	LR
hora(prod3)	2	7776.1621	0.0000	LR
hora(prod4)	2	1349.7552	0.0000	LR
hora(prod5)	2	44780.7913	0.0000	LR
hora(prod6)	2	1507.4310	0.0000	LR
sq-hora(prod)	12	59712.8952	0.0000	LR
prod(hora1)	5	3848.8535	0.0000	LR
prod(hora2)	5	32093.2870	0.0000	LR
prod(hora3)	5	78466.2735	0.0000	LR
sq-prod(hora)	15	114029.317	0.0000	LR

Tabela 18: Análise de Variância para *Bacillus megaterium*

The GENMOD Procedure

LR Statistics For Type 3 Analysis

Source	DF	ChiSquare	Pr>Chi
CONC	2	6168.2606	0.0000
HORA	2	540.1671	0.0000
PROD	5	34244.1838	0.0000
CONC*PROD	10	2244.8105	0.0000
CONC*HORA	4	4428.8709	0.0000
PROD*HORA	10	12028.6956	0.0000

CONTRAST Statement Results

Contrast	DF	ChiSquare	Pr>Chi	Type
conc(prod1)	2	2914.2093	0.0000	LR
conc(prod2)	2	132.4540	0.0000	LR
conc(prod3)	2	3207.4822	0.0000	LR
conc(prod4)	2	879.0642	0.0000	LR
conc(prod5)	2	870.6886	0.0000	LR
conc(prod6)	2	1345.0147	0.0000	LR
sq-conc(prod)	12	9372.9937	0.0000	LR
prod(conc1)	5	10242.2207	0.0000	LR
prod(conc2)	5	18715.5816	0.0000	LR
prod(conc2)	5	10597.6051	0.0000	LR
sq-prod(conc)	15	37307.9987	0.0000	LR
hora(prod1)	2	1249.1559	0.0000	LR
hora(prod2)	2	500.0833	0.0000	LR
hora(prod3)	2	593.7997	0.0000	LR
hora(prod4)	2	2452.9755	0.0000	LR
hora(prod5)	2	7980.3584	0.0000	LR
hora(prod6)	2	31.4737	0.0000	LR
sq-hora(prod)	12	12796.7919	0.0000	LR
prod(hora1)	5	1388.8919	0.0000	LR
prod(hora2)	5	18713.3565	0.0000	LR
prod(hora3)	5	23119.1378	0.0000	LR
sq-prod(hora)	15	42671.6409	0.0000	LR

Tabela 19: Análise de Variância para *Bacillus brevis*

The GENMOD Procedure				
LR Statistics For Type 3 Analysis				
Source	DF	ChiSquare	Pr>Chi	
CONC	2	23558.7937	0.0000	
HORA	2	40039.3122	0.0000	
PROD	5	19866.9820	0.0000	
CONC*PROD	10	1332.3906	0.0000	
CONC*HORA	4	2122.9094	0.0000	
PROD*HORA	10	15549.3423	0.0000	
CONTRAST Statement Results				
Contrast	DF	ChiSquare	Pr>Chi	Type
conc(prod1)	2	4638.8329	0.0000	LR
conc(prod2)	2	2817.7811	0.0000	LR
conc(prod3)	2	5346.3668	0.0000	LR
conc(prod4)	2	5822.4607	0.0000	LR
conc(prod5)	2	5592.3658	0.0000	LR
conc(prod6)	2	5667.3908	0.0000	LR
sq-conc(prod)	12	25808.3245	0.0000	LR
prod(conc1)	5	9043.9270	0.0000	LR
prod(conc2)	5	8078.8961	0.0000	LR
prod(conc2)	5	7458.4520	0.0000	LR
sq-prod(conc)	15	21866.2048	0.0000	LR
hora(prod1)	2	7424.9196	0.0000	LR
hora(prod2)	2	10778.5515	0.0000	LR
hora(prod3)	2	4814.9222	0.0000	LR
hora(prod4)	2	72.6956	0.0000	LR
hora(prod5)	2	16916.9885	0.0000	LR
hora(prod6)	2	9361.1624	0.0000	LR
sq-hora(prod)	12	46236.0935	0.0000	LR
prod(hora1)	5	761.8377	0.0000	LR
prod(hora2)	5	7818.1425	0.0000	LR
prod(hora3)	5	20238.8946	0.0000	LR
sq-prod(hora)	15	27348.6469	0.0000	LR

Tabela 20: Análise de Variância para *Sporolactobacillus* sp.

The GENMOD Procedure				
LR Statistics For Type 3 Analysis				
Source	DF	ChiSquare	Pr>Chi	
CONC	2	5823.9699	0.0000	
HORA	2	412180.826	0.0000	
PROD	5	113212.949	0.0000	
CONC*PROD	10	13532.9848	0.0000	
CONC*HORA	4	21122.6629	0.0000	
PROD*HORA	10	76277.1771	0.0000	
CONTRAST Statement Results				
Contrast	DF	ChiSquare	Pr>Chi	Type
conc(prod1)	2	715.0113	0.0000	LR
conc(prod2)	2	727.1470	0.0000	LR
conc(prod3)	2	2229.5619	0.0000	LR
conc(prod4)	2	13.2428	0.0013	LR
conc(prod5)	2	5424.7591	0.0000	LR
conc(prod6)	2	8132.4449	0.0000	LR
sq-conc(prod)	12	16133.8577	0.0000	LR
prod(conc1)	5	32771.1761	0.0000	LR
prod(conc2)	5	71907.3741	0.0000	LR
prod(conc2)	5	70463.5687	0.0000	LR
sq-prod(conc)	15	123192.883	0.0000	LR
hora(prod1)	2	44982.5075	0.0000	LR
hora(prod2)	2	63248.8639	0.0000	LR
hora(prod3)	2	57266.9340	0.0000	LR
hora(prod4)	2	33189.8846	0.0000	LR
hora(prod5)	2	171082.077	0.0000	LR
hora(prod6)	2	75534.9366	0.0000	LR
sq-hora(prod)	12	443457.054	0.0000	LR
prod(hora1)	5	10378.4475	0.0000	LR
prod(hora2)	5	57313.1236	0.0000	LR
prod(hora3)	5	66774.6150	0.0000	LR
sq-prod(hora)	15	133770.107	0.0000	LR