

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS  
CONTAMINANTES DE DORNAS DE FERMENTAÇÃO  
NAS DESTILARIAS DE ETANOL

MARIA AMÉLIA TOFFOLO RODINI

Orientador: ANTONIO JOAQUIM DE OLVEIRA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Setembro - 1985

A SOPHIA, *minha filha,*

DEDICO.

### AGRADECIMENTOS

Expressamos o nosso agradecimento a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

- Ao Prof. Dr. Antonio Joaquim de Oliveira pela orientação, confiança, exemplo e mútua amizade construída na realização deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Vanderley Canhos (FEA-UNICAMP) pelo exemplo de pesquisador, orientação e sugestões.
- Ao Prof. Cláudio Rosa Gallo, pelos constantes incentivos, paciência e sugestões.
- Ao Prof. Dr. Flávio C.A. Tavares pela oportunidade oferecida quando da aceitação no curso, ensinamentos, exemplo de trabalho e persistência.
- Aos Deptos. de Tecnologia Rural e Genética através do seu corpo docente, pela oportunidade e pelos conhecimentos transmitidos.
- Ao Depto. de Ciências de Alimentos (Laboratório de Microbiologia) - FEA-UNICAMP - pela oportunidade oferecida para a realização de parte desse trabalho.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio concedido a partir de 1981 na forma de bolsas de estudos.
- À Diretoria da Química Nacional Quiminas, pela oportunidade concedida na forma de verbas, materiais, auxílio financeiro e confiança.

- As Amigas Cleomar M. de Carvalho (ESALQ) e Eliane M. Ferrarezzi, pelos serviços técnicos prestados, e Silvia Helena do Amaral e Marli T.A. Minhoni pelo apoio e demonstração de companheirismo.
- Ao Revdo. Wilson Lizardo, amiga Marta Taniwaki e família Eduardo Steagall pelo exemplo de solidariedade.
- A Dra. Maria Lucia Steagall (Meire) pelo exemplo de dedicação, esforço, persistência e apoio.
- Ao Newton, companheiro amigo, pelo constante incentivo e apoio.
- Aos meus pais: Olavo e Aparecida e a minha irmã Angélica, pelo apoio, carinho, compreensão, constante incentivo e orações, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.
- À Deus que na sua infinita misericórdia e grande amor nos deu essa oportunidade. À ELE, mediante Jesus Cristo, seja o poder, a glória e honra para todo o sempre.



ÍNDICE

	Página
AGRADECIMENTOS .....	iii
RESUMO .....	x
SUMMARY .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	20
3.1. Material .....	20
3.1.1. Preparo do material .....	22
3.2. Métodos .....	25
4. RESULTADOS .....	46
5. DISCUSSÃO .....	67
6. CONCLUSÕES .....	77
7. LITERATURA CITADA .....	79

LISTA DE TABELAS

TABELA Nº		Página
01	Procedência e tipo das amostras .....	23
02	Materiais utilizados na realização dos testes microscópicos e bioquímicos ....	24
03	Numeração das culturas .....	29
04	Características microscópicas dos <u>isola</u> dos .....	50
05	Agrupamento das bactérias isoladas de acordo com a procedência .....	54
06	Distribuição dos gêneros de acordo com o tratamento do caldo e constituição do mosto .....	57
07	Distribuição das bactérias isoladas de acordo com o tipo de destilaria (Anexa ou Autônoma) e tipo de tratamento do caldo e constituição do mosto .....	59
08	Características microscópicas e bioquímicas dos isolados, identificados como <i>Bacillus subtilis</i> .....	61
09	Características microscópicas e bioquímicas dos isolados identificados como <i>Ba</i> <u>cillus megaterium</u> .....	63

TABELA Nº		Página
10	Características microscópicas e bioquímicas dos isolados identificados como <i>B. brevis</i> .....	64
11	Características microscópicas e bioquímicas do isolado identificado como <i>Leucostoc mesenteroides</i> .....	64
12	Características microscópicas e bioquímicas dos isolados identificados como <i>Lactobacillus</i> .....	65
13	Características microscópicas e bioquímicas dos isolados identificados como membros da Família <i>Micrococcaceae</i> ....	65
14	Características microscópicas e bioquímicas dos isolados identificados como <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .....	66

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
01	Esquema para isolamento e estocagem das culturas .....	26
02	Esquema para reativação dos isolados e testes bioquímicos .....	27
03	Esquema para identificação dos isolados	33
04	Chave para identificação de bastonetes e cocos esporulados .....	34
05	Chave para o gênero <i>Bacillus</i> .....	35
06	Chave para o grupo I de <i>Bacillus</i> .....	36
07	Chave para bastonetes Grupo II de <i>Bacillus</i> ...	37
08	Chave para o grupo III de <i>Bacillus</i> ....	38
09	Chave para o gênero <i>Bacillus</i> .....	39
10	Chave para <i>Lactobacillus</i> .....	40
11	Chave de classificação para cocos G <sup>+</sup> ..	41
12	Chave para classificação da Família I dos cocos G <sup>+</sup> .....	42
13	Chave para cocos - Família II - <i>Streptococcaceae</i> .....	43

FIGURA Nº		Página
14	Chave para cocos e cocobacilos Gram Negativos .....	44
15	Chave para diferenciação dos gêneros <i>Acinetobacter</i> e <i>Moraxella</i> .....	45
16	Caracterização das culturas isoladas ..	47
17	Identificação das culturas isoladas ...	48
18	Porcentagem de bactérias em relação à população total .....	49

## ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DE DORNAS DE FERMENTAÇÃO NAS DESTILARIAS ALCOÓLICAS

Candidata: MARIA AMÉLIA T. RODINI

Orientador: ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

### RESUMO

Amostras de mosto fermentado, apresentando uma população bacteriana ao nível de  $10^7$  bactérias viáveis/ml foram coletadas no final da fermentação em 17 destilarias, cujo mosto era constituído de melaço, caldo de cana ou mistura de ambos, durante a safra 1983/84.

Na maioria das destilarias o caldo de cana é aquecido e clarificado, enquanto algumas não o fazem.

De todas as amostras coletadas, 66 colônias foram isoladas, caracterizadas e identificadas de acordo com a metodologia descrita por Canhos (1980).

Dentre os isolados 65,1% apresentaram morfologia de bastonete e Gram (+); 28,8% de cocobacilos e Gram (-) e 6% de cocos Gram (+).

Dos bastonetes Gram (+), 62,1% apresentaram catalase (+) e produziram esporos, sendo identificados como pertencentes à Família *Bacillaceae*, gênero *Bacillus*.

Os bastonetes Gram (+) não formadores de esporos foram identificados como pertencentes à Família *Lactobacillaceae*, gênero *Lactobacillus*.

As bactérias com morfologia de cocos foram identificadas como sendo da Família *Streptococcaceae*: gênero *Leuconostoc*, e *Micrococcaceae*: gênero *Micrococcus* e *Planococcus*.

Dentre os bastonetes Gram (+) e esporulados classificados como *Bacillus*, 68,3% foram identificados como *B. subtilis*; 14,6% como *B. brevis* e 9,8% como *B. megaterium*.

Os cocos, que representam 6% da população de Gram (+), foram classificados como *Micrococcus lylae*, *Planococcus* sp. e *Leuconostoc mesenteroides*.

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIAL  
CONTAMINANTS FROM FERMENTATION TANKS IN THE ALCOHOL  
DESTILLERIES

Candidate: MARIA AMÉLIA T. RODINI

Adviser: ANTONIO JOAQUIM DE OLIVEIRA

SUMMARY

Samples of fermented must, had a bacterial population around  $10^7$  bacteria/ml were collected at the end of the fermenting cycle from 17 destilleries which work with must composed of molasses, sugar cane juice or mixture of both, during the 1983/84 harvesting.

In most the sugar cane juice is heated and clarified and in some of them this is not done.

From all collected samples 66 colonies were isolated, characterized and identified according to the Canhos 1980 procedure. Among the isolates 65.1% were rod shape and Gram (+), 28.8% were plump rod shape 6% were cocci, and Gram (+).

62.1% of the Gram (+) rods, were catalase (+) and spore formers being then identified as *Bacillaceae*, genus *Bacillus*.

The Gram (+) rods, non spore formers were identified as *Lactobacillaceae*, genus *Lactobacillus*. It



were identified as *Neisseriaceae*, genus *Acinetobacter*, specie *A. calcoaceticus*, the plump rods, Gram (-), catalase (+), and oxidase (-).

The cocci shape bacteria were identified as *Streptococcaceae*: genus *Leuconostoc*; *Micrococcaceae*: genus *Micrococcus* and *Planococcus*.

Among the Gram (+) rod and sporulated, classified as *Bacillus*, 68.3% were identified as *B. subtilis*, 14.6% as *B. brevis* and 9.8% as *B. megaterium*.

The cocci shape wich represent 6% of the whole population of Gram (+) bacteria were classified as *Micrococcus lylae*, *Planococcus* sp. and *Leuconostoc mesenteroides*.

## 1. INTRODUÇÃO

Pela sua constituição rica em matéria orgânica e inorgânica, o caldo de cana é um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de grande número de microrganismos.

A contaminação bacteriana é um fato na maioria das destilarias produtoras de álcool e que pode ser agravado dependendo da maneira de se conduzir o processo operacional.

O prejuízo maior relacionado à atividade bacteriana e a degradação da sacarose com a produção do ácido láctico e outros ácidos, consumo do álcool produzido pelas leveduras por bactérias acéticas, produção de metabólitos tóxicos que levam as leveduras à morte, floculação e perda do fermento devido à produção de gomas e injúrias causadas às células das leveduras pela excessiva quantidade de ácido utilizada para combater a infecção.

Apesar da importância que a infecção bacteriana representa à indústria alcooleira, esse assunto não mere-

ceu atenção por parte dos técnicos, pesquisadores e empresas do setor e por essa razão poucos são os trabalhos realizados nessa área no Brasil.

Com a importância econômica que o etanol passou a apresentar a partir de 1973/75, uma série de problemas tecnológicos passaram a exigir rápida e efetiva solução. Assim, a presença da floculação do fermento, um fato que tem se repetido em muitas destilarias do Brasil, levou SERRA e colaboradores (1979) a estudar a origem e o tipo de microrganismos contaminantes. Esses autores fizeram a amostragem em diversos pontos dentro da usina, isolaram e identificaram *Sporolactobacillus* sp como sendo o agente causal da floculação.

AMORIM et alii (1981) mostraram o efeito das bactérias contaminantes na produção de álcool, reduzindo em até 55% do rendimento teórico. Os mesmos autores em 1982 descreveram os problemas causados pelas bactérias contaminantes na fermentação alcoólica, correlacionando o rendimento alcoólico, a acidez, o vinho, o número de bactérias presentes no mosto e a temperatura nas dornas de fermentação.

ALTERTUM et alii (1984) mostraram em caráter experimental que as perdas são da ordem de 20 a 90% do rendimento teórico quando a população de bactérias, bastonetes Gram positivos, é superior a  $10^8$  células/ml.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

É fato conhecido que a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) leva consigo para dentro da indústria enorme quantidade de microrganismos que fazem parte da flora epífita como *Leuconostoc*, *B. subtilis*, *Aerobacter* sp, *Enterobacter* (MAYEUX e COLMER, 1960; DUNCAN e COLMER, 1964; TILBURY, 1967, 1970; LUNA, 1971), ou estão presentes na terra aderida aos colmos, folhas e raízes (MAYEUX, 1960; DUNCAN e COLMER, 1964).

A presença de uma flora epífita associada a essa gramínea já foi averiguada por WOLZOGEN KUHR (1923); GEERLIGS (1924); MAYEX (1960).

Muitos autores afirmam que as bactérias coliformes, principalmente do tipo *Aerobacter* constituem parte da microflora das plantas verdes (ALLEM e HARRISON 1936; THOMAS e McQUILLIM, 1952; FRASER REID e MALCON, 1956). Em estudos do tipo de distribuição de bactérias coliformes nas vegetações, GELDREICH, et alii (1963)

isolaram 13 tipos de IMViC de 30 espécies de plantas. DUNCAN e COLMER (1964) isolaram da cana-de-açúcar 198 isolados que foram classificados como 9 tipos IMViC e identificados como *Aerobacter cloacae*, *A. aerogenes* e *Escherichia co*li. As bactérias pertencentes ao gênero *Aerobacter* apresentaram grande importância por produzir goma, como anteriormente referido por BERKWIT (1931).

HUTCHISON e RAMAYYAR (1925) isolaram da cana-de-açúcar espécies de *Aspergillus* e leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae* atribuindo a sua origem ao solo aderido a cana ou as fendas causadas pela broca (*Dia*traea saccharalis).

Assim, o caldo extraído apresentará um certo número de microrganismos e dada as condições naturais oferecidas pelo caldo que é um meio rico, estes microrganismos tem a possibilidade de se desenvolver.

Como se pode esperar, essa carga microbiana presente na cana-de-açúcar, mais as bactérias originárias do solo aderido aos colmos, folhas e raízes vão para as moendas e constituem a flora bacteriana dos caldos.

Muitos autores reportaram os números de microrganismos presentes nos caldos, dando particular atenção à *Leuconostoc* (OWEN, 1911; KOPELLOFF e KOPELLOFF, 1919; HUCKER e PEDERSON, 1930; PEDERSON, 1938; MILLSTEN et alii, 1941; PEDERSON e HUCKER, 1946; SMITH, 1956; MAYEUX, 1960a,b; DUNCAN e COLMER

1964; BEVAN e BOND, 1971; TILBURY, 1975).

MacCALIP e HALL (1938) isolaram microrganismos que estavam causando problemas no processamento em caldo de cana danificada pela geada e constataram ser *Leuconostoc mesenteroides*.

ALFORD e MacCLESKEY (1942) isolaram em caldo de cana grande número de *Leuconostoc mesenteroides* e *L. dextranicum*. FAVILLE (1947) isolou 4 tipos de colônias das 740 linhagens formadoras de goma isoladas do caldo de cana como sendo *L. mesenteroides*. DUNCAN e COLMER (1964) encontraram *A. aerogenes* e *A. cloacae* e verificaram grande capacidade de produzir gomas. EGAN e REHBIN (1963), EGAN (1964, 1965a) verificaram *Leuconostoc mesenteroides* em culturas puras deteriorando a cana colhida, embora verificassem a presença de outra bactéria e fungos, os quais isolaram.

PEDERSON e HUCKER (1946) isolaram várias espécies de *Bacillus* do caldo de cana fresco, juntamente com bactérias pertencentes aos gêneros *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *E. coli*, com a predominância de *L. mesenteroides* nos caldos armazenados.

TILBURY (1967) isolou *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *Lactobacillus casei*, coliformes, espécies de *Bacillus*; bactéria G<sup>-</sup> e catalase + (não identificada) e leveduras produtoras de invertase como *Torulopsis* e *Candida* do caldo de cana. Também EL-TABEY SHEHATA (1960) iso-

lou além dessas leveduras *Saccharomyces* e *Pichia* nos caldos de cana, no Brasil. TILBURY (1968) isolou da cana colhida bactérias do ácido lático como *L. mesenteroides*, *L. casei*, *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus* var. *alactosus*, *Lactobacillus* sp. (heterofermentativos), bactérias G<sup>-</sup>, ácido tolerantes e *B. subtilis*.

A presença dos microrganismos se desenvolvendo durante a extração e o processamento não é surpresa, e o seu número vai depender da maneira de condução do processo. Alguns trabalhos no campo da microbiologia tem sido realizado para estimar as perdas no caldo bruto e clarificado causadas pela presença de microrganismos contaminantes, porém tem sido um tanto quanto difícil se estimar a perda real (MOROZ, 1953; KENERY et alii, 1967 e CLARK et alii, 1980).

Sabe-se que vários fatores atuam para a qualidade da matéria prima: tipo de colheita (mecânica ou manual), cana queimada, cana cortada em pedaços ou não, as condições de temperatura e umidade, o tipo de solo e adubação, as pragas locais, a variedade de cana, e outros fatores que são variáveis em cada cultivo (SILVA, 1974; AXALLA et alii, 1977; EGAN, 1964, 1965a,b, 1966, 1968a,b; GUPTA et alii, 1968).

As condições peculiares de cada etapa do processo selecionará o desenvolvimento particular de certos microrganismos, sendo assim, o pH relativamente baixo

dos caldos das moendas favorece o crescimento dos microrganismos acidófilos como *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (BEVAN e BOND, 1971; SHARPE et alii, 1972; TILBURY, 1975). Por outro lado, a alta temperatura associada aos valores de pH limitam o desenvolvimento microbiano, favorecendoos termofílicos, tais como as espécies pertencentes aos gêneros *Bacillus subtilis*, como: *B. stearotermophilus* (MacMASTER, 1975; e MacMASTER e RAVNO, 1975) e *Clostridium* (CLARK et alii, 1980):

O prejuízo maior causado por esses microrganismos é a degradação da sacarose pela célula microbiana. Da degradação da sacarose pelos microrganismos resulta a formação de ácido lático e acético como os principais ácidos orgânicos formados (FORT e LAURITZEN, 1938; PERQUIM, 1940; STARKE; GOODBAN e OWENS, 1952; CARRUTHERS e OLDIFIELD, 1965; BEVAN e BOND, 1971; BUCHANAN e GIBBONS, 1974).

Outros microrganismos estão presentes no caldo de cana durante a extração, porém não produzem ácido lático como subproduto metabólico e tem sido mencionados como sendo várias leveduras (BEVAN e BOND, 1971; TILBURY, 1975); *Aerobacter* (MAYEUX, 1960; DUNCAN e COLMER, 1974); *Actinomyces termofílicos* (BEVAN e BOND, 1971) e fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* (TILBURY, 1967).

Desta forma, o papel desses microrganismos



nao pode ser ignorado devido as perdas do açúcar disponí-  
vel, bem como pelos problemas que seus metabólitos cau-  
sam à fábrica. Já se verificou que os caldos deterio-  
rados demandam maior quantidade de cal para sua alcalini-  
zação; a sua sedimentação é mais lenta e a qualidade do  
caldo é mais pobre.

Os produtos metabólicos dos microrganismos  
estão intimamente relacionados ao aparecimento da cor  
do caldo (GROSS, 1966). Os fenois e polifenois presen-  
tes nos caldos são catalizados enzimaticamente a quinonas,  
compostos que dão coloração escura. Também o ferro dará  
complexos mais escuros ainda se tiver acesso aos caldos  
pela ação de bactérias fêrricas (CLARK et alii, 1980).

A formação de goma causa problemas na ope-  
ração da fábrica por aumentar a viscosidade, dificultan-  
do a clarificação, evaporação, cocção, cristalização, bem  
como provocar entupimentos nas tubulações, centrífugas, pe-  
neiras, etc. (EGAN, 1965a,66; FOSTER, 1969; TILBURY, 1968;  
TILBURY, 1975).

A perda da sacarose pela formação de goma  
também proporciona problemas na leitura polarimétrica, afetan-  
do assim a estabilidade da fábrica.

A rotação específica da dextrana de  
 $[\alpha]^{20}_D = +195^{\circ}$  a  $+200^{\circ}$ , se comparada à da sacarose  
 $[\alpha]^{20}_D = +66^{\circ}$  a  $53^{\circ}$ , resultará em uma leitura errônea, apre-  
sentando uma polarização maior para o caldo contendo dextrana.

Além dos microrganismos do gênero *Leuconostoc* sp, produtor de dextrana, não se pode esquecer dos bastonetes pertencentes ao gêneros *Bacillus*, principalmente *B. subtilis* que podem formar levana, cuja rotação específica é negativa com valor de  $[\alpha]^{20}_D = -40$ , com efeito levogeno igual ao dextrogeno apresentado pela dextrana, quando presente em quantidades cinco vezes maiores que a dextrana.

Alguns autores tem se preocupado com a deterioração da cana após a colheita, verificando os produtos formados, bem como as populações presentes e o tempo necessário para que isto ocorra.

BRUIJN (1966a) verificando os produtos que tornam a cana menos apropriada para o processamento devido ao ataque dos microrganismos observou um aumento na acidez, diminuição da pureza e aumento da porcentagem de sólidos no caldo com o aumento do período de estocagem. O mesmo autor (1966b) isolou e comparou o polissacarídeo formado na cana deteriorada ao produto formado pela ação dos microrganismos pertencentes ao gênero *Leuconostoc*, como sendo um polímero de glucose, cadeia simples, contendo 25% de ligações glicosídicas do tipo 1-6 e 75% do tipo 1-4, concluindo ser um polímero idêntico à dextrana.

TILBURY (1968) estudou a biodeterioração da cana colhida e verificou o aumento da população microbiana, particularmente das bactérias lácticas, leveduras e bacté-

rias acidófilas (catalase positiva), em relação ao tempo de armazenagem.

Os microrganismos foram selecionados de acordo com sua capacidade de deterioração, sendo as bactérias lácticas, os principais, embora algumas leveduras também tenham produzido inversão. A identificação de 80 bactérias lácticas revelou que as espécies predominantes foram *Leuconostoc mesenteroides*, porém espécies hemofermentativas como *Lactobacillus plantarum* e *L. casei*, também foram numerosas após um período de armazenagem de dez dias.

Esse autor verificou que o grau de deterioração está intimamente relacionado ao tempo de armazenagem. Alguns autores recomendam que a cana deve ser moída de 24 a 48 horas após o corte, porém se verificou que a perda de sacarose para a cana picada ocorre em 17 horas, enquanto para a não picada ocorre em 30 horas (VICKERS, 1968; KIRBY, 1968; IMRIE e TILBURY, 1972). Esses autores também verificaram a atuação de fatores mecânicos e ambientais, sendo que a deterioração é maior no verão, mediando um período de 14 horas contra um período de 18 horas para o inverno.

BEVAN e BOND (1971) com o intuito de estudar as bactérias presentes desde a cana verde até a fábrica, isolaram 50 tipos de microrganismos a partir da cana verde, pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia*; bacilos do solo, principalmente *B. cereus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* produtoras de ácidos e fungos do ti

po *Actinomyces*, sendo que todos metabolizam açúcar rapidamente e em grande proporção são resistentes a temperaturas de 50-55°C. Das rachaduras provocadas pelo crescimento do colmo, foram isolados cocos, principalmente pertencentes ao gênero *Leuconostoc*, espécies de *Saccharomyces*, grande variedade de fungos e alguns bastonetes produtores de ácidos. Todos os microrganismos se mostraram muito ativos, sendo que essas fendas se mostraram excelentes sítios para o desenvolvimento microbiano.

Da cana queimada, foram isolados 17 tipos de microrganismos os quais foram identificados como sendo provavelmente *Xanthomonas*, *Bacterium*, *Corinebacterium* e *Bacillus*. Dos bastonetes isolados, 5 foram extremamente resistentes ao calor, a maioria utilizou 18 tipos de açúcar testado, 2 produziram dextrana, 2 produziram esporos e foram muito resistentes ao calor. Após 24 horas da queimada foram isolados fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Rhizopus* e *Aspergillus*; leveduras pertencentes aos gêneros *Torula*, *Rhodotorula* e *Candida*, e bactérias, sendo o *Leuconostoc* sp. o microrganismo mais comum.

A cera que envolve o colmo parece ter uma atividade bacteriostática e com a sua retirada pelo calor, através da queima, os microrganismos podem crescer mais livremente, utilizando como meio o caldo exsudado. Como verificado por MAYEUX (1960). o exsudado dos colmos quentes e úmidos pode conter cerca de  $10^9$  bactérias, fungos e leveduras por grama.

Mesmo nas queimadas mais severas a maioria dos microrganismos presentes nas rachaduras de crescimento não são afetados, como o *Leuconostoc* e as leveduras termo-resistentes.

Os pedaços de cana apresentam no seu interior microrganismos como leveduras, *Leuconostoc* e bastonetes produtores de ácidos. São considerados como principais sítios do desenvolvimento microbiano os globulos de caldo exsudado, as fendas de crescimento, as perfurações causadas por insetos, as áreas abaixo da bainha, que são contaminadas pelas lâminas do cortador e que depois se espalha pelo colmo. Massiva infecção foi detectada aproximadamente a 15 cm da extremidade cortada após 1 a 1 1/2hs de estocagem, apresentando microrganismos como leveduras, *Leuconostoc*, *Xanthomonas* e *Aerobacter*; sendo os três últimos produtores de gomas.

Assim, pode-se verificar que a produção de ácidos e materiais semelhantes à dextrana, com consequente perda da pureza e diminuição da quantidade de açúcar disponível, tem início logo após o corte, sendo acelerada pela taxa de desenvolvimento dos microrganismos. Portanto, quanto maior o tempo de estocagem, maior será o número de microrganismos e menor quantidade de açúcar estará disponível.

As amostras retiradas das moendas apresentaram-se altamente contaminadas com os microrganismos en-

contrados na cana em pedaços como as leveduras, *Brevidabacterium* (*B. imperiale*, principalmente) e *Thermoactinomyces talpophylus* (BEVAN e BOND, 1971). Outros autores citam ainda como principais microrganismos presentes no caldo bruto *Actinomyces*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Streptomyces* (PEDERSON, 1938; PEDERSON e HUCKER, 1946; MAYEUX, 1960; MacMASTER e RAŮNO, 1977).

As moendas do tandem, apesar de apresentar diferentes temperaturas mostrou um bom desenvolvimento dos microrganismos em geral, bem como as áreas ao redor do "cush-cush".

As leveduras não estão presentes até o final do tandem, enquanto os microrganismos produtores de ácidos orgânicos, especialmente os esporulados, são encontrados, até o final, consumindo nesse estágio açúcar, principalmente quando em populações elevadas (BEVAN e BOND, 1971; MacMASTER e RAŮNO, 1977).

O caldo misto, que é mistura dos caldos das diversas moendas, é um meio favorável para desenvolvimento de muitas espécies de microrganismos por apresentar um Brix variando entre 10 e 18, pH 5,0-5,6, temperatura de 25-30°C, abundância de aminoácidos, sais orgânicos e inorgânicos e outros nutrientes. As contagens de bactérias são da ordem de  $10^5$  a  $10^7$ /ml quando a cana é sadia, po-

dendo atingir valores de  $10^8$  quando a cana não é sadia ou ficou armazenada aguardando a moagem.

Esses autores, isolaram *Leuconostoc*, *B. lipolyticum*, *B. imperiale*, leveduras termofílicas e *Thermoactenomyces talpophylus*, enquanto outros autores isolaram *Leuconostoc mesenteroides* (PEDERSON e HUCKER, 1946; MacCLESKY et alii, 1947); *Leuconostoc citrovirum*, *L. dextranicum*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus coagulans*, *B. circulans*, *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas* (LIMA et alii, 1974).

A clarificação do caldo misto, auxilia grandemente na eliminação das células vegetativas, porém as formas esporuladas poderão ainda permanecer (SKOLE et alii, 1977). Assim, após o clarificador, que apresenta temperaturas próximas a  $100^{\circ}\text{C}$  foram isolados bastonetes esporulados identificados como *B. megaterium* (BEVAN e BOND, 1971).

No xarope, no estágio de evaporador os gêneros isolados foram *Bacillus* e *Clostridium*, que são organismos termo-resistentes (BEVAN e BOND, 1971).

Para CLARK et alii (1980) os microrganismos importantes na contaminação do caldo de cana desde o campo até a refinaria são as bactérias produtoras de ácido butírico, *Clostridium termosaccharolyticum* além do *Leuconostoc mesenteroides* e *L. dextranicum*, e leveduras do tipo *Saccharomyces*.

A contaminação bacteriana nos processos fermentativos causa grandes prejuízos e por essa razão não é preocupação recente, o que aliás é bem demonstrado nos trabalhos de Pausteur, no fim do século passado.

As primeiras informações a respeito de contaminantes da fermentação alcoólica foram dadas por GUICHARD (1896), sendo que DESONGHE (1889), MONVOISON (1910), e MELONI (1953) fizeram uma descrição dos microrganismos, relacionados à fermentações acidentais como a fermentação láctica, acética e butírica, os quais pertencem à várias espécies e apresentam-se com morfologia de bastonetes longos ou curtos.

Esses são no entanto, trabalhos antigos na maioria provenientes de outros países, utilizando como matéria prima grãos, beterrabas ou uvas, que apresentam características diferentes da cana-de-açúcar que é empregada na produção de álcool entre nós.

NEVES (1938) parece ser o precursor do assunto no Brasil, citando em seu trabalho as fermentações acética, láctica, butírica e do dextrênio, dando ênfase as bactérias do gênero *Bacillus* e *Streptococcus*. O mesmo autor também descreve as características de cada tipo de fermentação contaminante, dando ênfase à fermentação do dextrênio, causada por *Leuconostoc mesenteroides*.

ALMEIDA (1940) enfatiza os fatores que propiciam o aparecimento das infecções nas fermentações alcoólicas.



GALLI (1961) descreveu os aspectos microbiológicos das contaminações alcoólicas, sendo que as bactérias responsáveis pela fermentação acética são bastonetes gram negativos, aos pares, não esporulados, aeróbios obrigatórios, pertencentes ao gênero *Acetobacter*, sendo as principais espécies *A. aceti*, *A. acetosum*, *A. kuntze-gianum* e *A. suboxidans*. As bactérias responsáveis pela fermentação láctica pertencem a família *Lactobacteriaceae*, são bastonetes, aos pares ou isolados, imóveis, ou ainda cocos que estão agrupados em cadeias ou isolados, gram positivos, microaerofílicos, tendo como principais espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. leischmanii* e *Streptococcus lactis*. As bactérias responsáveis pela fermentação butírica pertencem ao gênero *Clostridium*, sendo as espécies mais importantes *C. pasteurianum* e *C. saccharobutiricum*.

Também relaciona a fermentação do dextrano à presença de *Leuconostoc*, sendo *L. mesenteroides*, o principal agente dessa fermentação, ao mesmo tempo que relaciona várias bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Aerobacter* e *Streptococcus*, como sendo os responsáveis pela fermentação do levâneo.

SERRA et alii (1979) ao estudar a contaminação da fermentação alcoólica, onde a característica principal foi a formação de pequenos flocos compostos de células

las de leveduras e bactérias no mosto em fermentação, detectaram várias espécies de *Bacillus*, sendo um deles identificado como *Sporolactobacillus*, que apresentou resistência ao tratamento ácido (pH 1,9-2,0). Esse isolado apresentou características morfológicas e bioquímicas muito semelhantes a espécie isolada por KITAHARA e SUZUKI (1963) identificada como *Sporolactobacillus inullinus*.

Posteriormente, os mesmos autores em 1980 constataram que a flocculação do fermento era devido a bactéria anteriormente descrita, e que há uma correlação negativa entre as bactérias e as leveduras vivas, o que não ocorre entre as bactérias e a acidez do vinho, uma vez que é positiva e altamente elevada.

Portanto, a acidez do vinho é indicativa da ocorrência de bactérias contaminantes, já que essas na sua maioria produzem ácidos orgânicos.

Verificou-se que a acidez do vinho e o rendimento alcoólico se correlacionam negativamente mostrando o efeito específico das bactérias, já o tempo de fermentação se correlaciona significativamente com a acidez, aumentando em função da presença de bactérias contaminantes.

O rendimento da fermentação apresentou uma correlação negativa com o número de bactérias presentes, mostrando um decréscimo de 15%.

AMORIM et alii (1981) ao avaliarem material

de diferentes destilarias de várias regiões do Estado de São Paulo, verificaram que as bactérias contaminantes podem afetar o rendimento alcoólico de forma a reduzir a níveis de 55% do valor teórico.

AMORIM e OLIVEIRA (1982), se referem as bactérias pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, como sendo as mais atuantes e geralmente associada com fracassos das fermentações devido à formação de ácido lático (homofermentativa) e outros ácidos orgânicos. Também descrevem os problemas que a presença desses microrganismos contaminantes traz à fermentação alcoólica, correlacionando o rendimento alcoólico em função da acidez fixa do vinho, em função das bactérias presentes e concluem que há uma correlação negativa entre esses parâmetros, efeito resultante da presença desses contaminantes.

A presença de bactérias tipo bacilo Gram positivo, em concentrações superiores que  $10^8$  cel/ml, leva a uma redução do rendimento alcoólico da ordem de 20 a 98% do rendimento teórico, revelando a importância do controle das populações bacterianas nos caldos (ALTERTHUM et alii, 1984).

Muitos estudos vem sendo desenvolvidos na tentativa de se controlar a infecção nas fermentações alcoólicas. A aplicação de ácido sulfúrico, que é uma prática

ca comum (AMORIM e OLIVEIRA, 1982), de pentaclorofenol (GAI, 1945; BARRETO, 1949; ALMEIDA e LIMA, 1953; AYRES, 1960), de diversas associações de penicilina e cloranfenicol (AQUARONE et alii, 1968); tem sido recomendada para combater a infecção, aumentando assim o rendimento.

SATO et alii (1980) elevaram de 10 e 12% o rendimento alcoólico, quando utilizaram penicilina G potássica, hexaclorofeno e cloranfenicol, associados nas concentrações de 1000 U, 4 mg e 3 mg/l, respectivamente.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

O material para o presente trabalho constou de vinho de dornas em final de fermentação alcoólica, apresentando contaminantes ao nível de  $10^7$  bactérias viáveis/ml.

As amostras foram coletadas em 17 destilarias (autônomas e anexas) durante a safra 1983/84, sendo a localização, o tipo de tratamento do caldo, e a constituição dos mosto relacionados na Tabela 1.

Para a realização do trabalho utilizaram-se os seguintes meios de cultura.

#### 1. Meio de Contagem - Isolamento

Dextrose	50 (30;20)g
Monofosfato de Potássio	0,55 g
Cloreto de Potássio	0,425 g
Cloreto de Cálcio	0,125 g
Sulfato de Magnésio	0,125g

Cloreto Fêrrico	2,5 mg
Sulfato de Manganês	2,5 mg
Caseína Hidrolizada	5,0 g
Extrato de Levedura	4,0 g
Ágar	20 g
Água destilada	1000 ml

### 2. Meio para Armazenagem

Extrato de Levedura	20 g
Proteose Peptona	5,0 g
Dextrose	10,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,0 g
Ágar	18,0 g
Água destilada	1000 ml

### 3. YMA - Meio para Placa Mestra

Extrato de Levedura	3,0 g
Extrato de Malte	3,0 g
Peptona	5,0 g
Dextrose	10,0 g
Ágar	20,0 g
Água destilada	1000 ml

Os meios de cultura, corantes e reagentes utilizados para os testes bioquímicos e microscópicos estão descritos na Tabela 2.

### 3.1.1. Preparo do material

#### . Meios de cultura

Os meios de cultura foram preparados e esterilizados por 15 minutos a 121°C em autoclave.

#### . Tubos de cultura(13 x 100 mm):

Os tubos foram distribuídos nas estantes de alumínio e cobertos com uma placa de cristalização (A estante contém 2 grupos de 20 tubos). Cada estante, contendo 40 tubos, foi acondicionada em saco de papel, fechado com clips e levado para esterilizar em forno Pasteur por 2 hs a 180°C.

#### . "Dispensete" tipo Oxford para distribuição do meio líquido em tubos (0-10 ml).

O dispensete foi acondicionado em uma jarra de ácido inoxidável, coberto com papel alumínio e papel jornal e esterilizado a 121°C por 15 minutos em autoclave.

#### . Palitos de haste longa

Os palitos foram acondicionados em tubos de cultura (25 x 200 mm), com tampa rosqueável e autoclavável e esterilizados por 20 minutos em autoclave.

Tabela 1. Procedência e tipo das amostras.

PROCEDÊNCIA	TRATAMENTO DO CALDO	LOCALIZAÇÃO
1. Usina Barra Grande	Caldo Aquecido - Decantado + Melaço	Lençóis Paulista, SP
2. Usina São José	Caldo Aquecido - Decantado + Melaço	São José de Macatuba, SP
3. Usina Vale do Rosário	Caldo Aquecido - Decantado + Melaço	Orlândia, SP
4. Usina Santa Elisa	Caldo Aquecido - Decantado + Melaço	Sertãozinho, SP
5. Usina Costa Pinto	Caldo Aquecido - Decantado + Melaço	Piracicaba, SP
6. Usina Santa Bárbara	Caldo Direto - Peneirado + Melaço	Santa Bárbara D'Oeste, SP
7. Destilataria Alcídia	Caldo Aquecido - Decantado + Xarope	Teodoro Sampaio, SP
8. Destilataria Galo Bravo	Caldo Aquecido - Decantado + Xarope	Ribeirão Preto, SP
9. Destilataria Jardeste	Caldo Aquecido - Decantado - Pré-Evaporado	Jardinópolis, SP
10. Destilataria Mandu	Caldo Aquecido - Decantado - Pré-Evaporado	Guaíra, SP
11. Destilataria Moema (DEMOL)	Caldo Aquecido - Decantado - Pré-Evaporado	Orindiúva, SP
12. Destilataria Vale Verde	Caldo Aquecido - Decantado - Pré-Evaporado + Xarope	Junqueirópolis, SP
13. Destilataria Brasilândia (DEBRASA)	Caldo Aquecido - Decantado	Brasilândia, MS
14. Destilataria Guaricanga	Caldo Aquecido - Decantado	Presidente Alves, SP
15. Destilataria Rio Brilhante	Caldo Aquecido	Rio Brilhante, MS
16. Destilataria UNIALCOOL	Caldo Direto s/Aquecimento	Guararapes, SP
17. Destilataria California (DACAL)	Caldo Direto s/Aquecimento	Oswaldo Cruz, SP



Tabela 2. Materiais utilizados na realização dos testes microscópicos e bioquímicos.

PROVA	MEIO DE CULTURA	REAGENTE OU CORANTE
Coloração de Gram	YM Ágar	Cristal violeta, safranina, lugol
Coloração de Esporos	YM Ágar Meio p/Esporulação	Verde malaquita, safranina
Teste de Motilidade	YM Ágar Meio p/Motilidade	
Teste de Catalase	YM Ágar	Água Oxigenada (3%)
Teste Citacromo Oxidase	YM Ágar	N-N-dimetil p-fenil-nodiamina monohidrocloreto(DMFB), $\alpha$ naftol
Teste de Fermentação/Oxidação	Meio OF (Hugh-Leifson)	
Teste de VM (Produção de Ácido)	Caldo Glucose Fosfato (VM)	Solução de vermelho de Metila
Teste VP (Produção de Acetoína)	Caldo Glucose Fosfato (VM)	$\alpha$ -naftol, hidróxido de Potássio
Utilização de Citrato	Agar Citrato de Simmon	
Teste Redução de Nitrato	Caldo Nutr.+0,1% KNO <sub>3</sub>	Reativo de Griess
Descarboxilação de Aminoácidos	Caldo Basal Moller+aa	
Produção de Urease	Agar Uréia de Christensen	
Produção de Indol	Caldo Peptona Tripti. case(Caldo Triptofano)	Reativo de Kovacs
Teste Fenilalanina Deaminase	Ágar PHE deaminase	Solução de Cloreto fêrrico 10%
Teste Crescimento 7% NaCl	Meio <i>Staphylococcus</i> 110	
Teste Produção de DNase	Meio Basal + DNA	HCl (1N)
Teste Produção de H <sub>2</sub> S	Peptona Iron Agar (PIA)	
Teste Produção de Lipase	Meio Basal+Tween 80	
Teste da Hidrólise do Amido	Agar Nutriente + 1% Amido	Lugol
Hidrólise da Caseína	Ágar nutriente + 1% Caseína	
Teste da Hidr. da Gelatina	S 110 Caldo Nutr.+15%Gel.	HCl 1 N
Crescimento em EMB	Meio EMB	

### 3.2. Métodos

O esquema de trabalho para o isolamento das bactérias contaminantes da fermentação alcoólica e da armazenamento das culturas puras encontra-se na Figura 1.

A metodologia para os testes microscópicos e bioquímicos está descrita por DOESTCH (1981) e SMIBERT e KRIEG (1981).

O esquema mostrando a reativação dos isolados para posteriores testes bioquímicos encontra-se na Figura 2.

O sistema empregado para identificação dos 71 isolados foi uma modificação do método de LEE e PFEIFFER (1975) descrito no trabalho de CANHOS (1980). Algumas modificações foram introduzidas pela utilização da replicação em tubos, principalmente para os meios líquidos. Os meios líquidos foram adicionados aos tubos esterilizados (distribuídos nas estantes em 2 grupos de 20) com o auxílio de um dispensete tipo Oxford (1-10 ml), assépticamente.

#### Placa Mestra

A maneira de se preparar a placa mestra com o auxílio de um replicador multifio de níquel-cromo, contendo 20 agulhas está esquematizado na Figura 2.

As culturas inoculadas na placa mestra receberam numerações conforme a Tabela 3.

A placa mestra e a distribuição dos meios líquidos aos tubos foi feita em câmara de fluxo laminar (Veeco).

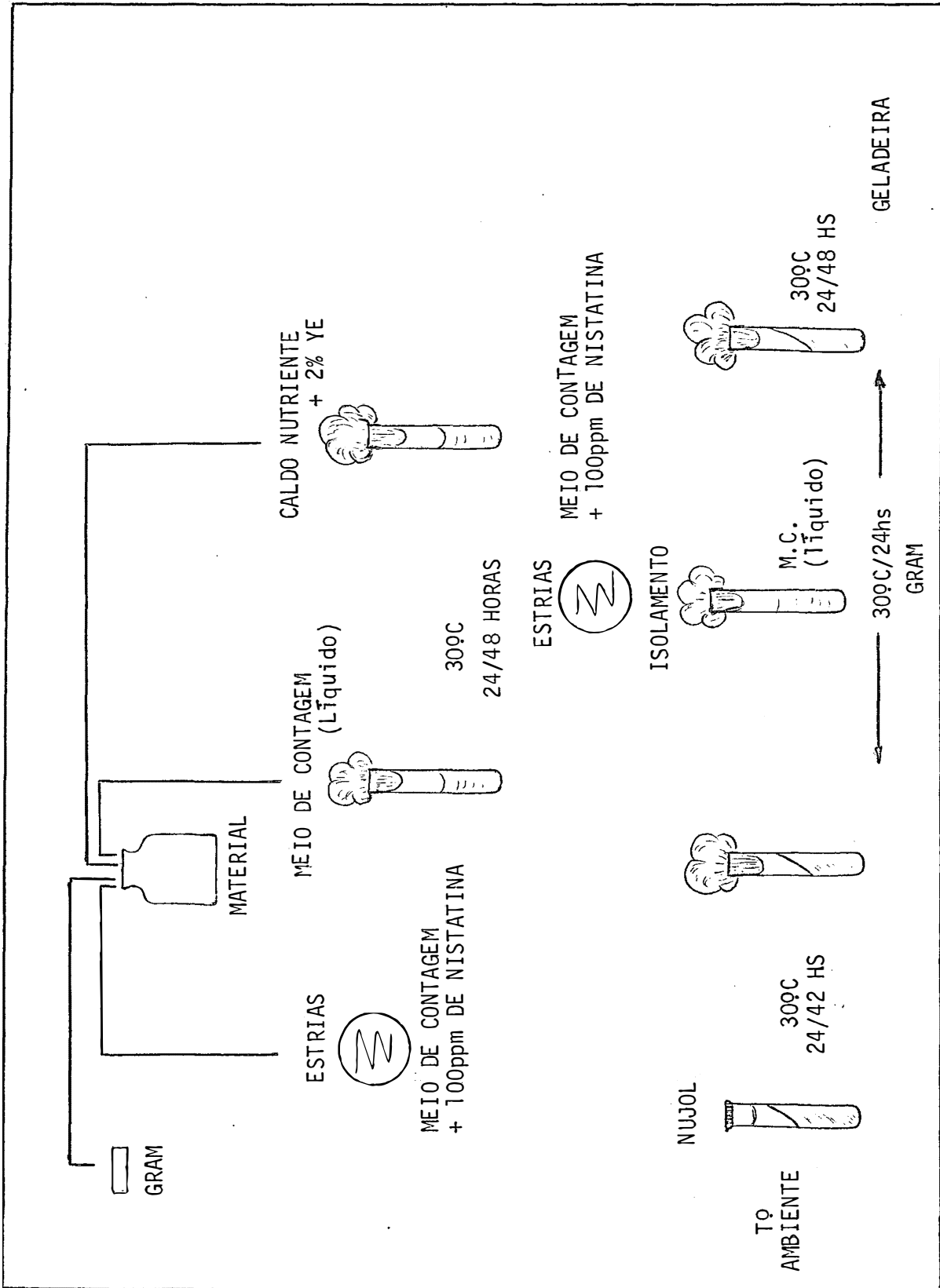


Figura 1. Esquema para isolamento e estocagem das culturas.

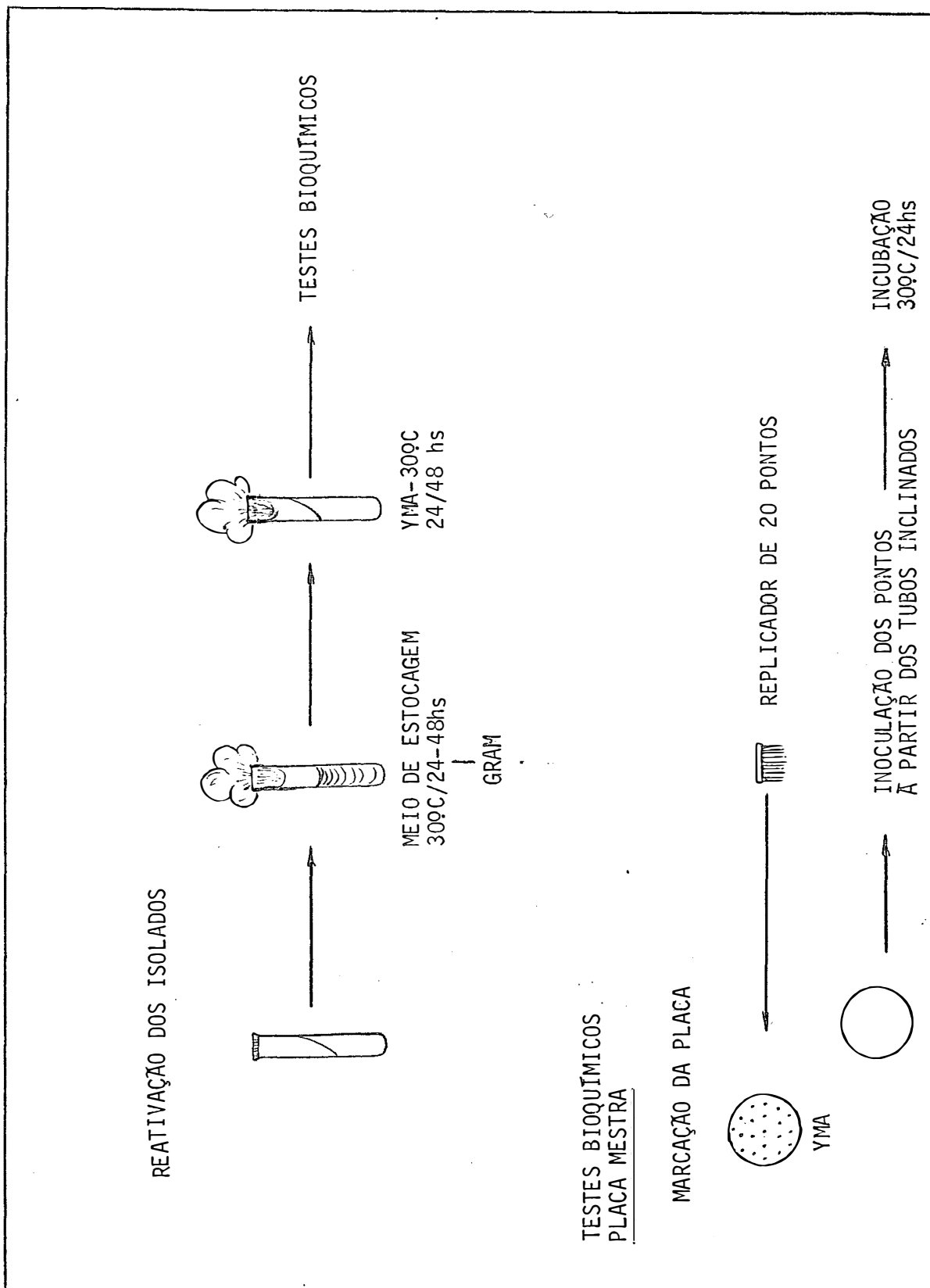


Figura 2. Esquema para reativação dos isolados e testes bioquímicos. (cont.)

Placa Mestra ——— 24 hs ———→  
30°C  
replicação  
(multiplicador 20  
pontos)

### PLACAS

1. YMA: placa Mestra (Reserva)
2. YMA (Gram, Motilidade, Oxidase, Catalase)
3. Agar Citrato de Simmon (utilização de citrato)
4. Agar Uréia de Kristensen (Produção de urease)
5. Agar Fenilalanina Deaminase (Produção PHEdeaminase)
6. Meio Basal + Tween 80 (Produção de Lipase)
7. Agar Nutriente + 1% Caseína (Produção de Caseíase)
8. Agar Nutriente + 1% de Amido (Produção de Amilase)
9. Meio Basal + DNA = Produção de DNase
10. Meio PIA (Peptona Iron Agar) – Produção de H<sub>2</sub>S
11. Meio Staphilococcus 110 – Crescimento 7% NaCl, produção de gelatinase

### TUBOS

12. Meio OF (Hugh-Leifson) – Teste CHO -Oxidação/  
Fermentação
13. Caldo Glucose Fosfato (Clarke Lubs - VM/VP)
14. Agar Nutriente + 0,1% KNO<sub>3</sub> –(Nitrito - Nitrito)
15. Caldo Moeller + aa (LYS, ORN; Arg)  
Descarboxilação de aa
16. Caldo Peptona Trypticase – Produção de INDOL
17. Caldo Nutriente + 15% gelatina-gelatinase

Figura 2. continuação.

Tabela 3. Numeração das culturas.

Nº ISOLADO	PROCEDÊNCIA
1	Usina Barra Grande, SP
2	Destilaria Jardeste, SP
3	Usina Santa Bárbara, SP
4	Destilaria Brasilândia S/A, MS
5	Destilaria Brasilândia S/A, MS
6	Destilaria Brasilândia S/A, MS
7	Destilaria Mandu, SP
8	Destilaria Vale Verde, SP
9	Destilaria Vale Verde, SP
10	Usina São José, SP
11	Destilaria Guaricanga, SP
12	Destilaria Rio Brilhante, MS
13	Destilaria Rio Brilhante, MS
14	Destilaria Uniálcool, SP
15	Destilaria Uniálcool, SP
16	Destilaria Brasilândia S/A, MS
17	Destilaria Guaricanga, SP
18	Usina Santa Elisa, SP
19	Usina Costa Pinto, SP
20	Destilaria Moema, SP
21	Usina Barra Grande, SP
23	Destilaria Galo Bravo, SP
24	Usina Barra Grande, SP
26	Usina Costa Pinto, SP
27	Usina Barra Grande, SP
28	Destilaria Galo Bravo, SP
29	Destilaria California - DACAL, SP
30	Destilaria Uniálcool, SP

Cont.

Tabela 3. Continuação.

Nº ISOLADO	PROCEDÊNCIA
33	Destilaria Rio Brilhante, MS
34	Destilaria Jardeste, SP
35	Usina Santa Elisa, SP
37	Destilaria Uniálcool, SP
38	Destilaria Mandu, SP
41	Usina Costa Pinto, SP
42	Usina Vale do Rosário, SP
43	Destilaria Brasilândia S/A-DEBRASA, MS
44	Destilaria Califórnia, SP
45	Destilaria Brasilândia S/A-DEBRASA, MS
46	Destilaria Califórnia-DACAL, SP
47	Destilaria Moema, SP
48	Destilaria Vale Verde, SP
49	Usina Vale do Rosário, SP
50	Usina Vale do Rosário, SP
51	Destilaria Brasilândia S/A-DEBRASA, MS
52	Usina São José (Macatuba), SP
53	Usina São José (Macatuba), SP
54	Usina São José (Macatuba), SP
55	Usina São José (Macatuba), SP
56	Destilaria Galo Bravo, SP
57	Destilaria Jardeste, SP
58	Usina Barra Grande, SP
59	Destilaria Alcidia, SP
60	Destilaria Vale Verde, SP
61	Usina Vale do Rosário, SP
62	Usina Barra Grande, SP

Cont.

Tabela 3. Continuação.

Nº ISOLADO	PROCEDÊNCIA
63	Destilaria Jardeste, SP
64	Destilaria Brasilândia S/A-DEBRASA, MS
65	Destilaria Jardeste, SP
66	Destilaria Jardeste, SP
67	Destilaria Galo Bravo, SP
68	Destilaria California (DACAL), SP
69	Usina Barra Grande, SP
70	Destilaria Jardeste, SP
71	Destilaria Vale Verde, SP
72	Destilaria Brasilândia S/A-DEBRASA, MS
73	Usina Santa Bárbara, SP



Após consulta a diversos trabalhos de taxonomia bacteriana e manuais para identificação, foram construídas 12 chaves, conforme as Figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15; as quais foram usadas no presente trabalho, permitindo a identificação dos isolados (WOLF e BARKERS, 1968; GORDON, HAYNES e PANG, 1973; BAUMANN, DOUDORAUF e STANIEIZ, 1968; BAUMANN, 1968; HENRIKSEN, 1968, 1973; JUNI, 1972, 1978, 1981; BØVRE e HAGEN, 1981; SCHELEIFER, KLOOS e KOCUR, 1981; KOCUR e SCHELEIFER, 1981; NORRIS et alii, 1981; SHARPE, 1981; TEUBER e GEIS, 1981; BERGEY, 1976; BERGEY, 1984).

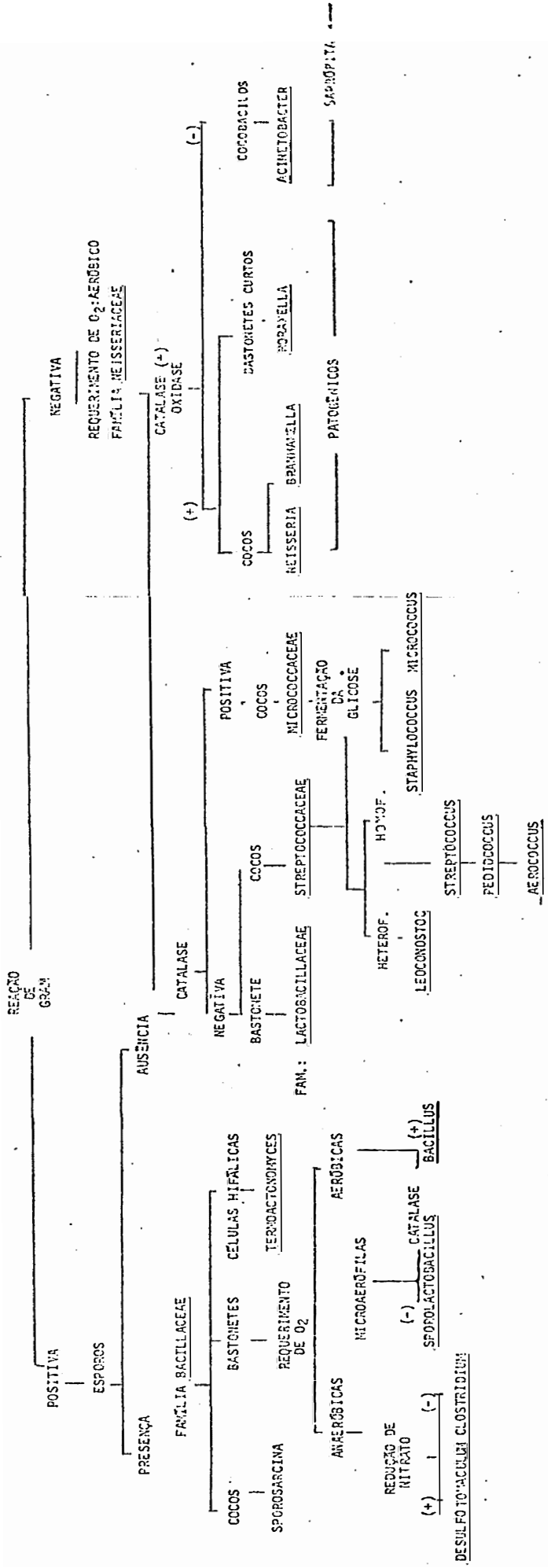


Figura 3. Esquema para identificação dos isolados.

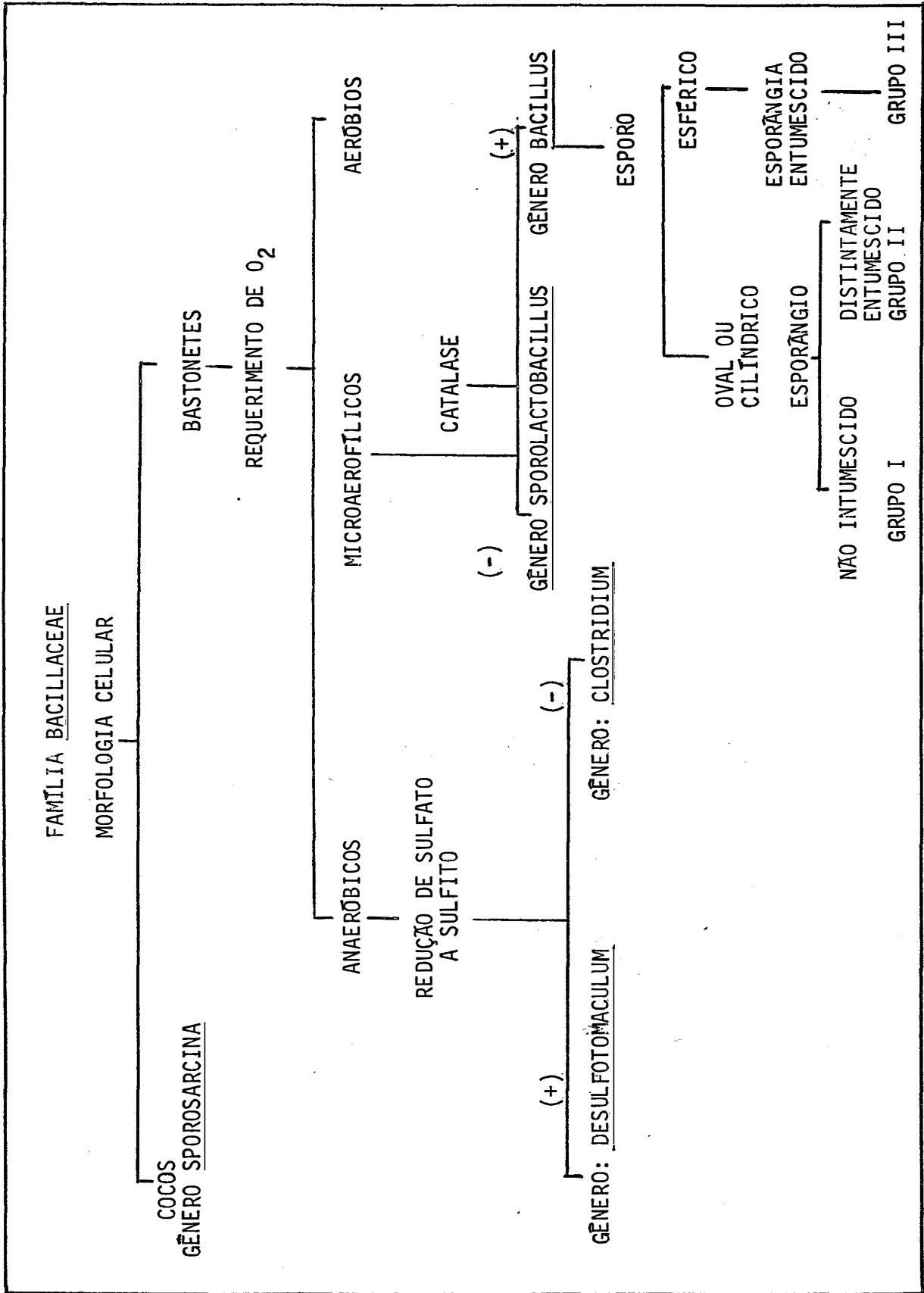


Figura 4. Chave para identificação de Bastonetes e Cocos esporulados

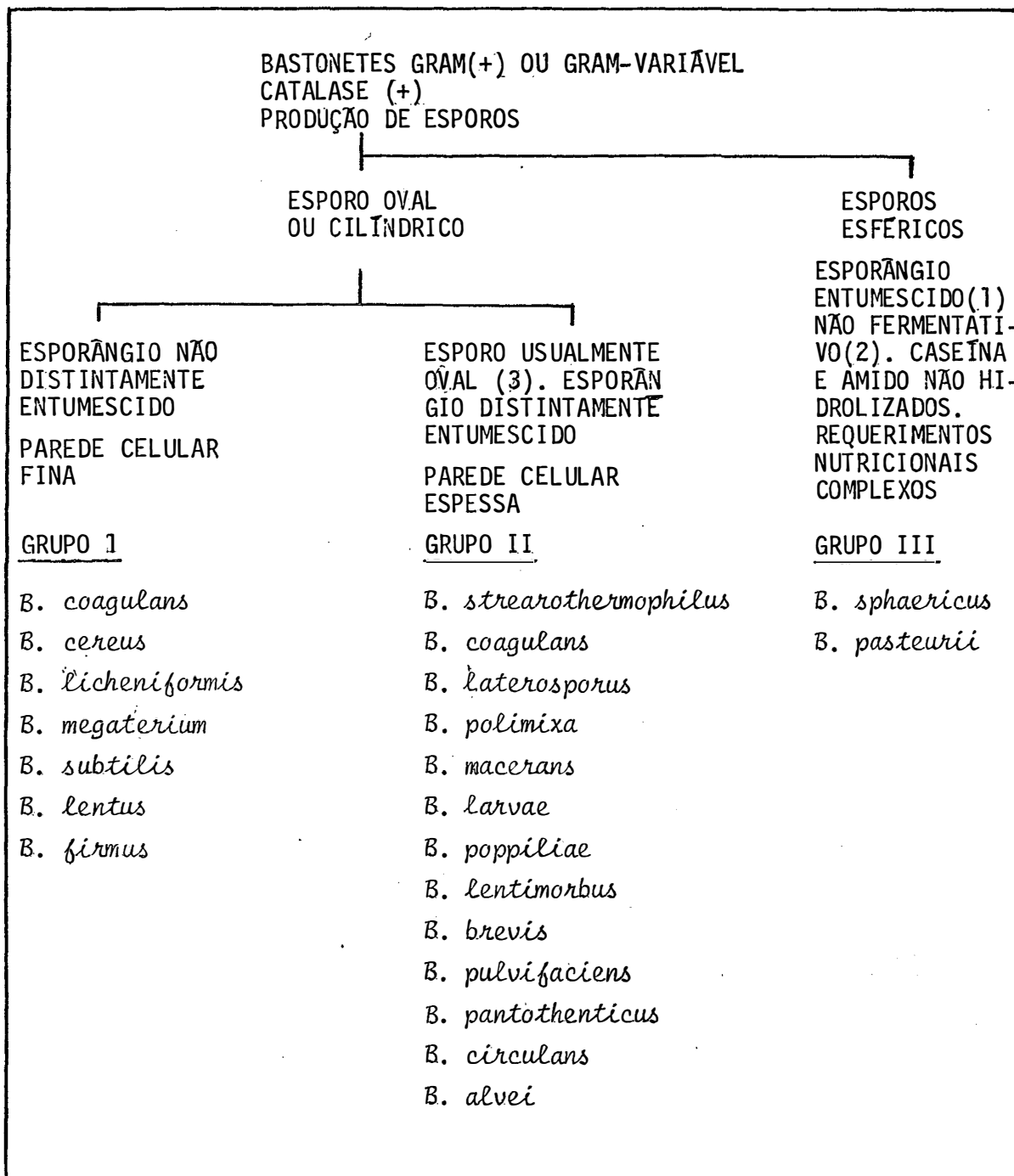


Figura 5. Chave para o gênero *Bacillus*.

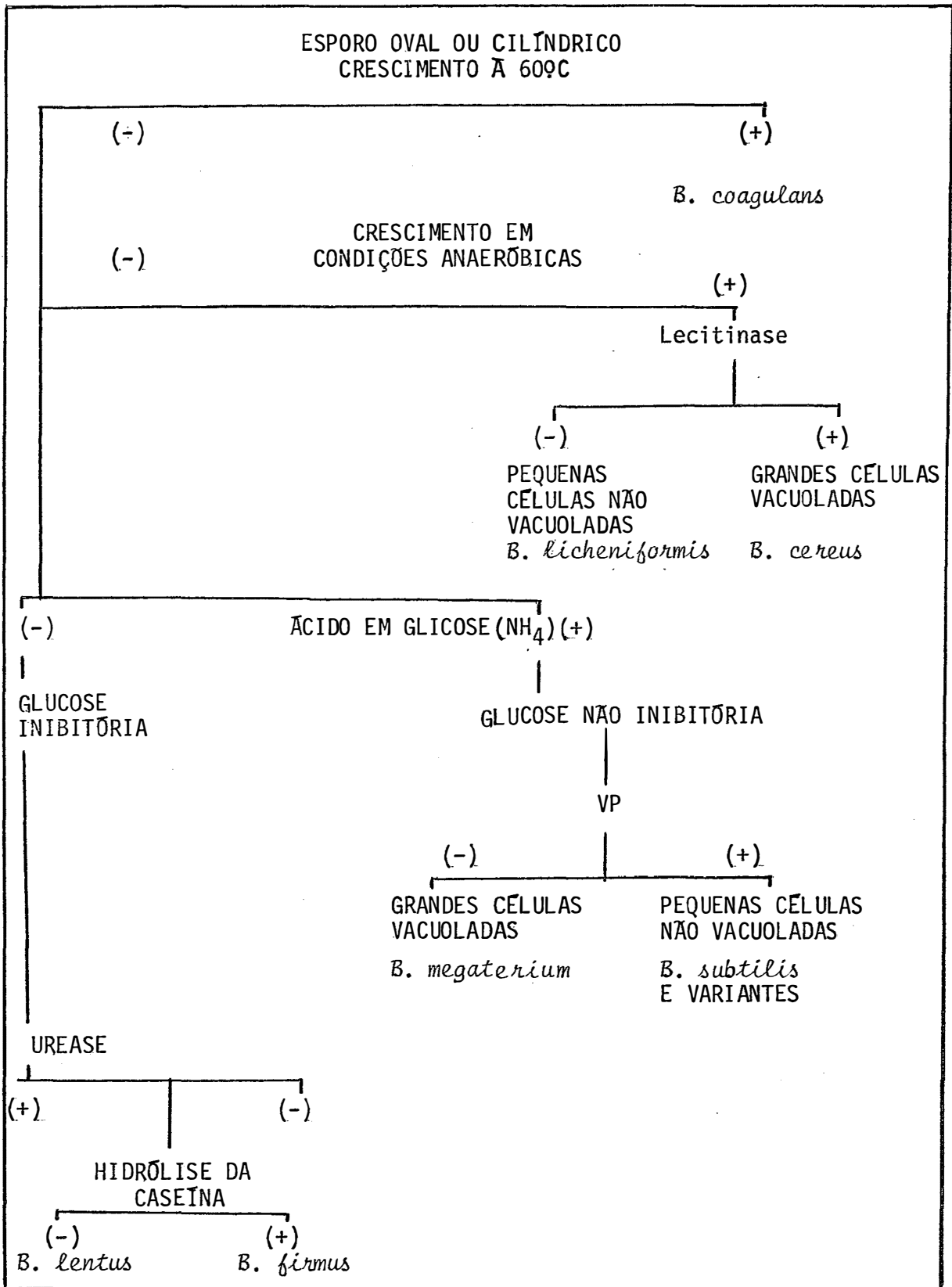


Figura 6. Chave para o Grupo I de *Bacillus*.

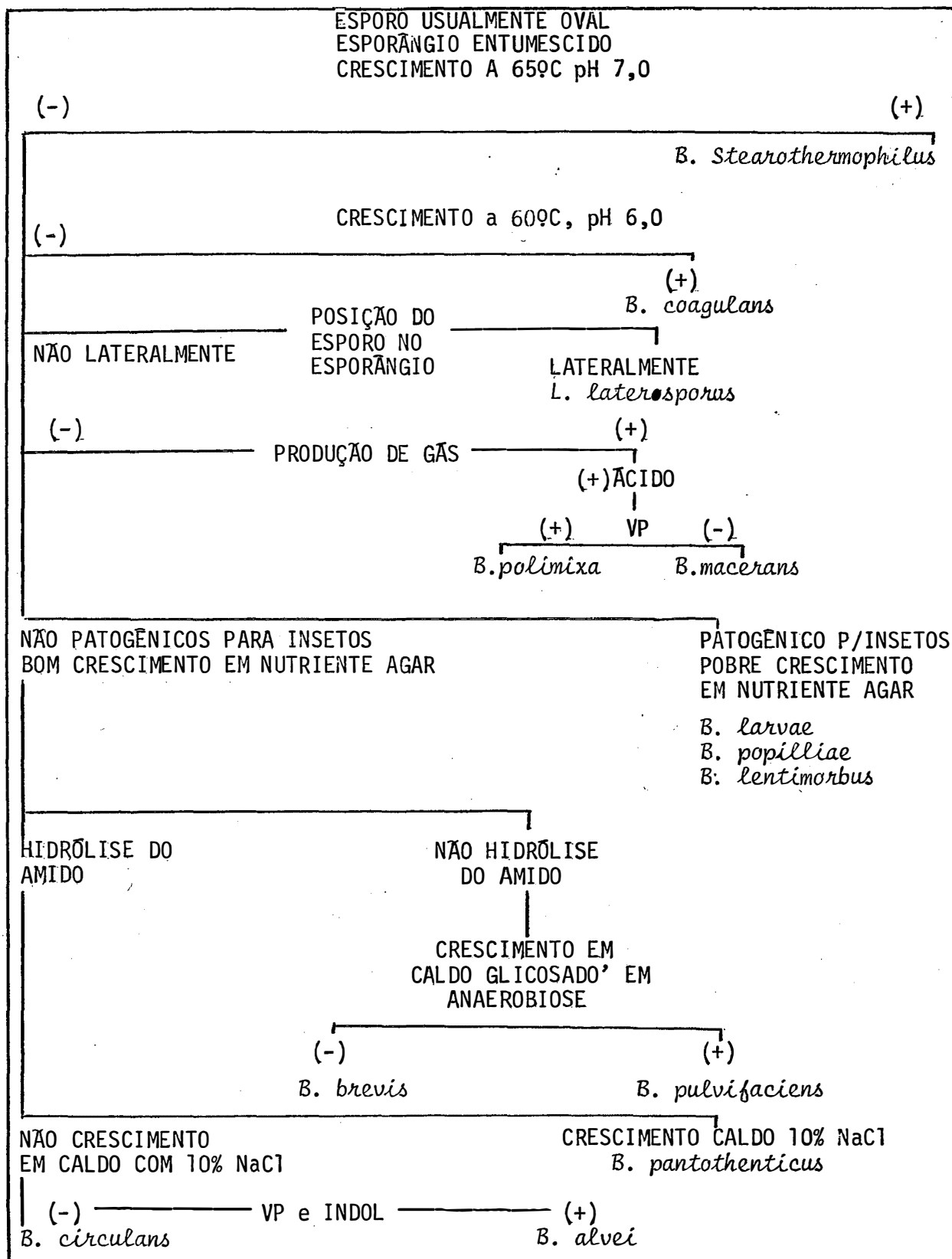


Figura 7. Chave para Bastonetes do Grupo II.

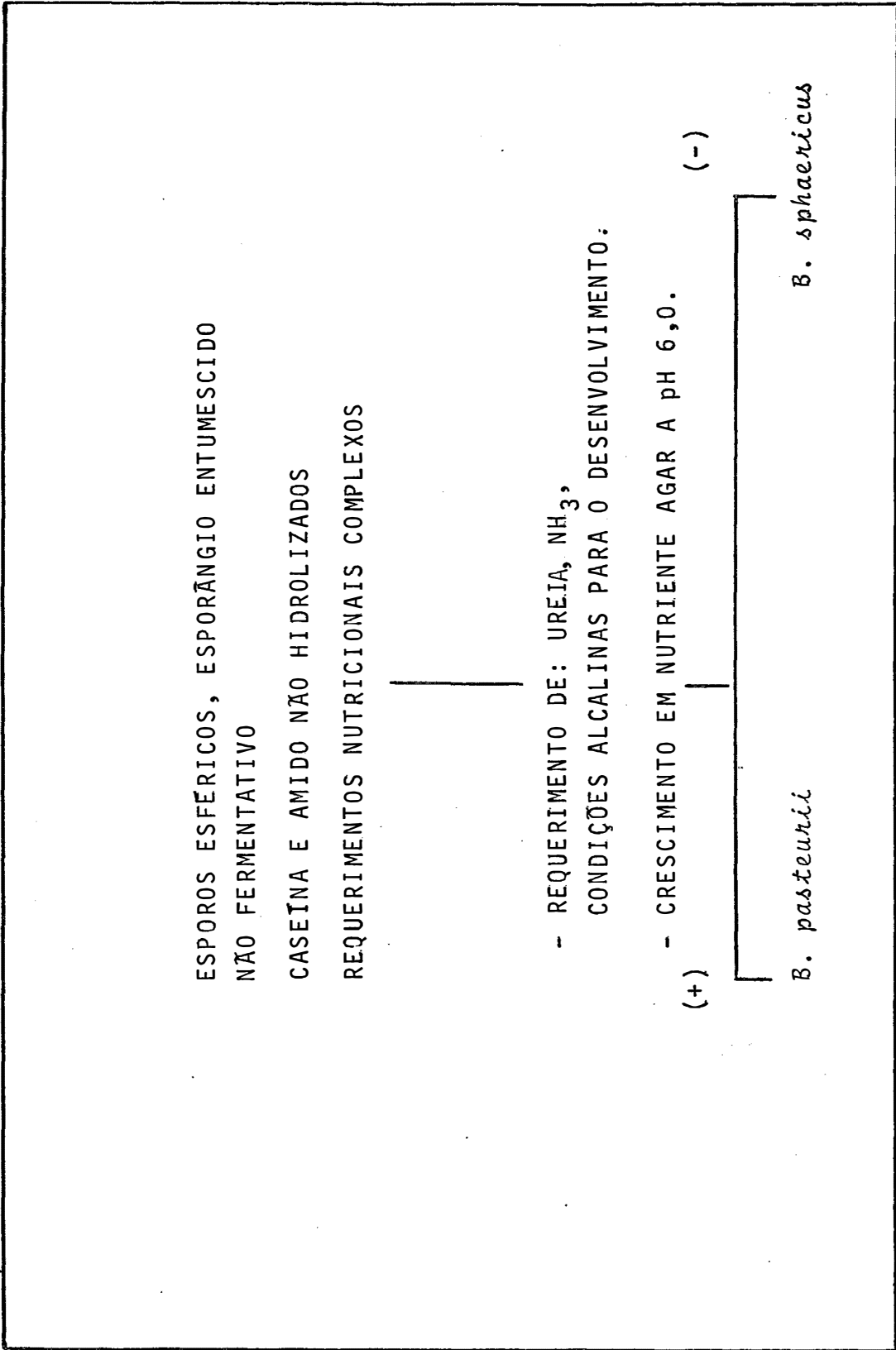


Figura 8. Chave para o grupo III de *Bacillus*.

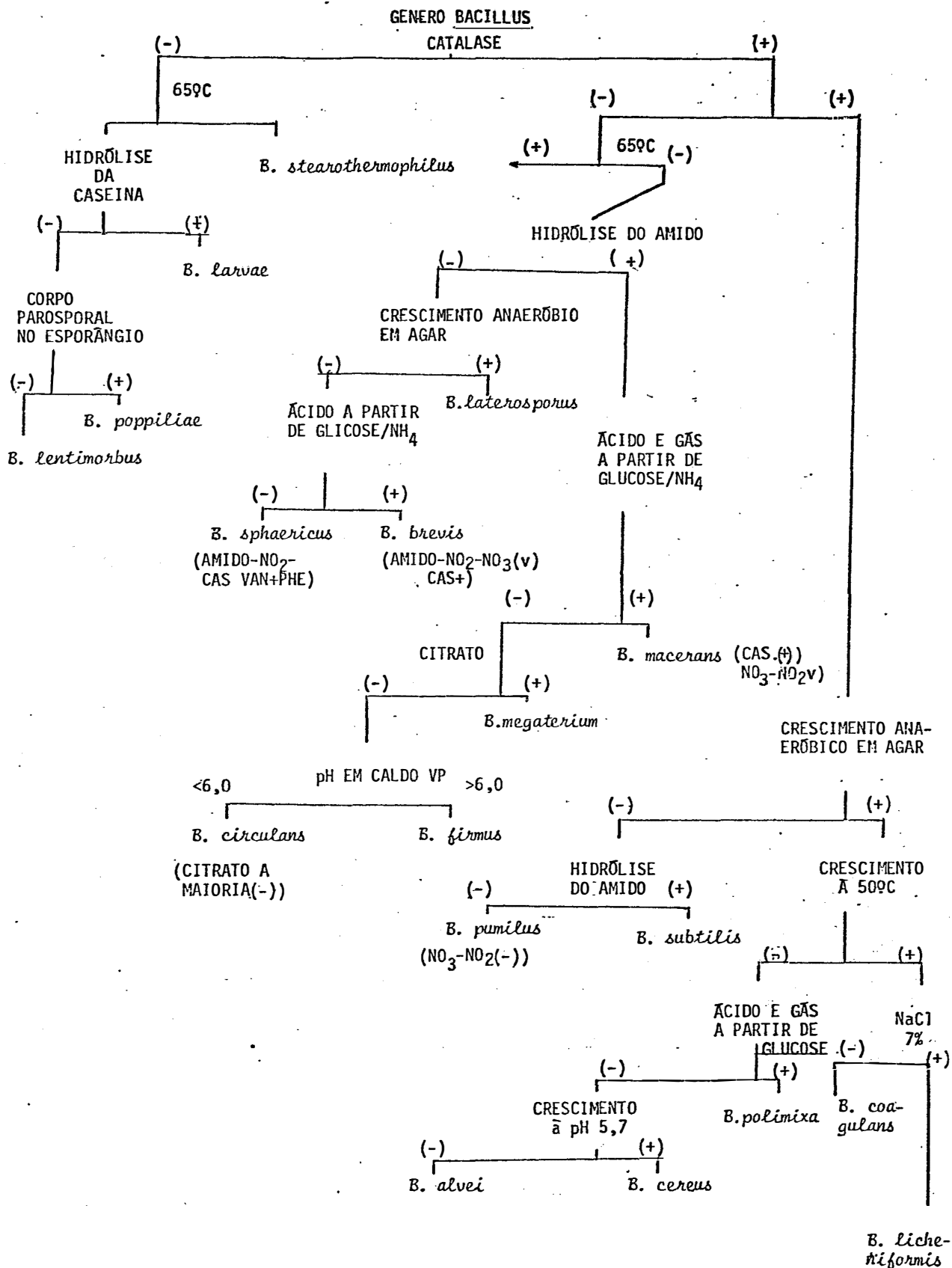


Figura 9. Chave para o gênero *Bacillus*.



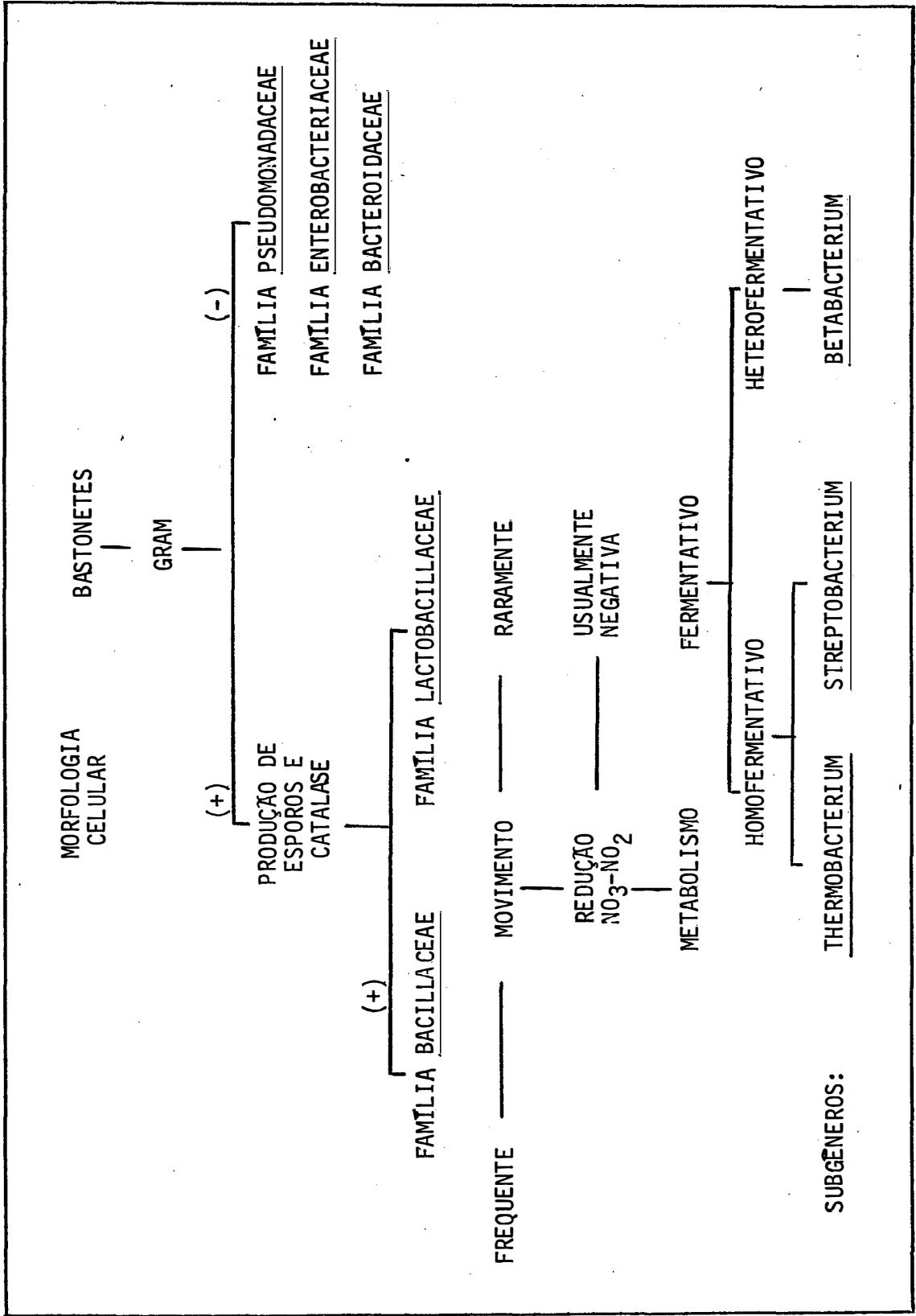


Figura 10. Chave para *Lactobacillus*.

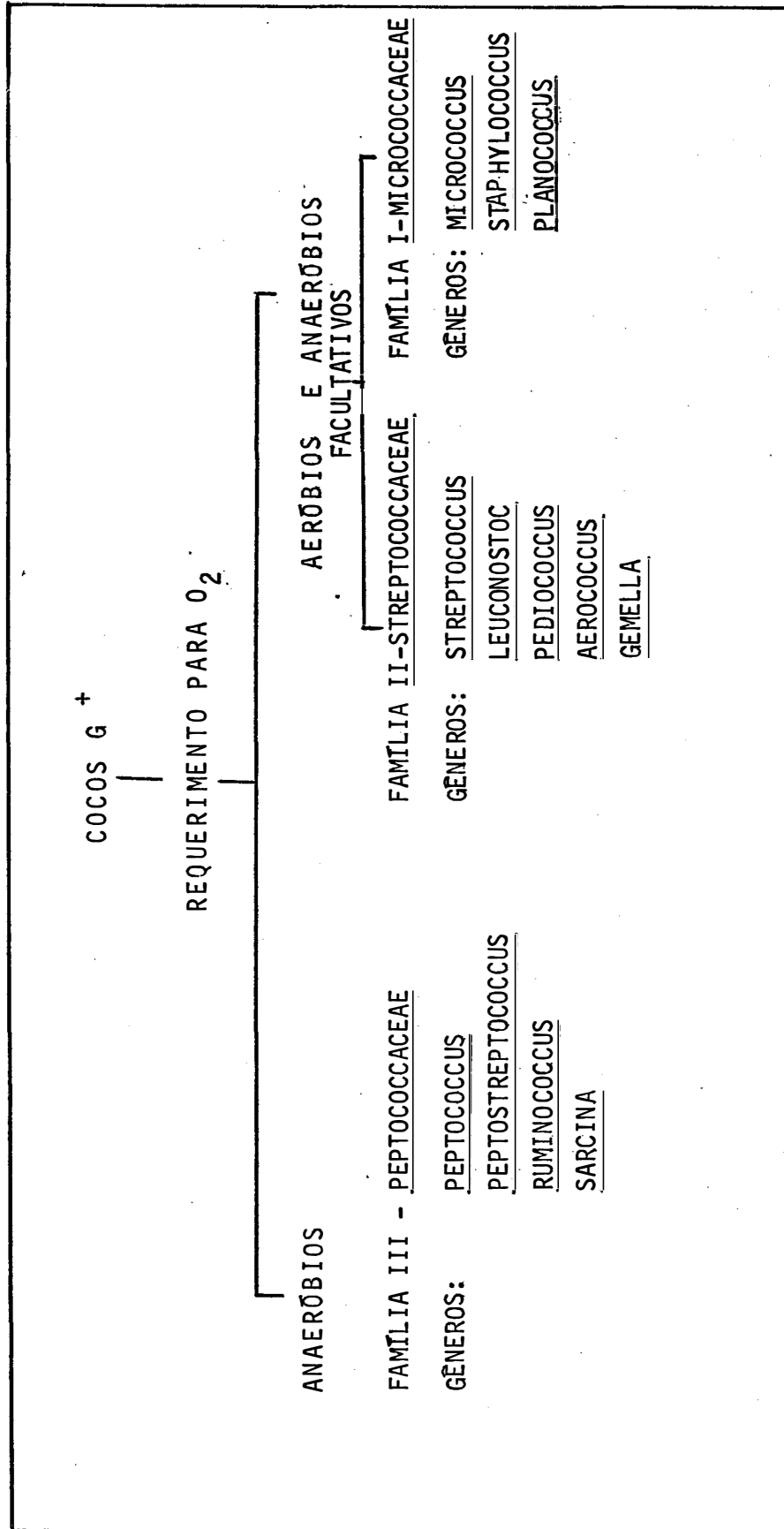


Figura 11. Chave de classificação para Cocos G<sup>+</sup>.

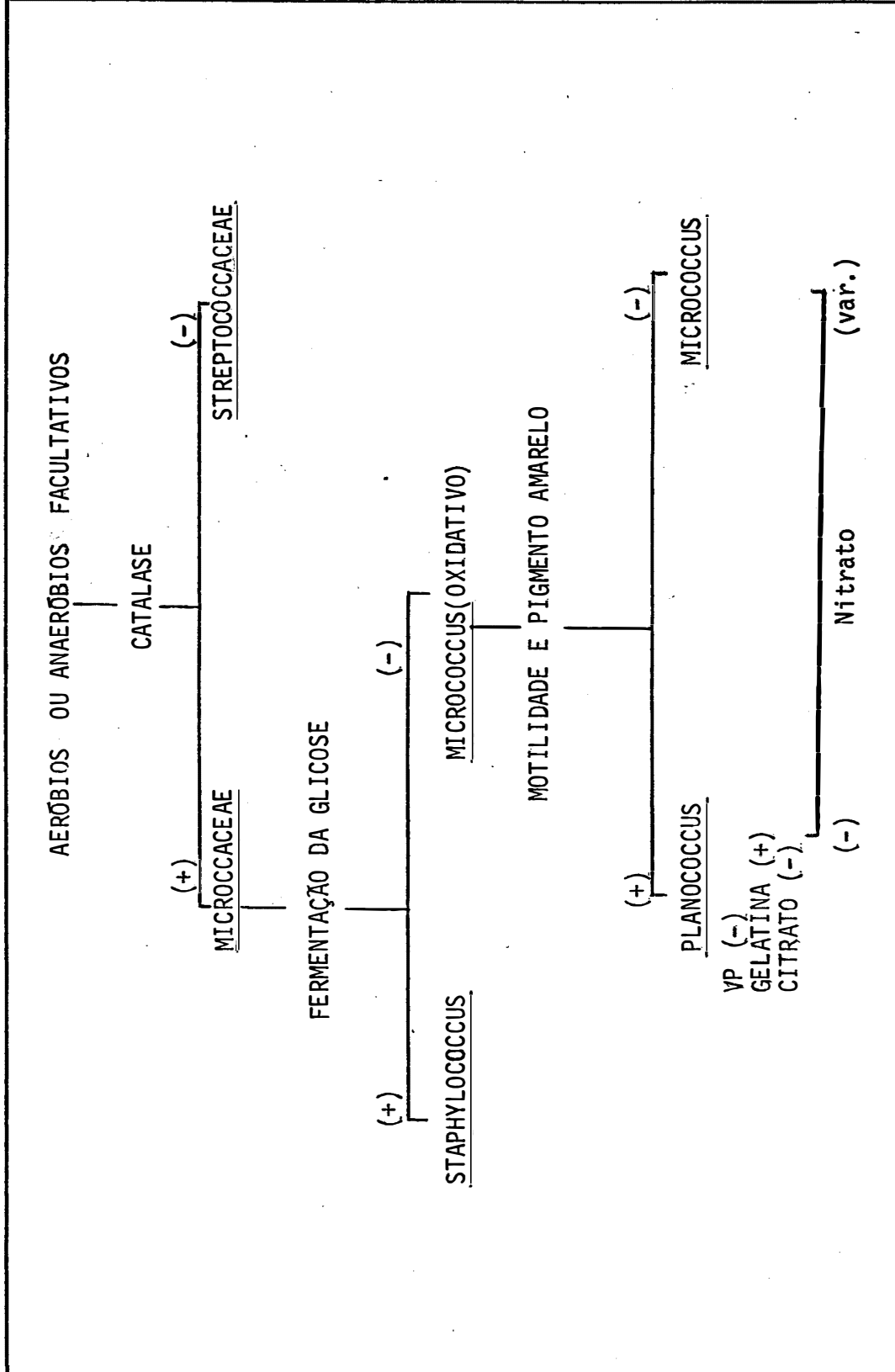


Figura 12. Chave para classificação da Família I dos Cocos G<sup>+</sup>. = *Micrococcaceae*.

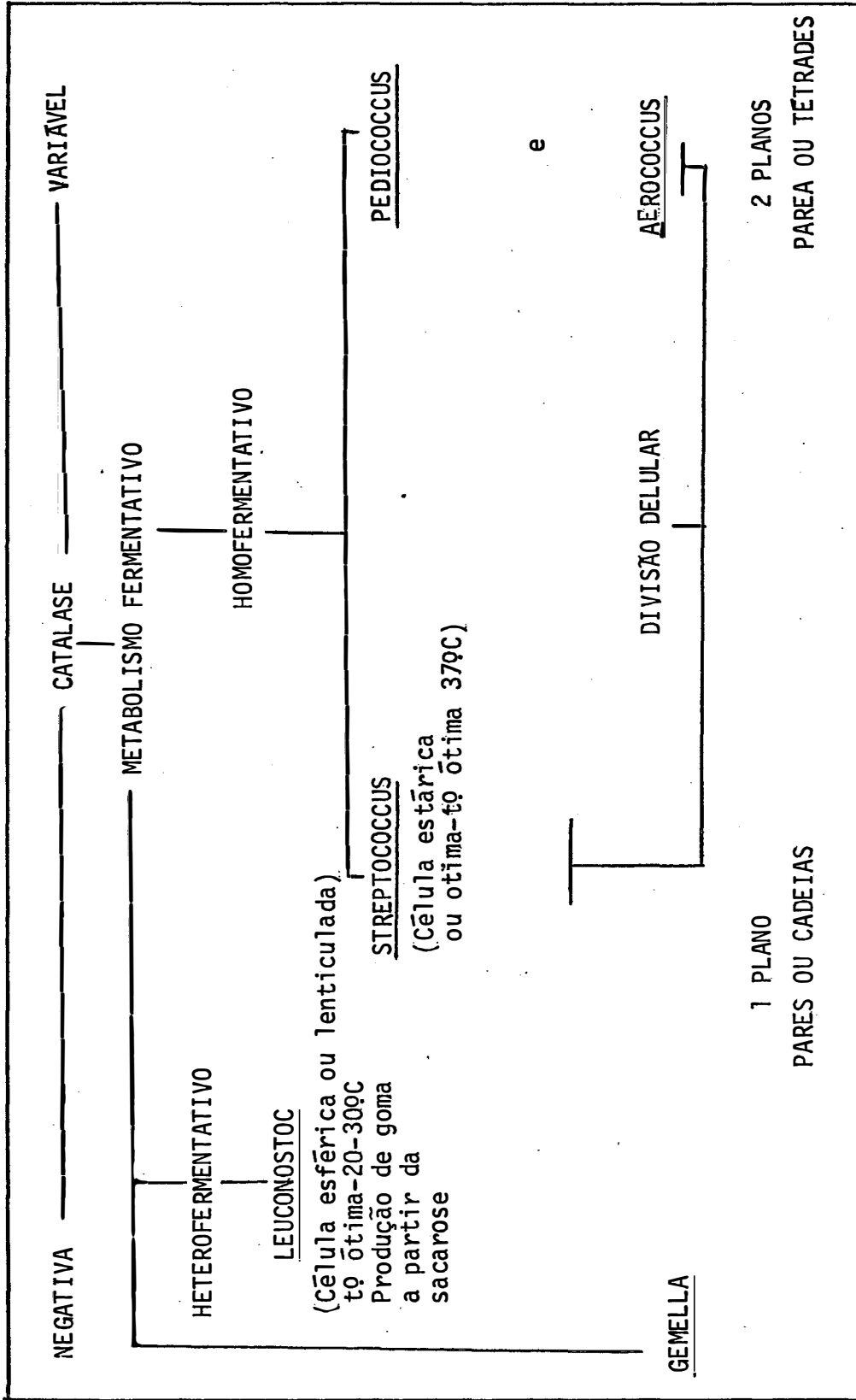


Figura 13. Chave para Cocos - Família II - *Streptococaceae*

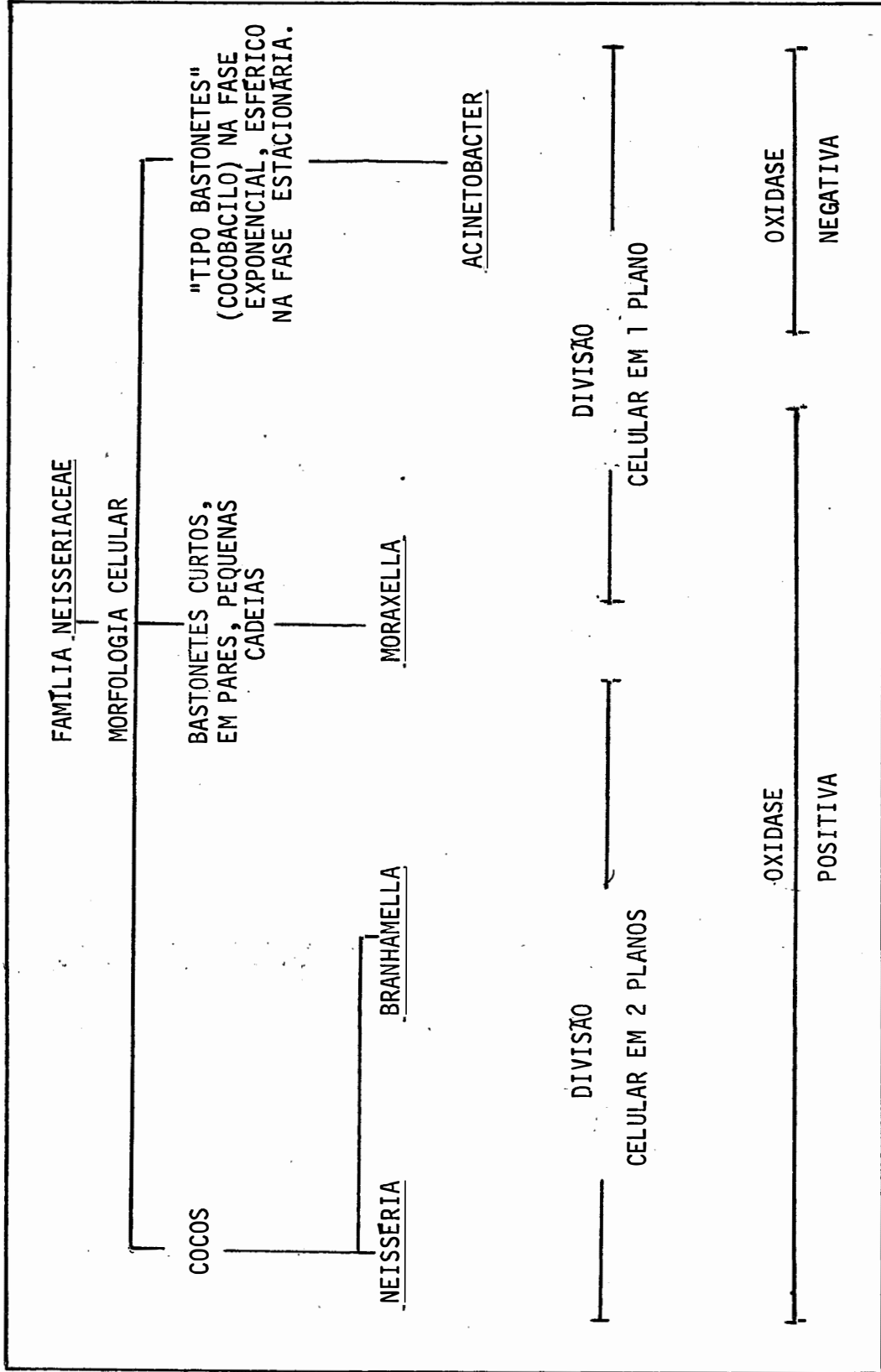


Figura 14. Chave para Cocos e Cocobacilos Gram Negativos.

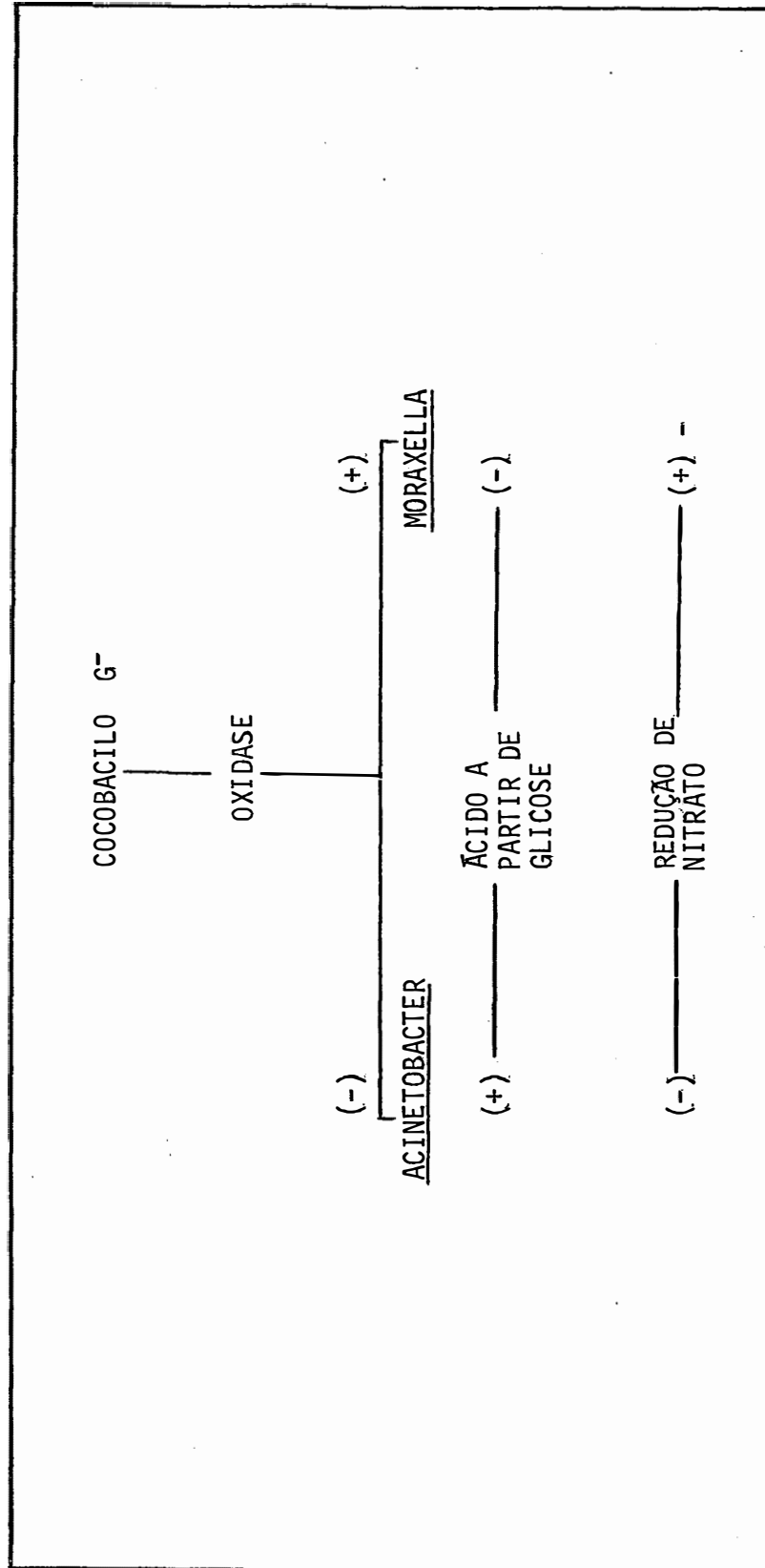


Figura 15. Chave para diferenciação dos gêneros *Acinetobacter* e *Moraxella*.

#### 4. RESULTADOS

Foram isoladas 71 culturas bacterianas a partir de amostras de vinho de dornas em final de fermentação alcolica, das quais 66 culturas foram caracterizadas (Figura 16) e identificadas (Figura 17).

Na Figura 18 são mostradas as porcentagens de cada um dos microrganismos isolados.

As características microscópicas e bioquímicas das bactérias isoladas encontram-se na Tabela 4.

O agrupamento das bactérias isoladas de acordo com a sua procedência encontra-se na Tabela 5.

A Tabela 6 mostra a distribuição dos gêneros das bactérias de acordo com o tratamento do caldo e a constituição do mosto utilizado em cada destilaria.

A distribuição das bactérias isoladas de acordo com o tipo de destilaria (Anexa ou Autônoma), o tipo de tratamento do caldo e a constituição do mosto encontra-se na Tabela 7.

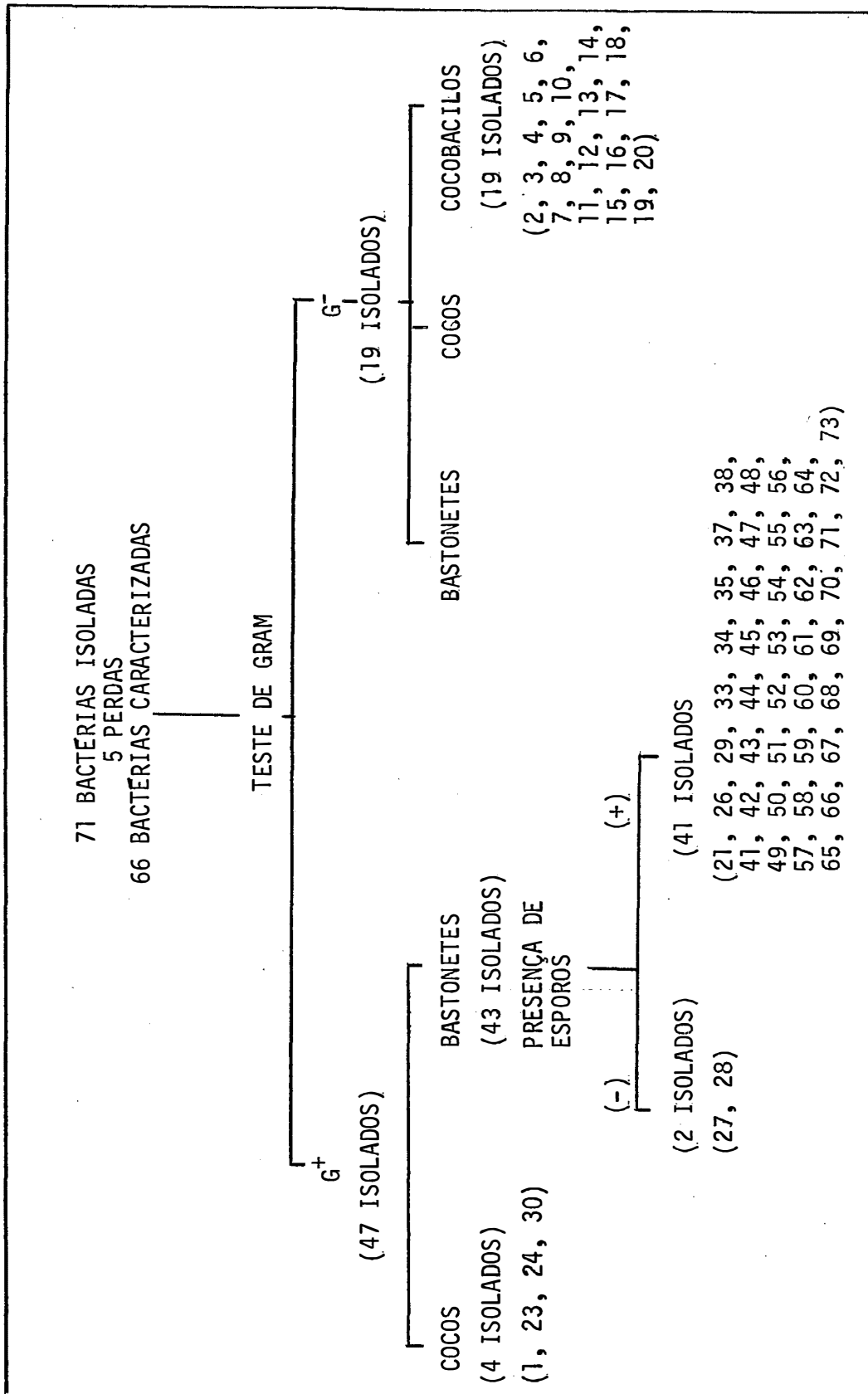


Figura 16. Caracterização das culturas isoladas.



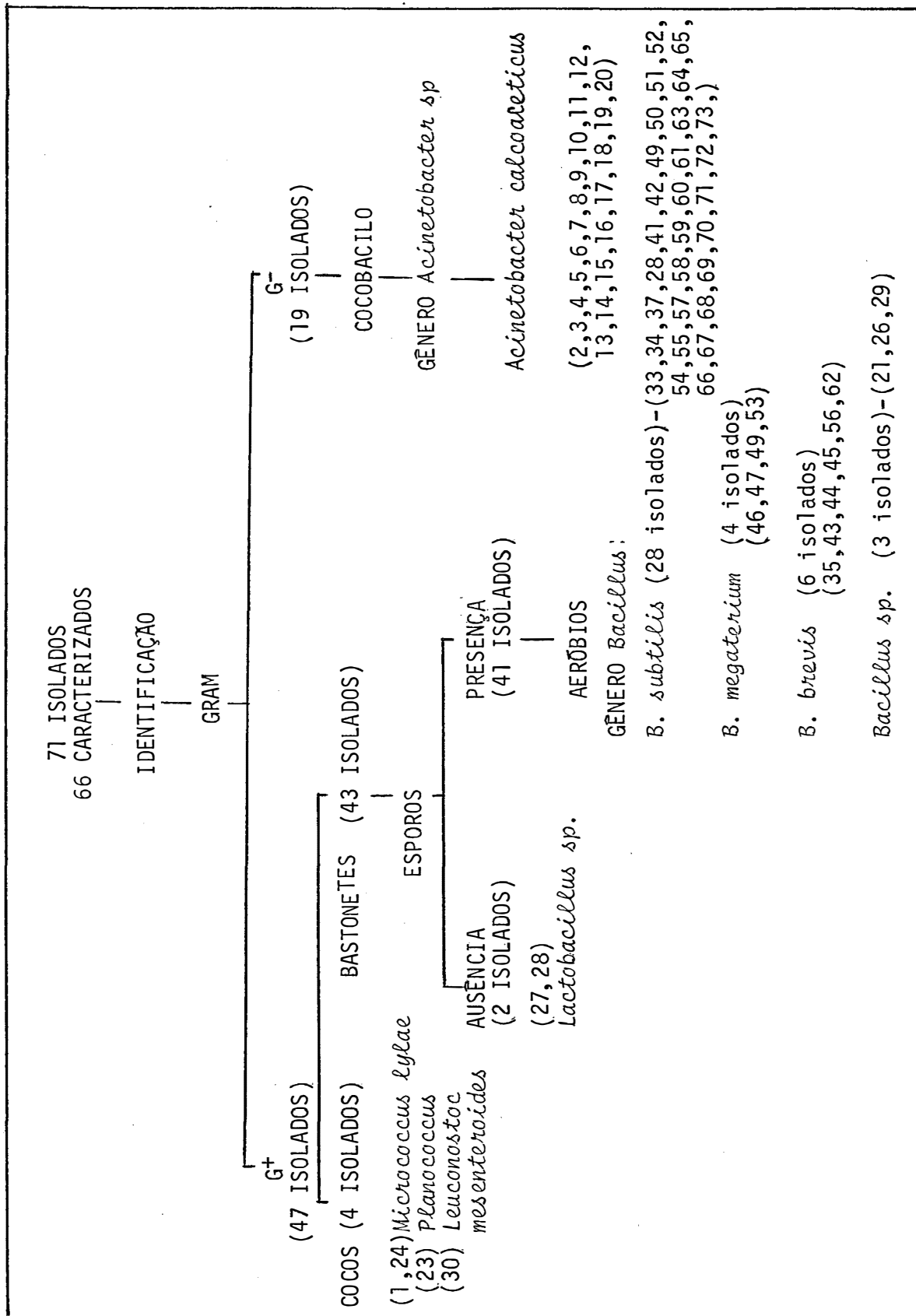


Figura 17. Identificação das culturas isoladas.

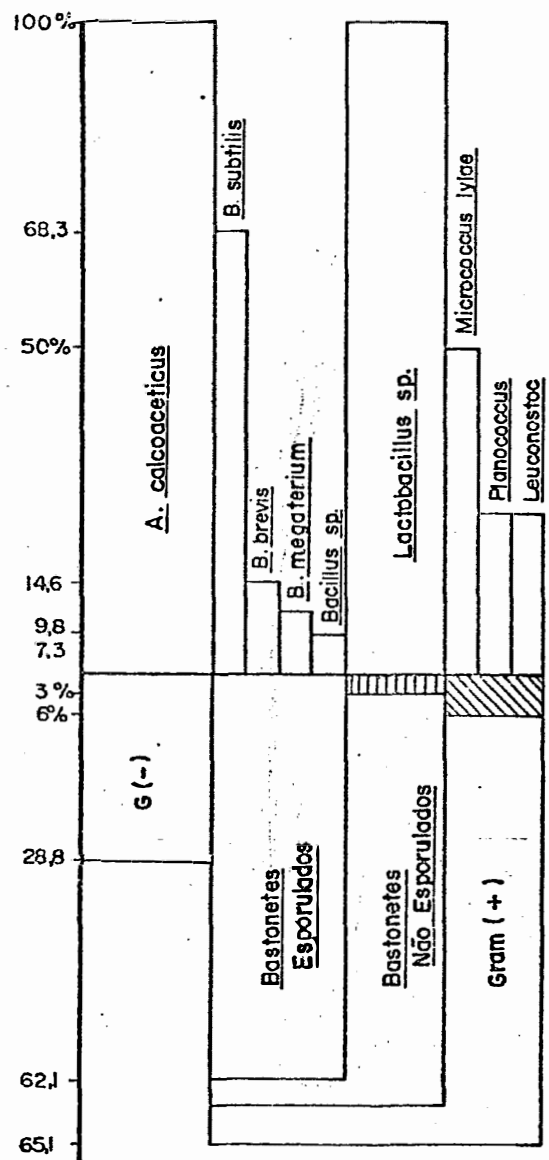


Figura 18. Porcentagem de bactérias em relação à população total.

Tabela 4. Características microscópicas e bioquímicas dos isolados

PROCEDENCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	OXIDASE	MOTILIDADE	H. Lefson S 110 (7% NaCl) PIA H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	PRODUÇÃO ACIDO	VP	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHedam	DNase	CASEÍNASE	LQ GEL.	GENERO
U.B.G.	01	+	C	-	-	0	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Micrococcus sp.
D.Jard.	02	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
U.S.B.	03	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
DEBRASA	04	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
DEBRASA	05	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
DACAL	06	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacteri sp.
D.Mand.	07	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
D.V.V.	08	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
D.V.V.	09	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
U.S.J.M.	10	-	CB	-	+	0	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
D.Guar.	11	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
D.R.Bte.	12	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
D.R.Bte.	13	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	Acinetobacter sp.
D.UNIAL	14	-	CB	-	+	0	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
D.UNIAL	15	-	CB	-	+	0	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
DEBRASA	16	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
D. Guar.	17	-	CB	-	+	0	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
U.S.FLI.	18	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
U.C.P.	19	-	CB	-	+	0	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	Acinetobacter sp.
DEMOL	20	-	CB	-	+	0	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.

Cont.

Tabela 4. Continuação.

PROCEDENCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	OXIDASE	MOTILIDADE	Hleitson	S. 110 (7% NaCl)	PIA H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	PRODUÇÃO ÁCIDO	VP	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEdeam	DNAse	CASEINASE	LQ GET.	GENERO
UBGde.	21	+	B	-	+	OF	NC	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
D.G.Bra.	23	+	C	-	+	O	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Planococcus</i> sp.
U.B.Gde.	24	+	C	-	-	O	NC	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Micrococcus</i> sp.
U.C.P.	26	+	B	-	+	OF	NC	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
U.B.Gde.	27	+	B	-	+	F	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i> sp.
B.G.Bra.	28	+	B	-	+	F	G	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus</i> sp.
Califórnia	29	+	B	-	+	OF	NC	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
D.UNIAL.	30	+	C	-	+	OF	NC	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>Leuconostoc</i> sp.
D.R.Bte.	33	+	B	-	+	OF	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
D.Jard.	34	+	B	-	+	OF	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
U.S.ELI.	35	+	B	-	+	OF	NC	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
D.UNIAL	37	+	B	-	+	OF	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
D.Mand.	38	+	B	-	+	OF	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
U.C.P.	41	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
U.V.R.	42	+	B	-	+	OF	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
DEBRASA	43	+	B	-	+	OF	NC	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
DACAL	44	+	B	-	+	OF	NC	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
DEBRASA	45	+	B	-	+	OF	NC	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	<i>Bacillus</i> sp.

Cont.

Tabela 4. Continuação.

PROCEDENCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	OXIDASE	MOTILIDADE	H. Letifson	S 110 (7% NaCl)	PIA H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	PRODUÇÃO ÁCIDO	VP	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEdeam	DNase	CASEINASE	LO GEL.	GENERO
DACAL	46	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
DEMOL	47	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
D.V.V.	48	+	B	-	+	OF	C	-	C	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
U.R.V.	49	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
U.R.V.	50	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
DEBRASA	51	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
U.S.J.M.	52	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
U.S.J.M.	53	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
U.S.J.M.	54	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
U.S.J.M.	55	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
D.G.B.	56	+	B	-	+	OF	NC	-	C	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
D.Jard.	57	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
U.B.G.	58	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
D.Alc.	59	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
D.V.V.	60	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
U.V.R.	61	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	
U.B.G.	62	+	B	-	+	OF	NC	-	C	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	Bacillus sp.	

Cont.

Tabela 4. Continuação.

PROCEDENCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	OXIDASE	NOTILIDADE	H. Leifson	S 110 (7% NaCl)	PIA H <sub>2</sub> S	EMB.	CITRATO	INDOL	PRODUCÃO ACIDO	VP	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEDEAM	DNase	CASEINASE	LQ GEL.	GENERO
D. Jard.	63	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
DEBRASA	64	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
D. Jard.	65	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
D. Jard.	66	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
D.G.B.	67	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
DACAL	68	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
U.B.G.	69	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
D. Jard.	70	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
D.V.V.	71	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
DEBRASA	72	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
U.S.B.	73	+	B	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.

Tabela 5. Agrupamento das bactérias isoladas de acordo com a procedência.

PROCEDENCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	OXIDAS	MOTILIDADE	ESPORO	HUGHLEIFSON	S 110 (% NaCl)	PIA - H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	PRODUÇÃO ACIDO	VP	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEdeam	DNase	CASEINASE	GELATINASE	GENERO
Usina Barra Grande	01	+	C	-	-	-	0	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Micrococcus</i> sp.
	21	+	B	-	+	-	0	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
	24	+	C	-	-	-	0	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Micrococcus</i> sp.
	27	+	B	-	+	-	OF	C	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Lactobacillus</i> sp.
	58	+	B	+	+	+	OF	C	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
	62	+	B	-	+	+	OF	C	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.
69	+	B	-	+	+	OF	C	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	<i>Bacillus</i> sp.	
Usina São José	10	-	CB	-	+	+	0	-	-	C	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Acinetobacter</i> sp.
	52	+	B	-	+	+	OF	-	-	C	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	53	+	B	-	+	+	OF	-	-	C	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	54	+	B	-	+	+	OF	-	-	C	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	55	+	B	-	+	+	OF	-	-	C	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
Usina Vale do Rosário	42	+	B	-	+	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	49	+	B	-	+	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	50	+	B	-	+	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	61	+	B	-	+	+	OF	C	-	C	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	18	+	CB	-	+	+	0	-	-	C	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Acinetobacter</i> sp.
35	+	B	-	+	+	OF	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.	
Usina Costa Pinto	19	-	CB	-	+	+	0	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Acinetobacter</i> sp.
	26	+	B	-	+	+	OF	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	41	+	B	-	+	+	OF	C	-	C	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.

Cont.

Tabela 5. Continuação.

PROCEDÊNCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	OXIDASE	MOTILIDADE	ESPORO	HUGHLEIFSON S 110 (7% NaCl)	PIA - H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	PRODUÇÃO ACIDO	VP	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEdam	DNase	CASEINASE	GELATINASE	GENERO
Usina Santa Bárbara	03	-	CB	-	+	-	0	-	C	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	<i>Acinetobacter</i> sp.
	73	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	<i>Bacillus</i> sp.
Destilaria Alcídia	59	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	<i>Bacillus</i> sp.
	23	+	C	-	-	-	0	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Planococcus</i> sp.
Destilaria Gato Bravo	28	+	B	-	+	-	F	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Lactobacillus</i> sp.
	56	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	<i>Bacillus</i> sp.
	67	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	<i>Bacillus</i> sp.
Destilaria Jardeste	02	-	CB	-	+	-	0	-	C	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i> sp.
	34	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	57	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	63	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	65	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	66	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
70	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.	
Destilaria Mandu	07	-	CB	-	+	-	0	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i> sp.
	38	+	B	-	+	+	OF	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
Destilaria DEMOL	20	-	CB	-	+	-	0	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i> sp.
	47	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
Destilaria Vale Verde	08	-	CB	-	+	-	0	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i> sp.
	09	-	CB	-	+	+	0	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	<i>Acinetobacter</i> sp.
	48	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
	60	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.
71	+	B	-	+	+	OF	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	<i>Bacillus</i> sp.	

Cont.



Tabela 5. Continuação.

PROCEDENCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	OXIDADA	MOTILIDADE	ESPORO	HUEHLEIFSON	S 110 (7% NaCl)	PIA - H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	PRODUGAO ACIDO	VP	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEdam	DNase	CASEINASE	GELATINASE	GENERO
DEBRASA	04	-	CB	-	+	-	0	-	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
	05	-	CB	-	+	-	0	-	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
	16	-	CB	-	+	-	0	-	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
	43	+	B	-	+	+	OF	-	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Bacillus sp.
	45	+	B	-	+	+	OF	-	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Bacillus sp.
	51	+	B	-	+	+	OF	-	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Bacillus sp.
	64	+	B	-	+	+	OF	-	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Bacillus sp.
72	+	B	-	+	+	OF	-	-	C	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	Bacillus sp.	
Destilaria Guaricanga	11	-	CB	-	+	-	0	-	-	C	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
	17	-	CB	-	+	-	0	-	-	C	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
Destilaria Rio Brilhante	12	-	CB	-	+	-	0	-	-	C	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
	13	-	CB	-	+	-	0	-	-	C	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
	33	+	B	+	+	+	0	-	-	C	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Bacillus sp.
Destilaria UNIALCOOL	14	-	CB	-	+	-	0	-	-	C	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
	15	-	C	-	+	-	0	-	-	C	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.
	30	+	C	-	+	-	OF	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Leucanostoc sp.
	37	+	B	-	+	-	OF	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Bacillus sp.
Destilaria California	29	+	B	-	+	+	OF	-	-	NC	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Bacillus sp.
	44	+	B	-	+	+	OF	-	-	C	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Bacillus sp.
	46	+	B	-	+	+	OF	-	-	C	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Bacillus sp.
	68	+	B	-	+	+	OF	-	-	C	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Bacillus sp.
06	-	CB	-	+	-	0	-	-	C	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	Acinetobacter sp.	

Tabela 6. Distribuição dos gêneros de acordo com o tratamento do caldo e constituição do mosto.

PROCEDÊNCIA	TIPO TRATAMENTO NO CALDO	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS (GÊNEROS)	Nº DO ISOLADO
U.B.G., SP	1	<i>Micrococcus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. N.I.	1, 24 58, -62, 69 27 21
U.S.J.M., SP	1	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	10 52, 53, 54, 55
U.V.R., SP	1	<i>Bacillus</i> sp.	42, 49, 50, 61
U.S.E., SP	1	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	18 35
U.C.P., SP	1	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. N.I.	19 41 26
U.S.B., SP	8	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	3 73
D.Alcídia, SP	2	<i>Bacillus</i> sp.	59
D.G.Bravo, SP	2	<i>Micrococcus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	23 28 56, 67
D.Jardeste, SP		<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	2 34, 57, 63, 65, 66, 70
D.Mandu, SP	3	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	7 38
D.Moema, SP	3	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	20 47

Cont.

Tabela 6. Continuação.

PROCEDÊNCIA	TIPO TRATAMENTO DO CALDO	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS (GÊNEROS)	Nº DOS ISOLADOS
D.V.Verde, SP	4	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	8, 9 48, 60, 71
DEBRASA, MS	5	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	4, 5, 16 43, 45, 51, 64, 72
D.Guaricanga, SP	5	<i>Acinetobacter</i> sp.	11, 17
D.Rio Bte., MS	6	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	12, 13 33
D.Uniãlcool, SP	7	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Leuconostoc</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	14, 15 30 37
DACAL, SP	7	<i>Acinetobacter</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	6 44, 46, 68, 29

## LEGENDA:

- TIPO TRATAMENTO
- 1 - Caldo Aquecido - Decantado + Melaço
  - 2 - Caldo Aquecido - Decantado + Xarope
  - 3 - Caldo Aquecido - Decantado + Prê-evaporado
  - 4 - Caldo Aquecido - Decantado Prê-Evaporado + Xarope
  - 5 - Caldo Aquecido Decantado
  - 6 - Caldo Aquecido
  - 7 - Caldo Direto s/Aquecimento
  - 8 - Caldo Direto, peneirado + Melaço

Tabela 7 . Distribuição das bactérias isoladas de acordo com o tipo de destilaria (Anexa ou Autônoma) e tipo de tratamento do caldo e constituição do mosto.

ORIGEM	TIPO DE DESTIL.	TIPO TRATAM. CALDO	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS (GÊNERO E ESPÉCIE)
U.B.G., SP	A	1	<i>Micrococcus lylae</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. brevis</i> <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.
U.S.J., SP	A	1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>B. megaterium</i> <i>B. subtilis</i>
U.V.R., SP	A	1	<i>B. subtilis</i> <i>B. megaterium</i>
U.S.E., SP	A	1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>B. brevis</i>
U.C.P., SP	A	1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>B. brevis</i> <i>Bacillus</i> sp.
U.S.B., SP	A	8	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>B. subtilis</i>
D.Alcidia, SP	B	2	<i>B. subtilis</i>
D.Galo Bravo, SP	B	2	<i>Micrococcus lylae</i> <i>Lactobacillus</i> sp. <i>B. brevis</i> <i>B. subtilis</i>
D.Jardeste, SP	B	3	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>B. subtilis</i>
D.Mandu, SP	B	3	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>B. subtilis</i>

Cont.

Tabela 7. Continuação.

ORIGEM	TIPO DE DESTIL.	TIPO TRATAM. CALDO	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS (GÊNERO E ESPÉCIE)
D.Moema, SP	B	3	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>B. megaterium</i>
D.V.Verde, SP	B	4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>B. subtilis</i>
DEBRASA, SP	B	5	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>B. brevis</i> <i>B. subtilis</i>
D.Guaricanga, SP	B	5	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Bacillus sp.</i>
D.Rio Bte., MS	B	6	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>B. subtilis</i>
D.Uniálcool, SP	B	7	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>B. subtilis</i>
DACAL, SP	B	7	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>B. brevis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. megaterium</i>

LEGENDA:

TIPO TRATAMENTO	1 - Caldo Aquecido - Decantado + Melaço
	2 - Caldo Aquecido - Decantado + Xarope
	3 - Caldo Aquecido - Decantado + Prē-Evaporado
	4 - Caldo Aquecido - Decantado Prē-Evaporado + Xarope
	5 - Caldo Aquecido Decantado
	6 - Caldo Aquecido
	7 - Caldo direto s/Aquecimento
	8 - Caldo direto, peneirado + Melaço

A - Destilaria Anexa

B - Destilaria Autônoma

Tabela 8. Características microscópicas e bioquímicas dos isolados, identificados como *B. subtilis*.

PROCEDENCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	ESPORO	OXIDASE	MOTILIDADE	H.L.	S 110	PIA/H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	ACIDO	V.P.	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEdam	Dnase	CASEINASE	LQ. GEL.
V. Verde	49	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
V. Rosário	50	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Debrasa	51	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
S.J.M.	52	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
S.J.M.	54	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
S.J.M.	55	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
U.B.G.	58	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
D.Alcídia	59	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
V. Verde	60	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
V. Rosário	61	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Jard.	63	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Debrasa	64	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Jard.	65	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Jard.	66	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
G.B.	67	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Daca1	68	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
U.B.G.	69	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Jard.	70	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
V. Verde	71	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+

Cont.

Tabela 8. Continuação.

PROCEDÊNCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	ESPORO	OXIDASE	MOTILIDADE	H.L.	S 110	PIA/H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	ÁCIDO V.P.	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEdam	DNase	CASEINASE	LQ GEL.
Debrasa	72	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
U.S.B.	73	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
C.P.	41	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
V.R.	42	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
R.Bte.	33	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Jard.	34	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Unial	37	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Mand.	38	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
Jard.	57	+	B	+	-	+	OF	C	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+

- As colônias dos isolados apresentaram-se rugosas com bordos irregulares, espalhando-se rapidamente pela placa, com coloração creme opaca. Em meio líquido é marcante a formação de película.

Tab la 9. Cara te f ticas mic oscóp cas e b oquímicas os solados dentifica os como *Bacillus megaterium*

PROCEDÊNCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	ESPORO	OXIDASE	MOTILIDADE	H.L.	S 110	PIA/H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	ÁCIDO V.P.	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEdam	DNase	CASEINASE	LQ. GEL.
Daca1	46	+	B	+	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Demo1	47	+	B	+	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
U.V.R.	49	+	B	+	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
U.S.J.M.	53	+	B	+	-	+	OF	C	-	C	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+



Tabela 10. Características microscópicas e bioquímicas dos isolados identificados como *Bacillus brevis*.

PROCEDENCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	ESPORO	OXIDASE	MOTILIDADE	H.L.	S 110	PIA/H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	ACIDO	V.P.	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEdam	DNase	CASEINASE	LQ. GEL.
Debrasa	43	+	B	+	-	+	OF	NC	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Dacal	44	+	B	+	-	+	OF	NC	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Debrasa	45	+	B	+	-	+	OF	NC	-	C	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
G.B.	56	+	B	+	-	+	OF	NC	-	C	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
U.B.G.	62	+	B	+	-	+	OF	NC	-	C	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
S.E.	35	+	B	+	-	+	OF	NC	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+

Tabela 11. Características microscópicas e bioquímicas do isolado identificado como *L. mesenteroides*.

PROCEDENCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	ESPORO	OXIDASE	MOTILIDADE	H.L.	S 110	PIA/H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	ACIDO	V.P.	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEdam	DNase	CASEINASE	LQ. GEL.
UNIALCOOL	30	+	C	-	-	OF	C	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 12. Características microscópicas e bioquímicas dos isolados identificados como *Lactobacillus* sp.

PROCEDENCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	ESPORO	OXIDASE	MOTILIDADE	H.L.	S 110	PIA/H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	ACIDO	V.P.	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEdam	DNase	CASEINASE	LQ. GEL.
U.B.G.	27	+	B	-	+	F	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
G.B.	28	+	B	-	+	F	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 13. Características microscópicas e bioquímicas dos isolados identificados como membros da Família *Micromonadaceae*.

PROCEDENCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	ESPORO	OXIDASE	MOTILIDADE	H.L.	S 110	PIA/H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	ACIDO	V.P.	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEdam	DNase	CASEINASE	LQ. GEL.
U.B.G.	01	+	C	-	-	-	0	NC	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
U.B.G.	24	+	C	-	-	-	0	NC	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
G.B.	23	+	C	-	-	+	0	C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 14. Características microscópicas e bioquímicas dos isolados identificados como *Acinetobacter calcoaceticus*.

PROCEDÊNCIA	Nº DO ISOLADO	GRAM	MORFOLOGIA	ESPORO	OXIDASE	MOTILIDADE	H.L.	S 110	PIA/H <sub>2</sub> S	EMB	CITRATO	INDOL	ÁCIDO	V.P.	UREASE	LYS	ARG	ORN	NO <sub>3</sub> -NO <sub>2</sub>	CATALASE	LIPASE	AMILASE	PHEdam	DNase	CASEINASE	LQ. GEL.
D.R. Bte.	13	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	
D.V.V.	08	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
D.Jard.	02	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
D.V.V.	09	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
D.Guar.	11	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
U.S.E.	18	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
Debrasa	16	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
U.S.B.	03	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
Debrasa	04	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
Debrasa	05	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
Daca1	06	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
D.Mand.	07	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
D.R. Bte.	12	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
U.C.P.	19	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
U.S.J.M.	10	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
Unia1	14	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
Demo1	20	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
D.Guar.	17	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	
Unia1	15	-	CB	-	-	+	0	C	-	C	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	

## 5. DISCUSSÃO

Das 66 bactérias isoladas e identificadas, 47 (71,1%) apresentaram reação de Gram positivas, e destas 41 (62,1%) apresentaram morfologia de bastonetes, exibiram esporos e produziram catalase positiva.

Esses 41 isolados foram classificados de acordo com o Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey (1974), parte 15, como pertencendo à Família *Bacillaceae*, gênero *Bacillus*.

De acordo com a similaridade para os testes bioquímicos, esses foram agrupados e classificados quanto à espécie utilizando-se das chaves construídas a partir da literatura consultada.

Para os isolados números 33, 34, 37, 38, 41, 42, 48, 50, 51, 52, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, que representam 68,3% dos bastonetes G<sup>+</sup> isolados, as características importantes que levaram a identificação do gênero-espécie foram: catalase (+); VP (+);

crescimento 7% NaCl; redução de  $\text{NO}_3\text{-NO}_2$  (+), produção de ácido em glicose, hidrólise da caseína, crescimento a 50°C, permitindo que fossem classificados como *Bacillus subtilis* (Tabela 8).

Para os isolados números 46, 47, 49 e 53 (Tabela 9), a morfologia bacteriana apresentando células grandes, de Gram variável, esporuladas, muitas vezes exibindo glóbulos não corados, e os resultados obtidos dos testes bioquímicos, levou a identificação desses isolados como sendo *Bacillus megaterium*, que representaram 9,8% dos bastonetes esporulados isolados.

As características bioquímicas que levaram a essa identificação foram: catalase (+), VP (-), crescimento em 7% NaCl (S 110), produção de ácido em glicose, hidrólise do amido e caseína (+), e redução de  $\text{NO}_3\text{-NO}_2$  variável.

Foi observado que em 3 isolados (47, 49, 53), as colônias apresentavam coloração alaranjada quando do isolamento. Entretanto, essa característica foi perdida com o passar do tempo pelos isolados 47 e 49 e só se manteve para o isolado 53.

Consultando a literatura, verifica-se que as espécies de *Bacillus* pigmentadas ocorrem frequentemente com colônias amarelas, rosas ou laranjas. No entanto, em muitos organismos a produção de pigmento pode ser verificada como sendo uma propriedade transitória (GORDON, HAYNES e PANG, 1973) que está relacionada a linhagens de *Bacillus* de espécies bem definidas, particularmente *B. subtilis*, *B. pumilus* e *B. mega-*

*terium* (TURNER e JERVIS, 1968a). Os mesmos autores (1968b), relataram que dentre as espécies de *Bacillus* isolados de pantano salino e outros tipos de solo, usando como tratamento seletivo o calor, uma grande proporção de 70%, exibiram colônias laranjas, amarelas ou róseas, onde se encontrou carotenóides.

Segundo alguns autores, essas linhagens não são facilmente encontradas em solos não salinos, embora possam ocorrer eventualmente em outros tipos de solo e parece que o fator ecológico principal governando a distribuição dessas linhagens pigmentadas é a salinidade (HOROWITZ - WLASSOVA (1931); BROWN (1964), que seleciona os organismos saltolerantes, e por essa razão prevalecem sobre a população (TURNER e JERVIS, 1968a).

Verifica-se que o isolado 46 não apresentou colônia pigmentada, enquanto os isolados 47, 49 e 53 exibiram colônias rugosas e alaranjadas. Ao se verificar o tipo de tratamento dado ao caldo, observou-se que o isolado 46 era proveniente de uma destilaria onde não se faz tratamento térmico do caldo e que os isolados 47, 49, 53 são originários de indústrias onde se faz tratamento térmico ao caldo.

Com base na literatura (TURNER e JERVIS, 1968), o aparecimento das linhagens apresentando colônias pigmentadas pode ser explicado pelo tratamento térmico ao caldo, selecionando essas linhagens coloridas.

Para os isolados números 35, 43, 44, 45, 56 e 62 (Tabela 10), as características importantes que levaram a identificação dos isolados como *Bacillus brevis* foram: bastonetes Gram positivo; esporulados, com colônias de coloração branco-acinzentadas, opacas que se espalhavam rapidamente por toda a placa, e que em meio líquido formavam película; catalase (+), VP (-), produção de ácido em glicose (+), crescimento em 7% NaCl (-), redução  $\text{NO}_3\text{-NO}_2$  (variável), hidrólise do amido (-) e hidrólise da caseína (+), sendo que representaram 14,6% dos esporulados isolados.

Como se pode observar a maior porcentagem dos isolados (71,1%) pertence ao gênero *Bacillus*, fato esperado, uma vez que estas bactérias estão amplamente distribuídas na natureza, frequentemente isoladas do solo, que é um ambiente heterogêneo e permite o desenvolvimento de muitas espécies microbianas; e apresentam a capacidade de resistir as adversidades do meio por formar esporos.

As condições peculiares de cada etapa na indústria de açúcar e álcool, como as altas temperaturas e os valores de pH irão selecionar a população bacteriana contaminante do caldo de cana favorecendo os esporulados que tem capacidade de resistir as adversidades do meio.

O isolado número 30, foi coletado em dorcas em final de fermentação, de uma destilaria que não tratava o caldo com aquecimento ou biocidas na época da coleta apresentava uma contaminação acentuada de  $1,2 \times 10^8$  bactérias/

ml nas dornas de fermentação e grande formação de gomas nas peneiras do "cush-cush" que precisava ser removida manualmente.

O histórico do isolado associado às características morfológicas e bioquímicas (Tabela 11) levou a identificação desses microrganismos contaminantes como sendo *Leuconostoc*.

O tipo de morfologia celular, cocos,  $G^+$ , usualmente aos pares, crescendo na presença de 7% NaCl e de azida de sódio, formação de polissacarídeos a partir da sacarose, não utilização de citrato, formação de ácido a partir de sacarose, glucose, frutose e lactose, leva a identificá-lo como *Leuconostoc mesenteroides* (Tabela 11).

Apesar da literatura dar grande ênfase na deterioração causada por *Leuconostoc mesenteroides*, esse microrganismo somente foi isolado de destilaria que não tratava o caldo com aquecimento e representou 1,5% das bactérias isoladas e identificadas.

De acordo com a literatura (STIRLING e WITTENBURY (1963), a sua ocorrência é de 80% das bactérias lácticas associadas às plantas e a sua capacidade de se multiplicar no caldo de cana deteriorando-o tem sido verificada (PEDERSON e HUCKER, 1946; MacCLESKEY et alii, 1947; FAVILLE, 1957; EGAN 1966; BEVAN e BOND, 1971; MacMASTER e RAVNO, 1977).

No entanto, o fator temperatura limita o aparecimento desses microrganismos na destilaria, uma vez que não foi isolado nas destilarias que fazem tratamento térmico do caldo.



Dadas as características dos isolados 27 e 28 (Tabela 12), estes foram classificados como pertencendo ao gênero *Lactobacillus* sp, sendo que representam 3% da população de bastonetes isolados.

Como se sabe, a ocorrência de *Lactobacillus* sp nas plantas representa apenas 10% das bactérias lácticas (MUNDT e HAMMER, 1968), sendo que desses, os microrganismos que podem alcançar a indústria do açúcar e álcool são as linhagens acidófilas, açúcar tolerantes como *L. confusus* (SHARPE, GARVIE e TILBURY, 1972) e ocasionalmente *L. plantarum* e *L. casei* se multiplicam no caldo deteriorando-o.

Os isolados 1, 23 e 24 (Tabela 13) foram classificados como pertencentes à família *Micrococcaceae* por serem cocos Gram positivos, catalase (+).

Os isolados 1 e 24 apresentaram colônias pequenas e de coloração creme, enquanto o isolado 23 tinha colônia com coloração bege.

Grande dificuldade foi encontrada na diferenciação dos gêneros para esses isolados. Porém, ao se comparar os resultados morfológicos e bioquímicos, para os isolados 1 e 24, com a literatura consultada, esses microrganismos estão mais relacionados com o gênero *Micrococcus* e por apresentarem coloração creme foram classificados como *Micrococcus lylyae* (SCHELEIFER, KLOOS e KOCUR, 1981), enquanto o isolado 23 que apresentou colônias bege, células com movimento, crescimento em 7% de NaCl, está mais relacionado com o gênero *Planococcus*

e, segundo KOCUR e SCHLEIFER (1981) uma maneira fácil de identificá-los é o crescimento em altas concentrações de sal (12%) e a produção de pigmento marron-amarelado.

Os isolados números 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20 apresentaram características morfológicas, microscópicas e bioquímicas (+ de 95%) idênticas, devendo-se tratar do mesmo microrganismo (Tabela 14). De acordo com o manual de Bergey, parte 10, esses bastonetes curtos (cocobacilos), Gram negativos, catalase (+), oxidase negativa; Indol; VP; descarboxilação de aminoácido, negativo; metabolismo estritamente aeróbio, movimento positivo, pertencem à família *Neisseriaceae*, gênero *Acinetobacter*, espécie *A. calcoaceticus*.

Para BERGEY (1974), a família *Neisseriaceae* apresenta 4 gêneros: *Neisseria*, *Branhamella*, *Moraxella* e *Acinetobacter*, enquanto para BØVRE e HAGEN (1981), baseados nos estudos utilizando técnicas genéticas de transformação e hibridização e técnicas de cromatografia líquido-gasosa, essa família apresenta 4 gêneros: *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Neisseria* e *Kingella*; e 2 subgêneros para *Moraxella*: *Moraxella* e *Kingella*.

Os estudos de BAUMAN, DOUDOROFF e STANIER (1968 a e b) e JUNI (1972, 1978), distinguem o gênero *Acinetobacter* de outros gêneros da família *Neisseriaceae* com base na reação de oxidase que é negativa somente para esse gênero.

A produção de ácidos a partir da glicose aerobicamente foi de grande importância para classificação desses

microrganismos, sendo os produtores de ácido considerados como linhagens de *Bacterium anitratum* ou *Herella vaginicola*, enquanto os não produtores de ácidos a partir da glicose chamados de *Moraxella lwoffi* e *Mima polymorfa* (JUNI, 1984).

Os resultados dos trabalhos de JOHSON, ANDERSON e ORDAL, 1970; JUNI (1972) utilizando técnicas genéticas, são a base para a unificação do gênero *Acinetobacter* para as bactérias anteriormente chamadas de *Bacterium anitratum*, *Cytophaga anitrata*, *C. lwoffi*, *Diplococcus mucosus*, *Herella caseolytica*, *H. saponiphylum*, *H. vaginicola*, B5W, *Micrococcus calcoaceticus*, *M. cerificans*, *Mima polymorfa*, *Moraxella glucolitica*, *M. lwoffi*, *Neisseria Winogradsky* e outras relacionadas ao gênero *Achromobacter* e *Alcaligenes*.

BØVRE et alii (1976) verificou que há uma diferenciação evolutiva dentro do gênero *Acinetobacter*, quando utilizou a técnica de transformação para o gene  $Str^r$ .

De acordo com o Subcomitê de Taxonomia de *Moraxella* e Bactérias Afins (1971), o gênero *Acinetobacter* deve incluir somente as linhagens que apresentam oxidase negativa, embora originalmente PREVOT (1954) incluía como pertencentes ao gênero bactérias oxidase positiva e negativa.

Os trabalhos de LAUTROP (1974), HENRIKSEN e BØVRE (1968, 1976) tem mostrado que *Acinetobacter*, oxidase negativo, e os microrganismos oxidase positivo pertencem ao gênero *Moraxella* e devem ser considerados gêneros da mesma família.

A especiação de *Acinetobacter* não tem sido feita pois ainda não há um critério claro que possa estabelecer diferentes espécies. BAUMANN (1968) dividiu os microrganismos pertencentes ao gênero *Acinetobacter* em vários grupos nutricionais baseado principalmente na capacidade de usar uma série de fontes de carbono, enquanto HENRIKSEN (1973) sugeriu que sejam chamados de *Acinetobacter lwoffii* aqueles microrganismos não produtores de ácidos a partir de açúcares.

De acordo com os resultados obtidos e com base na literatura consultada, esses isolados (Nºs 2 a 20) foram classificados como *Acinetobacter calcoaceticus*, sendo que o isolamento desse gênero na indústria alcooleira não é citado na literatura consultada.

A presença desses microrganismos se reveste de importância pelo fato de apresentarem capacidade de resistência e marcas nutricionais. Já foram isolados fagos líticos (HERMAN e JUNI, 1974), bem como plasmídeos já foram encontrados em muitas bactérias pertencentes ao gênero *Acinetobacter* (MURRAY e MOELLERING, 1979; HINCHLIFFE e VIVIAN, 1980), sendo que alguns plasmídeos podem ser transferidos por conjugação a partir de *Pseudomonas* para *Acinetobacter*, onde são residentes estáveis. (OLSEN e SHIPLEY, 1973). Com a utilização de plasmídeos é possível mobilizar o cromossomo de *Acinetobacter* e transferir os genes para linhagens receptoras (TOWNER e VIVIAN, 1976a), o que demonstrou que o cromossomo desses microrganismos é circular (TOWNER e VIVIAN, 1976b).

Assim, por essa capacidade de transferência de material genético para outra bactéria por conjugação, ou pela atuação de fagos líticos, a importância desse gênero na indústria alcooleira está no fato desses microrganismos terem a capacidade de apresentar resistência aos antibióticos e biocidas normalmente utilizados na indústria alcooleira e poderem transferir tais caracteres entre bactérias não resistentes e assim aumentar a população resistente levando a problemas na indústria.

## 6. CONCLUSÕES

1. Foi constatado nas destilarias que fazem o tratamento térmico do caldo uma população de bactérias constituída quase que exclusivamente por bastonetes Gram positivos esporulados (62,1%); enquanto que bastonetes Gram negativos, não esporulados foram encontrados em menor proporção (28,8%);
2. Bactéria pertencente ao gênero *Leuconostoc* foi isolada somente de amostras provenientes de destilarias que não fazem o aquecimento do caldo;
3. A diferença da população bacteriana entre as destilarias que tratam o caldo daquelas que não o fazem, como esperado, demonstra o efeito seletivo do tratamento térmico, favorecendo as bactérias esporuladas;
4. O aparecimento de colônias pigmentadas de *Bacillus megaterium* só ocorreu nas destilarias que aplicam tratamento térmico ao caldo;
5. Face ao isolamento de grande número de bastonetes esporulados, os quais se encontraram em altas concentrações

( $10^7$  bactérias/ml) nas amostras, torna-se necessário o estudo para um controle efetivo de tais bactérias;

6. O aparecimento de bactérias do tipo cocobacilo, Gram negativo, ainda não citado na literatura consultada, em quase todas as destilarias, se reveste de importância pela capacidade de produzir goma (polímeros), podendo afetar o processo fermentativo por provocar a floculação do fermento.

## 7. LITERATURA CITADA

ALFORD, J.A. e McCLESKY, C.S., 1942. Some observations on bacteria causing slime in cane juice. Proc. La Acad. Sci, 6, p.36.

ALLEN, L.A. e HARRISON, J., 1936. The characters of some celliform bacteria isolated from grass and grass silage. Ann. Appl. Biol., 23: 538-545.

ALMEIDA, J.R., 1940. Alcool e destilaria. Piracicaba. Nathanael dos Santos. Mimeogr., cap. V., p.55-85.

ALMEIDA, J.R. e LIMA, U.A., 1953. O emprego de Emulsan A.L. na fermentação alcoólica. Boletim do Inst. Zimotécnico, 6, 1-2.

ALTERTHUM, F.; MELO CRUZ, M.R.; VAINE, M.L.R. e GAMBASSI, D.M., 1984. STAB, vol. 3(1). p.

AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J. e CAMPOS, H., 1981. Infecção, problema sério na produção de álcool. Anais do 2º Congresso Nacional da Sociedade de Técnicos Açucareiros do Brasil. Vol. IV: 158-168.



- AMORIM, H.V. e OLIVEIRA, A.J., 1982. Infecção na fermentação: como evitá-la. Álcool e Açúcar, 5: 12-18.
- AQUARONE, E.; BARUFFALDI, R. e NACCO, R., 1968.— Emprego de associações de antibióticos na fabricação do álcool por fermentação. Rev. Fac. Farm. Bioquim., São Paulo, 6 (2): 257-308.
- AYALLA, H.G.; LIMPIAS, D.B.; DELFINO, A. e GARGIULO, C., 1977. ISSCT. 16th Congress, vol. 3. p.2909-2922.
- AYRES, G.C.M., 1960. Fatores físicos e químicos que influem sobre a fermentação alcoólica. In: Curso sobre fermentação alcoólica. J.R. Almeida e col., I.Z. Piracicaba. Mimeogr., vol. I: 103-118.
- BARRETO, A., 1949. Policlorofenóis em fermentação de carboidratos. Cia. Química Monsanto, US 2473. 630. C. Abst. 43(17): 6782.
- BAUMANN, P., 1968. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. J. Bacteriol., 96: 39-42.
- BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M. e STANIER, R.Y., 1968b. Study of the *Moraxella* group II. Oxidase negative species (genus *Acinetobacter*). J. Bacteriol., 95: 1520-1541.
- BERKWITH, T.D., 1931. The bacteriology of pulp slime. J. Bacteriol., 22: 15-22.
- BERGEY, D.H., 1974. Bergey's Manual of Determinative bacteriology. 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
- BERGEY, D.H., 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. Krieg, N. and Holt, J. Ed. Williams & Wilkins Baltimore. London.

- BEVAN, D. e BOND, J., 1971. Microorganisms in the field and mill - a preliminary survey. Queensland Soc. Sugar Cane Tech. Proc., 38: 137-143.
- BØVRE, K. e HAGEN, N., 1981. The Family *Neisseriaceae*: Rod-shaped-species of the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Kingella* and *Neisseria* and the *Branhamella*-group of cocci. cap.122, p.1507-1529. In: Starr, Stolp, Trupper, Ballows and Schelegel (Editors), The prokaryotes: a handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag, Berlin.
- BROWN, A.D., 1964. Aspects of bacterial response to the ionic environment. Bacterial Reviews, 28: 296-329.
- BRUIJN, J., 1966a. Deterioration of sugar cane after harvesting. Part I. Changes in juice composition. Int. Sugar J., Vol. LXVIII, p.331-334.
- BRUIJN, J., 1966b. Deterioration of sugar cane after harvesting. Part II. Investigation of the polisaccharide for med. Int. Sugar J., vol. LXVIII, p.356-358.
- BUCHANAN, R.E. e N.E. GIBBONS, 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8.ed., Willians and Wilkins Co. Baltimore. p.1246.
- CANHOS, V.P., 1980. Microorganisms isolated from sand filtered bay water and proteolytic activity of a flavobacterium isolated. Tese de Doutorado, Oregon State University, USA.
- CARRUTHERS, A. e OLDFIELD, J.F.T., 1965. The activity of thermophilic in sugar beet diffusion systems. British Sugar Corporation. 8. Proc.

- CHALMERS, C.H., 1962. Bacterial in relation to the milk supply. 4a. ed. Lond. Ec. Edwald Arnold.
- CLARK, M.A.; ROBERTS, E.J.; GODSHALL, M.A.; BRANNAN, M.A.; CARPENTER, F.G. and COLL, E.E., 1980. Sugar y Azucar, 75 (9): 64-68.
- DESONGHE, G., 1889. Traité complet de la fabrication de L' alcool et des levure. Lile, vol. II, 554-570.
- DOETSCH, R.N., 1981. Determinative methods for light microscopy. Cap. 3, p.21-33 in Manual of Methods for General Bacteriology. Ed. Gerhardt, P. American Society for Microbiology. Washington.
- DUNCAN, C.L. e COLMER, A.R., 1964. Coliforms associated with sugarcane plants and juices. Appl. Microbiol., 12 (2) : 173-177.
- EGAN, B.T. e REHBEIN, C.A., 1963. Bacterial deterioration of mechanically harvested cut lep sugar cane during storage over weekends. Proc. Q.S.S.C.T., 30th Conf. II-25.
- EGAN, B.T., 1964. Investigation into the sour storage rot problem. Proc. Q.S.S.C.T., 31st Conf., 15-26.
- EGAN, B.T., 1965a. The infection process in sour storage rot. Proc. Q.S.S.C.T. 32nd Conf., 21-24.
- EGAN, B.T., 1965b. Investigation on chemical control of sour storage rot. Proc. Q.S.S.C.T. 32 Conf., 25-30.
- EGAN, B.T., 1965c. A sour storage rot of mechanically harvested chopped upcane. Proc. I.S.S.C.T. 12th. Congress Paper nº 89.

- EGAN, B.T., 1966. Some effects of sour storage on cane juice quality. Proc. Q.S.S.C.T., 33rd. Conf. 11-20.
- EGAN, B.T., 1968b. Post-harvested deterioration-- losses in sugar cane in Queensland. Proc. 13th Cong. I.S.S.C.T. p.1729.
- EL-TABEY SHEHATA, A.M., 1960. Yeast isolated from sugar cane and its juice during the production of aguardent de cane Appl. Microbiol., 8: 73-75.
- FAVILLE, L.W., 1947. A study of gum-forming bacteria isolated from cane juice. M.S. Thesis. Louisiana State University , citação de Tilbury, 1968.
- FORT, C.A. e LAURITZEN, J.I., 1938. Estimation of degree of souring in sugar cane juice. Ind. Eng. Chem. Anal. Edn, 10: 251-253.
- FOSTER, D.H., 1969a. Sugar processing difficulties. Aust. Sugar J., 60: 529-531.
- FRASER, M.H.; REID, W.B. e MALCOLM, J.F., 1956. The occurrence of coli-aerogenes organisms on plants. J. Appl. Bacteriol., 19: 301-309.
- GAI, F., 1945. Os antissepticos na fermentação alcoólica. Bol. Soc. Bras. Agronomia, R.J., 8(4): 377-382.
- GALLI, Z.F., 1961. II Semana de fermentação alcoólica: fermentação do mel final das usinas de açúcar. Piracicaba, Instituto Zimotécnico, Vol. II, p.297-304.
- GEERLIGS, P., 1924. Cane sugar and its manufacture 2nd. ed. Normal Roger, London.

- GELDREICH, E.E.; HUFF, C.B. e BEST, L.C., 1963. Type distribution of coliform bacteria on vegetation. Bacteriol. Proc. p.11.
- GORDON, R.E.; HAYNES, W.C. e PANG, C.H.N., 1973. The genus *Bacillus*. Handbook nº 427. Washington, D.C. U.S. Department of Agriculture.
- GROSS, W.F., 1966. The problem of frozen cane in Argentine. The Sugar Journal, 1966. vol. 8, p.8-14.
- GUICHARD, P., 1896. Microbiologie du distillateur Bailliere et fils ed. Cap. X. p.261-266.
- GUPTA, A.P.; JUNEJA, I.S.; SHUKLA, S.P., 1968. Deterioration of sugar cane after harvest. 36th Annual Convention of the Sugar Technologists Association of India.
- HENRIKSEN, S.D. e BØVRE, K., 1968. The taxonomy of the genera *Moraxella* and *Neisseria*. Journal of General Microbiology, 51: 387-392.
- HENRIKSEN, S.D., 1973. *Moraxella*, *Acinetobacter* and *Mimmae*. Bacteriological Reviews, 37: 522-561.
- HINCHLIFFE, E. e VIVIAN, A., 1980. Naturally occurring plasmids in *Acinetobacter calcoaceticus*: a P class R factor of restricted host range. J. Gen. Microbiol., 116: 75-80.
- HOROWITZ-WLASSOVA, L.M., 1931. Citação de Norris e col. 1981.

- HUTCHISON, C.M. e RAMAYYAR, C.S., 1925. Loss of sugar by inversion in sugar factories in northern India and its prevention by antiseptic measures. Agr. Res. Inst. Pusa. India Bull. nº 163, p.9.
- IMMIRIE, F.K.E. e TILBURY, R.H., 1972. Polysaccharides in sugar cane and its products. Sugar Technol. Rev., 4: 291-363.
- JOHNSON, J.L.; ANDERSON, R.S. e ORDAL, E.J., 1970. Nucleic acid homologies among oxidase negative *Moraxella* species. J. Bacteriol., 101: 568-573.
- JUNI, E., 1972. Interspecies transformation of *Acinetobacter*: genetic evidence for a ubiquitous genus. J. Bacteriol., 112: 917-931.
- JUNI, E., 1978. Genetic and physiology of *Acinetobacter*. Annual Review of Microbiology, 32: 349-371.
- JUNI, E., 1984. Genus. III. *Acinetobacter* Brisou and Prévot, 1954, 727A1. in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. vol. 1. Krieg, N. and Holt, J. Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, London.
- KENERY, J.S.; LEE, J.B. e DAVIS, C.W., 1967. Deterioration of mechanically harvested chopped up cane. Part II. Rate of dextran formation. Int. Sugar J., 69: p.357-360.
- KIRKBY, L.K., 1968. Cane deterioration trial: fairy mead mill. Proc. Q.S.S.C.T. 35th Conf., 11-17.
- KITAHARA, K. e SUZUKI, J., 1963. *Sporobacillus* nov. subgen. J. Gen. Appl. Microbiol., 9(1): 59-71.

- KOCUR, M. e SCHELEIFER, K.H., 1981. The genus *Planococcus*, cap. 126, p.1570-1571. In: Starr, Solp, Trupper, Ballows and Schelegel (Editors). The Prokariotes: a handbook oh habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag, Berlin.
- KOPELOFF, N. e KOPELOFF, L., 1919. The deterioration of cane sugar by fungi. Louisiana Agric. Expt. Bull, 166. p.1-72.
- LAUTROP, H., 1974. Genus III. *Moraxella* Lwoff, 1939, 173 Genus IV. *Acinetobacter* Brison and Prevot, 1954, 727, pp. 433-438. In: Buchanan, R.E.; Gibbon, N.E. (eds). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore - Willians e Wilkins.
- LEE, J.S. e PFEIFER, D.K., 1975. Microbioal characteristics of dungness crab (*Cancer magiester*). App. Microbiol, 30: 72-78.
- LIMA, U.A.; GOLDINI, J.S.; CEREDA, M.P. e SOUZA, L.G., 1974. Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, caldo misto e água de embebição em uma usina de açúcar de cana. Brasil Açucareiro, vol. LXXXIII, 4, p.337-343.
- LUNA, J.O., 1971. Boletim Azucarero Mexicano (Agosto), p.15-19.
- MacCALIP, M.A. e HALL, H.H., 1938. Effect on cane juice and syrups of *Leuconostoc mesenteroides*. Isolated from frost damage Louisiana Sugar cane of the 1939. Crop. Proc. ISSCT 6th. Congress, p.986.
- MacCLESKEY, C.S.; FAVILLE, L.W. e BARNETT, R.O., 1947. Characteristics of *Leuconostoc mesenteroides* from cane juice. J. Bacteriol., 54: 697-708.

- MacMASTER, L.D., 1975. Thermophilic bacteria associated with sugar cane diffusion process. M.S. Thesis University of Natal. Durban.
- MacMASTER, L.D. e RAVNO, A.B., 1975. Sucrose loss in diffusion with reference to thermophilic bacteria and lactic acid. Proc. South African Sug. Tech. Assis., 49: 49-52.
- MAYEX, P.A. e COLMER, A.R., 1960. Study on microflora associated with *Saccharum officinarum*. Sugar J., 23(7): 28-30.
- MAYEX, P.A., 1960. Some studies on the microbial flora of sugar cane. Citação de Tilbury, 1968.
- MELONI, G., 1953. L'industria dell'alcole. Hoepli ed. Milano vol. II. p.246-250.
- MILLSTEIN, C.H.; TOBIN, L. e McCLESKEY, C.S., 1941. A bacteriological study of the manufacture of raw cane sugar. Sugar: J., 3(Feb.), p.13.
- MONVOISON, A., 1910. Alcool et destilarie. Octane Doin et fils ed. Paris, 442p.
- MOROZ, R., 1953. Metodos y procedimientos para el analisis de los microorganismos en el azucar in Honig, P. ed., Principles of sugar Technology, Vol. III, Chap. 8, Amsterdam: Elsevier.
- MUNDT, J.O. e HAMMER, J.L., 1968. Lactobacilli on plants. Applied Microbiology, 16: 1326-1330.



- MURRAY, B.E. e MOELLERING, R.C., 1979. Aminoglycoside - modifying enzymes among clinical isolates of *Acinetobacter calcoaceticus* subs. *anitratus* (*Herella vaginicola*): Explanation high - level aminoglycoside resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 15: 190-199.
- NEVES, L.B., 1938. Tecnologia da fabricação do álcool. Rev. Bras. Química, ed. cap. VII. p.89-134.
- NORRIS, J.; BERKELEY; R.C.W.; LOGAN, N.A. e O'DONNELL, A.G. 1981. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*, chap. 135. p.1711-1742. In: Starr, Stolp, Trupper, Ballows and Schegel (Eds.). The prokariotes: a handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Springer - Verlag. Berlin.
- OLSEN, R.H. e SHIPLEY, P., 1973. Host range and properties of the *Pseudomonas aeruginosa* R. factor R. 1822. J. Bacteriol., 113: 772-780.
- OWEN, W.L., 1911. A recently discovery bacterial decomposition of sucrose. J. Ind. Chem., 3: 481-486.
- PEDERSON, C.S., 1938. A bacteriological study of raw cane sugar plants. J. Bacteriol., 35: 74-75.
- PEDERSON, C.S. e HUCKER, G.J., 1946. The significance of bacteria in sugar mills. Proc. 20th. Meetg. Assoc. de Tech. Azucareros de Cuba, 225-230.
- PERQUIM, L.H.C., 1940. On the incidental occurrence of rod shaped, dextran-producing bacteria in a beet sugar factory. Antoine van Lecuwenhoek 6, 227-249.

- SATO, S.; BRAZZACH, M.L. e AQUARONE, E., 1980. Estudo comparativo entre vários desinfetantes para controle de contaminações nas fermentações alcoólicas e mostos de melações de cana. Rev. Farm. Bioquímica da Univ. de São Paulo, 16 (1/2): 133-144.
- SCHELEIFER, K.H.; KLOSS, W.E. e KOCUR, M., 1981. The genus *Micrococcus*. Cap. 124, p.1539-1547. In: Starr, Stolp, Trupper, Ballows and Schelegel (Eds.). *The Prokaryotes: a handbook of habitats, isolation, and identification of bacteria*. Springer-Verlag, Berlim.
- SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.; BERTOZO, M.T. e VICENTE, A.T., 1979. Contaminação da fermentação alcoólica "Floculação do Fermento". Brasil Açucareiro, vol. XCIII 6.
- SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; MENEGUIN, M.A.; PINHO, S.A.; MARINO, E.A.; FERREIRA, L.J. e BETHIOL, A.E., 1980. Controle biológico da fermentação alcoólica em condições industriais. IV SIMPOSIO INTERNACIONAL SOBRE TECNOLOGIA DOS ALCÓOIS COMO COMBUSTÍVEL. Guarujá, SP.
- SHARPE, M.E.; GARVIE, E.I. e TILBURY, R.H., 1972. Some slime-forming heterofermentative species of the genus *Lactobacillus*. Appl. Microbiol., 23(2): 389-397.
- SHARPE, E., 1981. The genus *Lactobacillus*. Chap. 31, p.1564-1679. In: Starr, Stolp, Trupper, Ballows and Schegel (Ed) *The Prokaryotes: a handbook of habits, isolation and identification of bacteria*. Springer-Verlag, Berlim.
- SILVA, M.H., 1974. Controle da inversão no caldo de cana. Sugar y Azucar, p.41.

- SKOLE, R.D.; HOGU, J.N. e RIZZATO, A.B., 1977. Microbiology of sugar: a taxonomie study. Tech. Sess. Cane Sugar Refining. Res., New Orleans.
- SMIBERT, R.M. e KRIEG, N.R., 1981. General characterization. Cap. 20, p.409-449. In: Gerhardt, P. ed. Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, Washington.
- SMITH, N.R.; GORDON, R.E. e CLARK, F.E., 1952. Aerobic spore forming bacteria. US Dept. Agric. Monograph nº 16. Washington U.S. Dept. Agriculture.
- SMITH, P.D., 1956. The use of microbiology in mill sanitation control. Proc. Jamaican Assoc. Sugar Technol., 19: 58-65.
- STARKE, J.B.; GOODBAN, A.E. e OWENS, H.S., 1952. Composition of certain diffusion juices from the 1952 Campaign. Proc. Am. Soc. Sugar Beet Technol., 688-691.
- STIRLING, A.C. e WHITTENBURY, R., 1963. Source of the lactic acid bacteria occurring in silage. Journal of Applied Bacteriology, 26: 86-90.
- TEUBER, M. e GEIS ARNOLD, 1981. The family *Streptococcaceae* (Normedical aspects). Chap. 129, 1615-1630. In: Starr, Stolp, Trupper, Ballows and Schegel (Eds). Prokaryotes: a handbook of habitats, isolation and identification of bacteria. Springer-Verlag, Berlin.
- THAYSEN, A.C. e GALLOWAY, L.D., 1930. The microbiology of starch and sugar. Oxford University Press, London, Humphrey Milford, 289.

- THOMAS, S.B. e McQUILLIN, J., 1952. Coli-aerogenes bacteria isolated from grass. Proc. Soc. Appl. Bacteriol., 15: 41-52.
- TILBURY, R.H., 1967. In: Tate and Lyle Ltd. Research Center. Annual Report for 1967.
- TILBURY, R.H., 1968. Biodeterioration of harvested sugar cane. In: Biodeterioration of materials. Walter, A.H. and Elpick J.J. Eds. Elsevier, London, p.717-730.
- TILBURY, R.H., 1970. Biodeterioration of harvested sugar cane in Jamaica. Ph.D. Thesis. Citado por Tilbury, 1975.
- TILBURY, R.H., 1971. Dextrans and dextranase. Proc. I.S.S.C.T. XIV Congress, p.1444-1459.
- TILBURY, R.G., 1975. Occurrence and effects of acid bacteria in the sugar industry. pp.177-171. In: Can, J.G.; Cutting, C.V.; Whiting, G.C. Eds. Lactic acid bacteria in beverages and foods. London, New York, San Francisco, Academic Press.
- TOWNER, K.J. e VIVIAN, A., 1976a. RP-4 mediated conjugation in *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Gen. Microbiol., 93: 355-360.
- TOWNER, K.J. e VIVIAN, A., 1976b. RP-4 fertility variants in *Acinetobacter calcoaceticus*. Gen. Res., 28: 201-306.
- TURNER, M. e JERVIS, D.I., 1968a. The distribution of pigmented *Bacillus* species in saltmarsh and other saline and non saline soil. Nova Hedwigia, 16: 293-298.

- TURNER, M. e JERVIS, D.I., 1968b. Salt tolerance in pigmented and non-pigmented strains of *Bacillus* species isolated from soil. Journal of Applied Bacteriology, 31: 373-377.
- VICKERS, R.P., 1968. The Tully area cane deterioration investigation. Proc. Q.S.S.C.T. 35th Conf., 19-29.
- WOLF, J. e BARKER, A.N., 1968. The genus *Bacillus*: Aids to the identification of its species. In: Gibbs, B.M. and Shapton, D.A. (eds.). Identification methods for microbiologists. Part B. pp.93-109. Academic Press, London.
- WOLZOGEN KUHR, C.A.H., 1923. Investigations on the microflora of normal sugar cane and of cane affected by sereh disease. Arch. Suikerend. Ned. Indië I Mededeel. Proefsta. Java-Suikerend.