

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

VALMIR EDUARDO ALCARDE<sup>1</sup>  
CLAUDIO ROSA GALLO<sup>2</sup>  
ANTÔNIO JOAQUIM DE OLIVEIRA<sup>3</sup>

ALCARDE, V.E.; GALLO, C.R.; OLIVEIRA, A.J. Avaliação de antimicrobianos na germinação de esporos e células vegetativas de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica. **Semina: Ci. Biológicas/Saúde**, v. 17, n. 2, p. 223-229, jun. 1996.

**RESUMO:** Uma das possíveis causas para o aumento do nível de contaminação no caldo de cana, desde a saída do decantador até as domas de fermentação, 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 e então os seguintes antimicrobianos 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). 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 que 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.

**PALAVRAS-CHAVE:** Antimicrobianos; Esporos; Bactérias; Fermentação Alcoólica

## 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.

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 doma ou na centrifuga 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, grande 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).

Durante estudos sobre o efeito da temperatura de ativação, pH e tempo de incubação na germinação de esporos 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

1 - Engenheiro Agrônomo com mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, formado pela ESALQ/USP. Integra o Setor de Microbiologia da Fermentec S/C Ltda - Assistência Técnica em Fermentação Alcoólica.

2 - Biólogo com doutorado em Ciências de Alimentos. Professor Doutor do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial(ESALQ/USP) e coordenador do Setor de Microbiologia do referido Departamento.

3 - Engenheiro Agrônomo (ESALQ/USP). Doctor of Philosophy (OHIO STATE UNIVERSITY/USA). Professor Doutor do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (ESALQ/USP).

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..

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.

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 (GAI, 1945; citado por GALLO & CANHOS, 1991; BARRETO, 1949; ALMEIDA & LIMA, 1953; AYRES, 1960), associação de penicilina e cloranfenicol (AQUARONE et al, 1968; citados por GALLO & CANHOS, 1991) e penicilina G potássica/ hexaclorofenol/ cloranfenicol associados (SATO et al, 1980; citados por GALLO & CANHOS, 1991).

Segundo EGUCHI (1989) vários desinfetantes químicos são utilizados pela indústria sucro-alcooleira como os compostos fenólicos, compostos clorados, quaternário de amônio, aldeídos além dos antibióticos (tetraciclina, cloranfenicol, penicilina e virginiamicina).

Desta forma, 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 a melhoria no rendimento industrial.

## 2. MATERIAL E MÉTODO

### 2.1. Meio para a germinação e multiplicação bacteriana

Como meio para a germinação de esporos

bacterianos foi utilizado mosto, a 10% de ART, 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.

### 2.2. Culturas

Suspensões de esporos bacterianos das seguintes espécies foram utilizadas nos experimentos: *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus* e *Sporolactobacillus* sp.. 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 Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP.

### 2.3. Antimicrobianos

Os antimicrobianos e as concentrações utilizadas foram: virginiamicina (1,0; 2,0 e 3,0 ppm), penicilina V potássica (1,0; 2,0 e 3,0 ppm), tetraciclina (25,0; 50,0 e 100,0 ppm), kamoran HJ (1,0; 2,0 e 3,0 ppm) e os quaternários de amônio Bactol Q e Adesol A-207 (20,0; 30,0 e 40,0 ppm). Tais concentrações englobam aquelas recomendadas pelos fabricantes, bem como uma concentração superior e uma inferior, tomando-se o cuidado para que a utilização dos referidos antimicrobianos em escala industrial fosse economicamente viável.

### 2.4. 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), tanto na forma sólida como líquida (GLT).

### 2.5. Esporulação e Coleta de Esporos

Após reativação das culturas em caldo GLT, os esporos foram obtidos através de 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°C ± 1°C por um período de 48 a 72 horas, até obter-se esporulação completa com liberação dos mesmos, a qual foi determinada através do método de coloração de BARTHOLOMEW & MITTWER (1950).

Após a completa esporulação das culturas, os

esporos foram ressuspensos em água destilada esterilizada e resfriada a  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ , sendo em seguida centrifugados a 3600 G ( $\text{m/s}^2$ ) por 10 minutos. Depois de eliminado o sobrenadante, a massa de esporos foi novamente ressuspensa e centrifugada, repetindo-se este processo por mais 4 vezes, com a finalidade de eliminar o máximo possível de “debris” celulares.

## 2.6. Ativação e Germinação dos Esporos

Para o tratamento de ativação, a suspensão de esporos considerada foi submetida ao aquecimento ( $80^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos), sendo a seguir resfriada. Após o tratamento de ativação 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 retirada uma amostra para diluições em série e plaqueamento a fim de se estimar a população de esporos ativados inicialmente presente neste frasco. A seguir 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 novos plaqueamentos realizados a cada 3 horas até se completar 6 horas de pré-incubação.

## 2.7. 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.

## 2.8. Delineamento Experimental e Análise Estatística dos Dados

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, num esquema fatorial  $6 \times 6 \times 3 \times 3$ , para a análise da capacidade de germinação dos esporos. Para a análise estatística foi utilizada a técnica de Modelos Lineares Generalizados, uma vez que os dados apresentavam distribuição de Poisson.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das contagens de UFC/ml das espécies de *Bacillus* e *Sporolactobacillus* estudadas, submetidos aos diferentes tratamentos com antimicrobianos em suas respectivas concentrações, encontram-se na Tabela 1.

De acordo com a análise estatística, 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.

### 3.1. 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 na Tabela 2. De uma forma geral, os resultados obtidos mostraram uma grande variação em relação a sensibilidade das bactérias frente aos produtos testados.

Para efeito de padronização dos resultados, considerar como ineficiente ou de baixa eficiência o produto que proporcionar redução na população bacteriana de até 50,0%; denominar 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%.

#### 3.1.1. Virginiamicina

Os resultados da presente pesquisa 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 controlou razoavelmente *B. stearothermophilus* (-73,70%). Quando o tempo de ação do produto aumentou para 6 horas houve razoável redução na população de *B. coagulans* (-65,70%), *B. megaterium* (-64,70%) e *B. stearothermophilus* (-76,30%). Já *B. subtilis* não apresentou sensibilidade a este produto.

STUPIELLO (1993), verificou que para a inibição de *B. brevis*, *B. megaterium*, *B. coagulans* e *B. subtilis*

Tabela 1: Contagens de UFC x 10<sup>6</sup>/ml frente aos diferentes antimicrobianos testados.

BACTÉRIA	TEMPO	ANTIMICROBIANOS																	
		VIRGINIAMICINA		Penicilina V Potássica		KAMORAN HJ		TETRACICLINA		BACTOL Q		ADESOL A-207							
		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	50,0 ppm	100,0 ppm	20,0 ppm	30,0 ppm	40,0 ppm				
<i>Bacillus subtilis</i>	0h	1,40	1,22	1,00	1,45	1,42	1,60	1,49	1,10	1,12	0,88	0,85	1,27	0,53	0,95	1,59	2,33	2,24	2,87
	3h	1,36	1,04	0,12	1,18	0,72	0,69	1,08	0,52	0,50	0,96	0,91	1,17	0,13	0,06	0,10	1,22	1,06	0,70
	6h	1,11	0,23	0,11	0,77	0,09	0,05	0,54	0,32	0,10	1,54	0,81	1,12	0,11	0,03	0,05	0,63	0,39	0,45
<i>B. stearo-thermophilus</i>	0h	79,00	83,00	64,00	80,50	87,00	74,50	65,50	71,50	72,00	75,50	59,00	70,50	67,00	77,00	72,00	71,00	83,50	87,00
	3h	28,20	32,30	14,60	31,20	19,00	14,80	28,70	16,90	15,30	26,00	22,50	13,00	20,60	14,60	10,50	21,20	23,70	22,40
	6h	24,70	25,40	7,95	27,60	10,00	8,03	26,00	11,90	8,70	21,30	7,80	9,00	18,40	11,40	7,70	18,00	18,80	16,50
<i>Bacillus coagulans</i>	0h	20,60	18,90	21,80	21,50	19,20	22,10	23,30	27,00	24,90	23,60	18,90	23,40	20,90	24,70	21,10	21,90	20,40	19,80
	3h	23,70	21,80	25,20	25,10	21,10	21,30	20,80	22,70	20,40	25,50	20,90	24,90	16,80	11,00	9,20	24,70	18,50	16,80
	6h	27,30	21,70	24,00	27,80	25,60	19,90	17,90	19,40	15,50	28,50	22,20	26,00	9,70	7,95	6,50	24,20	15,30	14,40
<i>Bacillus megaterium</i>	0h	2,53	3,63	2,42	2,36	2,99	2,68	2,29	4,65	2,63	2,22	2,95	2,43	2,16	2,27	2,12	2,14	2,57	2,05
	3h	4,24	4,35	2,64	3,55	3,29	2,94	4,72	3,83	2,49	4,81	4,12	3,24	1,01	0,78	0,59	2,97	2,38	1,76
	6h	5,01	4,82	2,44	3,69	3,28	2,89	3,56	3,55	1,68	4,96	3,94	2,92	0,98	0,33	0,31	3,13	2,21	1,42
<i>Bacillus brevis</i>	0h	3,85	3,77	1,93	3,68	3,42	2,14	3,61	3,61	2,11	3,49	2,87	1,80	3,61	3,15	1,63	2,78	3,14	1,30
	3h	2,86	2,48	0,74	2,39	1,75	0,94	3,55	2,33	1,08	3,73	3,00	1,64	1,67	1,04	0,23	2,06	1,37	0,42
	6h	1,77	1,27	0,59	0,83	0,49	0,26	2,01	1,38	0,63	3,92	2,91	1,16	0,49	0,28	0,007	0,84	0,62	0,11
<i>Sporolactobacillus sp.</i>	0h	15,90	21,70	20,20	19,60	24,50	23,80	14,30	17,30	18,60	12,80	19,60	22,20	15,90	18,70	22,90	15,90	15,30	13,30
	3h	9,80	12,70	12,70	11,90	8,15	15,10	10,70	8,93	8,85	17,10	13,70	14,10	7,75	9,35	1,58	10,50	6,23	6,60
	6h	5,55	5,75	5,50	6,73	4,68	6,08	6,40	3,58	0,69	7,48	7,35	5,60	0,82	0,01	0,014	3,25	0,88	1,05

Tabela 2: Ação dos diferentes antimicrobianos testados sobre as bactérias esporuladas utilizadas (porcentuais de redução/aumento).

BACTÉRIA	TEMPO	ANTIMICROBIANOS																	
		VIRGINIAMICINA		Penicilina V Potássica		KAMORAN HJ		TETRACICLINA		BACTOL Q		ADESOL A-207							
		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	50,0 ppm	100,0 ppm	20,0 ppm	30,0 ppm	40,0 ppm				
<i>Bacillus subtilis</i>	3h	-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
	6h	-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
	3h	-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
<i>B. stearo-thermophilus</i>	0h	-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
	3h	+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
	6h	+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>	0h	-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
	3h	+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
	6h	-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
<i>Bacillus brevis</i>	0h	-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
	3h	-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
	6h	-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

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*.

### 3.1.2. Penicilina V Potássica

Os resultados aqui encontrados 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.

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.

### 3.1.3. Kamoran HJ

De acordo com ANTIBIÓTICO HJ - Elanco (1994), o produto kamoran HJ na concentração de 1,0 ppm, com 6 horas de atuação provocou boa redução apenas na população de *B. brevis* (-99,60%). 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 extremamente 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.

### 3.1.4. Tetraciclina

De uma maneira geral, a baixa eficiência deste produto sobre as espécies bacterianas testadas está de acordo com PRINCIPAIS bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, suas características e sensibilidade a antibióticos (1991), onde 10,0 ppm de tetraciclina durante 3 e 6 horas de contato praticamente não controlou *B. brevis*, *B. coagulans*, *B. megaterium*, *B. subtilis* e *B. stearothermophilus*.

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.

### 3.1.5. Bactol Q

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 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 a 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.

### 3.1.6. Adesol A-207

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 a 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 do presente trabalho, embora as técnicas utilizadas tenham sido diferentes.

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

## 4. CONCLUSÃO

- 4.1. As porcentagens de redução na população bacteriana foram maiores para as concentrações mais elevadas de cada antimicrobiano, com raras exceções.
- 4.2. Todos os antimicrobianos testados foram mais eficientes quando permaneceram em contato com as bactérias durante um período de tempo de seis horas.
- 4.3. 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.

4.4. 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 ppm e 3,0 ppm, a maior porcentagem de redução foi obtida para *B. subtilis* (93,50% e 96,93%, respectivamente).

4.5. A bactéria *B. subtilis* foi a mais sensível ao antimicrobiano Kamoram 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%).

4.6. 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.

4.7. A bactéria *Sporolactobacillus* sp. foi a mais sensível ao produto Bactol Q em todas as dosagens testadas. Desta forma, 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%.

4.8. 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 ppm, 30,0 ppm e 40,0 ppm deste antimicrobiano foram 79,56%, 94,26% e 92,11%, respectivamente.

4.9. Para todos os antimicrobianos testados e em todas as dosagens utilizadas, *B. coagulans* e *B. megaterium* foram as bactérias menos sensíveis.

4.10. 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.

ALCARDE, V.E.; GALLO, C.R.; OLIVEIRA, A.J. Evaluation of antimicrobials on spores germination and outgrowth of bacteria isolated from alcohol fermentation process. **Semina: Ci. Biológicas/Saúde**, v. 17, n. 2, p. 223-229, Jun. 1996.

**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. 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 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, Tetraciclina 25,0; 50,0 and 100,0 ppm and Quaternary Ammonium (Bactol Q, Adesol A-207) 20,0; 30,0 and 40,0 ppm. 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.

**KEY-WORDS:** Antimicrobials; Spores; Bacteria; Alcohol Fermentation

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.R.; LIMA, U.A. O emprego de Emulsan AL na fermentação alcoólica. *Boletim do Instituto Zimotécnico* (6): 1-24, 1953.

ALTHERTHUM, 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; ZAGO, E.A.; BASSO, L.C.; GALLO, C.R. *Processos de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento*. Piracicaba, Centro de Biotecnologia Agrícola, 1989. 145p.

ANTIBIÓTICO HJ - Elanco: Resumo dos testes com bactericida "in vitro" executado pela Fermentec. 1994. s.n.t.

AYRES, G.C.M. Fatores físicos e químicos que influem sobre a fermentação alcoólica. In: Curso sobre fermentação alcoólica J.R. ALMEIDA, Piracicaba, vol.I: 103-18, 1960.

- BARRETO, A. Policlorofenóis em fermentação de carboidratos. *C. abst.* 43(17), 6728. Cia Química Monsanto, 1949.
- BARTHOLOMEW, J.W.; MITTWER, T. A simplified bacterial spore stain. *Stain Technology*, Geneva, 25: 153-6, 1950.
- 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)
- 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 Queiroz" /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.
- FOSTER, D.H. Sugar processing difficulties. *Sugar Journal*, New Orleans, 60: 529-31, 1969.
- 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.
- 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.
- OLIVA-NETO, P. Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica por batelada-alimentada. Campinas, 1990. 199p. (Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP).
- PRINCIPAIS bactérias contaminantes da fermentação alcoólica, suas características e sensibilidade a antibióticos. Piracicaba, Fermentec s/c Ltda, 1991. 41p.
- 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 Queiroz"/USP)
- RODINI, M.A.T. Bactérias contaminantes do processo de fermentação de etanol e sua sensibilidade frente à penicilina e pentaclorofenol. *STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos*, 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)
- 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.