UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MARINA DE TOLEDO FERRAZ DELLIAS

Comunidade bacteriana dos biofilmes da fermentação alcoólica: estrutura, composição, suscetibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilme em culturas puras

> Piracicaba 2014

MARINA DE TOLEDO FERRAZ DELLIAS

Comunidade bacteriana dos biofilmes da fermentação alcoólica: estrutura, composição, suscetibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilme em culturas puras

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Tsai Siu Mui

Piracicaba 2014 AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

> Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Dellias, Marina de Toledo Ferraz

Comunidade bacteriana dos biofilmes da fermentação alcoólica: estrutura, composição, suscetibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilme em culturas puras / Marina de Toledo Ferraz Dellias; orientadora Tsai Siu Mui. - - Piracicaba, 2014.

97 f. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Aderência celular 2. Bactérias 3. Bactérias láticas 4. Biologia molecular 5. Etanol 6. Sequência do DNA I. Título

CDU 579.864 + (604.2 : 661.722)

Aos meus pais

CELSO (in memoriam) e SÔNIA

À minha irmã

MÁRCIA

DEDICO

Ao meu marido

MARCELO

Às minhas filhas

MARIA JÚLIA e MARIA EDUARDA,

OFEREÇO

AGRADEÇO ...

... primeiramente a Deus, por estar sempre presente na minha vida.

...à minha amada família pelo inesgotável apoio, paciência, cuidados e imenso amor.

...à orientadora Profa. Dra. Tsai Siu Mui pela oportunidade, acolhimento, suporte e constante incentivo; por seus ensinamentos e exemplo profissional. Minha eterna gratidão.

...ao Dr. Mário Lúcio Lopes (Fermentec), sempre muito atencioso e pronto, por todo o apoio prestado, pelos conhecimentos transmitidos e pelas valiosas sugestões.

...à Profa. Dra. Sandra H. Cruz do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (ESALQ/USP) pelas conversas e sábios conselhos.

...ao Prof. Dr. Francisco A. O. Tanaka do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Agricultura (ESALQ/USP) pelos ensinamentos em microscopia eletrônica de varredura.

...à empresa Fermentec, especialmente ao Dr. Henrique V. Amorim, Dr. Mário Lúcio Lopes, Marcel S. Lorenzi, Juliana H. C. Nogueira e Vanessa M. Costa pela parceria neste trabalho.

...ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

...aos docentes e funcionários do Centro de Energia Nuclear na Agricultura pelo acolhimento, suporte e colaboração.

...aos técnicos do laboratório Fábio Duarte e José Elias Gomes ("ex situ") por todo o auxílio, em especial, ao técnico Wagner Picinini pela indispensável ajuda na instalação dos experimentos e nas coletas.

...às colegas Fabiana Cannavan (CENA/USP) e Camila Messetti (FOP/UNICAMP) pela prontidão no sequenciamento das amostras.

...à querida Ludmila Campos por toda ajuda, amizade, risos e descontração.

...aos queridos colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Acácio Navarrete, Aline França, Andressa Venturini, Beatriz e Clóvis Borges, Caio Yoshiura, Danielle Caldas, Dennis Goss, Enéas Konzen, Fabiana Cannavan, Fernanda Cassieri, Fernanda Nakamura, Gustavo Recchia, Lucas Mendes, Lucas Palma, Marília Reichert, e aos que já passaram por lá, Ana Carolina Zakir, Camila Heuser, Felippe Campana, Helena Macedo, Janne Louise, Lina Wong, Marcela Arnaldo, Maria Júlia Bross, Milena Araujo, Naissa Dias, Patrícia Louvandini, Rafael Della Coletta e Rosineide Souza, pelos conselhos, ajuda, carinho, amizade e agradável convivência durante esta jornada.

"O conhecimento é orgulhoso por ter aprendido tanto; a sabedoria é humilde por não saber mais"

(William Cowper | 1731 – 1800)

"A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original" (Albert Eisten | 1879 – 1955)

RESUMO

DELLIAS, M. T. F. **Comunidade bacteriana dos biofilmes da fermentação alcoólica:** estrutura, composição, suscetibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilme em culturas puras. 2014. 97 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

A produção de etanol nas destilarias brasileiras é baseada na atividade fermentativa da levedura Saccharomyces cerevisiae que utiliza o caldo da cana-de-açúcar e/ou o melaço como substrato. Bactérias contaminantes da fermentação alcoólica competem com as leveduras pelos açúcares, afetando o rendimento do sistema produtivo e, consequentemente, causando perdas econômicas significativas às usinas. Biofilmes formados nos tanques de fermentação alcoólica agem como reservatórios de bactérias, contribuindo para contaminações persistentes e de difícil controle. Os biofilmes proporcionam aos seus habitantes certo grau de proteção contra diversas ameaças do meio, incluindo a ação dos antibióticos. Desta forma, o conhecimento da comunidade bacteriana dos biofilmes é fundamental para as medidas que visam o controle das contaminações na produção do bioetanol. No primeiro estudo, a composição e dinâmica da comunidade bacteriana foram determinadas pela análise de sequências do gene 16S rRNA de biofilmes com diferentes períodos de crescimento, correspondentes aos estágios iniciais de estabelecimento destes biofilmes dentro dos tanques de fermentação alcóolica Os resultados mostraram que estas comunidades foram compostas predominantemente pelas bactérias ácido-lácticas (LAB), com destaque para o gênero Lactobacillus. A visualização da estrutura dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura evidenciou que estes são formados por bactérias e leveduras (biofilmes mistos). No segundo estudo, a suscetibilidade aos antimicrobianos (monensina, virginiamicina e betaácido derivado do lúpulo) e a capacidade de formação de biofilmes em culturas puras foram avaliadas para isolados de Lactobacillus spp. provenientes de biofilmes (células sésseis) e de vinho bruto (células planctônicas) coletados dos tanques de fermentação. A partir dos resultados foi possível observar que as diferenças na suscetibilidade aos antimicrobianos e na habilidade de formar biofilmes foram estirpe-dependentes e que, em alguns casos, o perfil apresentado para algumas espécies mostrou-se relacionado à fonte de isolamento. Este foi o primeiro estudo sobre biofilmes contaminantes da fermentação alcoólica, em escala industrial, para a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Contaminação bacteriana. Bioetanol. Gene 16S rRNA. Bactérias ácidolácticas (LAB). *Lactobacillus*. Sensibilidade aos antimicrobianos. TSA.

ABSTRACT

DELLIAS, M. T. F. **Bacterial community of biofilms from alcoholic fermentation:** structure, composition, susceptibility to antimicrobials and biofilm formation in pure cultures. 2014. 97 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

Bioethanol production in Brazilian distilleries is based on fermentative activity of the yeast Saccharomyces cerevisiae which uses sugarcane juice and/or molasses as a substrate. Bacterial contaminants of alcoholic fermentation compete with yeasts for sugars, affecting ethanol yield and consequently causing relevant economic losses to the fuel ethanol industry. Biofilms formed into fermentors act as bacterial reservoirs, contributing to persistent contaminations that are difficult to control. Biofilms provide a certain degree of protection for their inhabitants against some environmental threats, including antibiotics. Thus, understanding bacterial community within biofilms is essential for actions to control contaminations in bioethanol production. In the first study, composition and dynamic of bacterial community were determined by 16S rRNA gene sequences analysis of biofilms with different growth periods, corresponding to initial stages of biofilm establishment in fermentation tanks. Results showed that these communities were dominated by lactic acid bacteria (LAB), mainly of the genus Lactobacillus. Visualization of biofilm structure by scanning electron microscopy revealed a mixed-species biofilm composed by bacteria and yeasts. In the second study, susceptibility to antimicrobials (monensina, virginiamicina and beta-acids from hops) and capacity to form biofilm in pure culture were evaluated for Lactobacillus spp. isolated from biofilms (sessile cells) and wine (planktonic cells) collected from fermentors. The results showed that differences in the susceptibility to antimicrobials and the ability to form biofilms were strain-specific and, in certain cases, the response of some species was related to the isolation source. This was the first investigation of contaminant biofilms from sugarcane-based alcoholic fermentation on an industrial scale.

Keywords: Bacterial contamination. Bioethanol. 16S rRNA gene. Lactic acid bacteria (LAB). *Lactobacillus*. Antimicrobial sensitivity. AST.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	. 1
1.1 Revisão da literatura]
1.1.1 Cana-de-açúcar e produção de etanol	1
1.1.2 Bactérias contaminantes da fermentação alcoólica	1
1.1.3 Biofilmes microbianos	
REFERÊNCIAS	2
2 ESTRUTURA COMPOSIÇÃO E DINÂMICA DA COMUNIDADE BACTERIAN	Δ
DE BIOFII MES CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	
Resumo	··· 2
Abstract	··
2.1 Introducão	
2.2 Hipótese	
2.3 Objetivos	
2.3.1 Objetivo geral	
2.3.2 Objetivos específicos	
2.4 Material e métodos	
2.4.1 Coleta das amostras	
2.4.2 Extração de DNA total dos biofilmes	
2.4.3 Amplificação por PCR do gene 16S rRNA de bactéria	
2.4.4 Construção das bibliotecas de clones do gene 16S rRNA e sequenciamento	
2.4.5 Análise das sequências e relações filogenéticas	
2.4.6 Observação da estrutura dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura	
2.4.7 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	
2.4.7.1 Quantificação do gene 16S rRNA de bactéria	•
2.4.7.2 Quantificação do gene 18S rRNA de fungo	
2.5 Resultados	
2.5.1 Composição da comunidade bacteriana dos biofilmes e relações filogenéticas	
2.5.2 Estrutura dos biofilmes	
2.6 Discussão	
2.7 Conclusão	
Referências	

3	SUSCETIE	BILID	ADE	AOS	ANTIN	IICROBIANOS	S E	CAPACIDADE	DE
FC	RMAÇÃO	DE	BIOF	FILMES	POR	BACTÉRIAS	CO	NTAMINANTES	DA
FE	RMENTAÇ	ÃO A	LCOĆ	DLICA					
Re	sumo								
Ał	stract								
3.1	Introdução								
3.2	Hipótese								
3.3	Objetivos								
3.3	.1 Objetivo	geral.							
3.3	.2 Objetivos	espec	cíficos						
3.4	Material e 1	nétodo	os						
3.4	.1 Coleta da	s amo	stras						
3.4	.2 Isolament	to, pur	rificaçã	io e pres	ervação	das culturas ba	cteria	nas	
3.4	.3 Extração	de DN	IA tota	ıl					
3.4	.4 Identifica	ção da	as bact	érias por	sequen	ciamento	•••••		
3.4	.5 Teste de S	Suscet	ibilida	de aos A	ntimicr	obianos (TSA)			
3.4	.6 Ensaio de	form	ação d	e biofiln	ie				
3.5	Resultados	•••••							
3.5	5.1 Identifica	ção da	as bact	érias iso	ladas do	biofilme e vin	ho bru	to	
3.5	5.2 Teste de S	Suscet	ibilida	de aos A	ntimicr	obianos			
3.5	5.3 Capacida	de de :	formaç	ão de bi	ofilme e	em cultura pura			
3.6	Discussão .								
3.7	' Conclusão								
Re	ferências								

ANEXOS

1 INTRODUÇÃO

Preocupações com questões relacionadas ao esgotamento das fontes de petróleo e ao aquecimento global provocado pelo aumento das emissões de gases de efeito estufa têm gerado o interesse de diversos países na substituição dos combustíveis fósseis por biocombustíveis. O etanol, fonte renovável de energia, tem sido uma alternativa mais limpa e menos agressiva ao ambiente quando comparado com a gasolina (PIACENTE, 2006).

A demanda mundial por etanol tem se expandido de forma muito rápida, principalmente nos países mais desenvolvidos e naqueles com grande consumo de combustíveis automotivos (PIACENTE, 2006). Para atender a crescente demanda dos mercados nacional e internacional, as indústrias trabalham por um aumento da eficiência e capacidade produtiva do etanol (SOUZA, 2006).

Atualmente, os principais desafios científicos da produção brasileira de bioetanol são: introdução de novas matérias-primas que apresentem um balanço energético positivo e que atendam os critérios de sustentabilidade ambiental, produção de etanol a partir do bagaço (etanol de segunda geração), seleção de novas linhagens de leveduras mais adaptadas às condições adversas da fermentação industrial, redução do volume de vinhaça e prevenção/controle das contaminações microbianas (AMORIM et al., 2011).

As contaminações microbianas da fermentação industrial são causadas pelas bactérias e leveduras selvagens (pertencentes ou não ao gênero *Saccharomyces*). As leveduras selvagens, além de competirem pelos nutrientes do meio, muitas vezes apresentam características fermentativas indesejáveis como floculação, formação excessiva de espuma, baixo rendimento fermentativo ou fermentação incompleta dos açúcares (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009). As contaminações bacterianas, ocasionadas principalmente por *Lactobacillus*, são consideradas a principal causa na queda do rendimento e produtividade do etanol (AMORIM; BASSO; LOPES, 2004).

Bactérias formadoras de biofilmes que habitam os tanques de fermentação alcoólica para a produção de etanol a partir do milho têm sido associadas às contaminações persistentes e de difícil controle nas destilarias americanas (SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2007), uma vez que os biofilmes geralmente são considerados mais resistentes aos procedimentos de limpeza e desinfecção (YANG et al., 2012). Campana (2012) foi o pioneiro em estimar, através da técnica de T-RFLP, a composição da comunidade bacteriana de biofilmes formados durante o processo de uma fermentação de alto teor alcoólico (em torno de 16%), em escala piloto, para a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. O autor

sugere que os biofilmes têm uma participação direta e de destaque na reintrodução dos contaminantes nas dornas de fermentação, já que estes alojam os micro-organismos permitindo sua permanência no sistema por várias etapas da fermentação.

Considerando a importância do conhecimento das bactérias presentes nos biofilmes para as ações de prevenção e controle das contaminações, estudos sobre biofilmes contaminantes da fermentação alcoólica em escala industrial (teor alcoólico em torno de 9%) se tornam fundamentais. O Estudo 1 desta tese procurou investigar, temporalmente, a composição das comunidades bacterianas nos estágios iniciais de estabelecimento destes biofilmes, assim como visualizar sua estrutura em cada um destes períodos. O Estudo 2 foi desenvolvido para verificar se a fonte de isolamento das bactérias contaminantes, ou seja, biofilme e vinho bruto, poderia influenciar no perfil apresentado para a sensibilidade aos principais antimicrobianos industriais e capacidade de formação de biofilmes em cultura pura.

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Cana-de-açúcar e produção de etanol

O complexo agroindustrial canavieiro compõe a mais antiga atividade econômica do Brasil (PIACENTE, 2006). O cultivo da cana-de-açúcar acompanhou toda a história brasileira, com relatos da produção de açúcar em 1532 quando os portugueses trouxeram as primeiras mudas desta planta. Além do destaque como produtor de açúcar, o Brasil também ocupa um lugar de evidência como o primeiro país a produzir e a fazer uso de um biocombustível na sua frota de veículos automotores (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006).

A produção de etanol nas destilarias brasileiras ocorre através do processo de fermentação alcoólica realizado, em condições de anaerobiose, pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* que utiliza o caldo da cana-de-açúcar e/ou o melaço como substrato (SILVA-FILHO et al., 2005). Durante a fermentação alcoólica, a glicose é convertida em ATP e ácido pirúvico, que por sua vez é convertido em CO₂ e acetaldeído, sendo este último reduzido em etanol (MOREIRA, 2009).

Fatores que consagram *Saccharomyces cerevisiae* como um micro-organismo indicado para a condução de um processo de produção de etanol são a rápida transformação dos açúcares em etanol e a alta tolerância ao baixo pH, à altas concentrações de açúcar e álcool, e à grandes variações de temperatura (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006; NEVOIGT, 2008).

A produção brasileira de bioetanol é caracterizada por fermentações industriais que ocorrem em grandes fermentadores (0,5 a 3 milhões de litros) nos quais são adicionadas altas densidades de leveduras (10 a 15% p/v) e mosto preparado com caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço (AMORIM et al., 2011). Ao final do processo, com duração de 6 a 12 horas, a concentração de álcool atinge 7 a 11% (v/v) e o mosto fermentado é centrifugado para a separação do levedo e do vinho, sendo este último encaminhado para a destilação. O levedo concentrado recebe um tratamento com ácido sulfúrico (pH 2,0 a 2,5) por 2 a 3 horas, visando a redução da contaminação bacteriana para, em seguida, retornar aos tanques de fermentação e reiniciar um novo ciclo fermentativo (Figura 1) (AMORIM et al., 2011; WHEALS, et al., 1999). Este processo, denominado Melle-Boinot, é realizado por um período de 200 a 300 dias, dependendo da região de plantio, condições climáticas, variedade da cana e demanda do mercado. O reciclo das leveduras é feito de 400 a 600 vezes durante o período de safra da cana-de-açúcar que ocorre de abril a novembro no centro-sul do Brasil, ou de setembro a março no nordeste brasileiro (AMORIM et al., 2011).



Figura 1 – Ilustração simplificada das etapas da produção brasileira de bioetanol (modificado de AMORIM et al., 2011).

1.1.2 Bactérias contaminantes da fermentação alcoólica

Grande parte da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica tem sua origem na lavoura, tanto pela qualidade da cana-de-açúcar, como pelo solo aderido à planta que acaba sendo carregado para a indústria (AMORIM et al., 2000). Alguns fatores que podem favorecer as contaminações da matéria-prima são: injúrias na planta, variedade da cana-deaçúcar, tempo entre colheita e moagem, condições de armazenamento, temperatura e umidade do ar (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; EGGLESTON; MOREL DU BOIL; WALFORD, 1999).

O caldo da cana-de-açúcar é um ótimo substrato para o crescimento dos microorganismos devido aos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água e pH favorável (GALLO, 1990). Além do caldo, as bactérias também são encontradas em diferentes amostras do processo como melaço, mosto, levedo, levedo tratado com ácido sulfúrico, vinho bruto, vinho delevedurado (CAMPANA, 2012; GALLO, 1990; ROSALES, 1989) ou ainda, aderidas às centrífugas, trocadores de calor, dornas de fermentação e tubulações (CAMPANA, 2012). A própria etapa de recuperação do fermento através da centrifugação, para sua reutilização nos demais ciclos fermentativos, torna-se um agravante das contaminações uma vez que as bactérias são recicladas juntamente com as leveduras (AMORIM et al., 2011). Segundo Oliva-Neto e Yokoya (1994), o processo de reciclo de células pode estimular o crescimento bacteriano devido à disponibilidade de aminoácidos oriundos das células mortas de leveduras.

Os problemas causados pelas contaminações levam à redução do rendimento e produtividade do etanol (AMORIM; OLIVEIRA, 1982). As bactérias competem diretamente com as leveduras pelos açúcares e nutrientes do meio (NARENDRANATH et al., 1997), convertendo os açúcares em ácidos orgânicos ao invés de etanol (MOREIRA et al., 2009). Além disto, aos ácidos produzidos acabam reduzindo o pH do meio, promovendo uma queda na viabilidade das leveduras (CHERUBIN, 2003; NOBRE; HORII; ALCARDE, 2007; OLIVA-NETO; YOKOYA, 1994). Ainda, a presença dos contaminantes induz a floculação das leveduras, levando ao assentamento das células no fundo das dornas e diminuição da eficiência das centrifugações (LUDWIG; OLIVA-NETO, ANGELIS, 2001; SOUZA; MUTTON, 2004).

Os principais contaminantes da fermentação alcoólica são as bactérias produtoras de ácido láctico (*Lactic Acid Bacteria* - LAB), representadas pelos gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus, Enterococcus, Lactococcus, Pediococcus, Oenococcus, Leuconostoc* e *Weissella* (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; CAMPANA, 2012; GALLO, 1990; LUCENA et al., 2010; ROSALES, 1989). A acidez, temperatura e ambiente anaeróbio da fermentação, combinados com uma abundância de açúcares fermentáveis, proporcionam as condições ótimas de crescimento para as LAB (LUSHIA; HEIST, 2005).

As espécies de LAB são agrupadas com base no seu padrão fermentativo, sendo algumas produtoras somente de ácido láctico (homofermentativas) ou, também, ácido acético, etanol, glicerol e dióxido de carbono (heterofermentativas) (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011). Segundo Basso e colaboradores (2014), estes padrões fermentativos parecem afetar, de forma distinta, a fermentação alcoólica para o processo de produção de etanol. A espécie homofermentativa *Lactobacillus plantarum* mostrou-se mais prejudicial à levedura industrial quando comparada com a espécie heterofermentativa *L. fermentum* no que se refere à redução da viabilidade da levedura e produção de etanol. Porém, este fato só pode ser observado quando bactérias e leveduras foram co-cultivadas com densidades celulares equivalentes. Numa simulação das condições industriais, em que a alta densidade de leveduras e períodos curtos de fermentação prevalecem, a estirpe heterofermentativa foi mais deletéria, causando redução no rendimento do etanol e maior produção de glicerol.

Dentro do grupo das LAB, o gênero *Lactobacillus* é o mais problemático para a indústria do bioetanol, sendo este predominante na maioria das contaminações encontradas nas destilarias brasileiras (CAMPANA, 2012; GALLO, 1990; LUCENA et al., 2010; ROSALES, 1989) e nas destilarias americanas (G-ALEGRIA et al., 2004; LUSHIA; HEIST, 2005; SKINNER; LEATHERS, 2004). Algumas espécies de *Lactobacillus* possuem um alto nível de tolerância ao etanol e rápida taxa de crescimento, contribuindo para uma competição bem sucedida no ambiente fermentativo (GOLD, 1992; NARENDRANATH et al., 1997).

Outros gêneros comumente encontrados que não pertencem ao grupo das LAB são: Bacillus, Acetobacter, Enterobacter, Staphylococcus, Clostridium, Aerobacter, Micrococcus, Pseudomonas e Citrobacter, dentre outros (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; CAMPANA, 2012; GALLO, 1990; LUCENA et al., 2010; ROSALES, 1989).

O controle do crescimento bacteriano nas destilarias normalmente é feito pela lavagem das células de levedura com ácido sulfúrico, durante o reciclo do fermento. Em alguns casos, este processo é amparado pela adição, no mosto, de biocidas químicos (carbamatos, quaternários de amônio, fenóis halogenados, dióxido de cloro), antibióticos (penicilina, virginiamicina, monensina) e antimicrobianos naturais (alfa e beta-ácidos derivados do lúpulo) (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009; MENEGHIN et al., 2008; OLIVA-NETO, YOKOYA, 2001; STROPPA, 1998).

1.1.3 Biofilmes microbianos

Na maioria dos ambientes, o modo de vida microbiana prevalecente é em associação a uma superfície, em uma estrutura conhecida como biofilme, sendo uma forma eficiente de permanecer em um microambiente favorável, ao invés de ficar à deriva em uma vida planctônica (WATNICK; KOLTER, 2000). A formação de biofilmes gera uma comunidade de células protegidas e encapsuladas onde os estresses ambientais de natureza química, física e biológica são grandemente reduzidos quando comparados aos das células em suspensão (ANWAR et al., 1992). Além disto, tem sido demonstrado que as trocas genéticas entre os micro-organismos são facilitadas em um biofilme, evidenciando seu importante papel na evolução microbiana (McLEAN, 2002).

Os biofilmes podem ser formados por populações desenvolvidas a partir de uma ou múltiplas espécies, podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas. A dinâmica de formação de um biofilme ocorre em distintas etapas (Figura 2). Inicialmente, os micro-organismos (denominados primários) aderem a uma superfície, geralmente condicionada com traços orgânicos, através de forças de Van der Walls, interações eletrostáticas e de hidrofobicidade, e forças hidrodinâmicas. Em seguida, as células aderidas passam a se desenvolver (microcolônias), consolidando o processo de adesão pela síntese de uma matriz de exopolissacarídeo; nesta etapa, a adesão é irreversível. Esta matriz favorece a aderência de outros micro-organismos planctônicos (colonizadores secundários), formando agregados no substrato (DUNNE, 2002).



Figura 2 – Ilustração das etapas de desenvolvimento dos biofilmes. 1) Adesão; 2) Crescimento;
3) Dispersão. Imagem cedida pelo Centro de Engenharia de Biofilme da Universidade Estadual de Montana, Bozeman, E.U.A.

Nas últimas três décadas, foi reconhecido que as bactérias têm a habilidade de perceber sinais químicos de organismos ao redor e a capacidade de formar comunidades nas quais seus membros interagem entre si. Esta interação pode ser intra e/ou interespecífica ou ainda entre reinos. A comunicação intercelular entre bactérias é geralmente feita por produtos bacterianos capazes de se difundir de uma célula para outra. A liberação de sinais químicos conhecidos como auto-indutores permitem às bactérias perceberem a densidade da população local e coordenarem a expressão de genes. Este mecanismo é conhecido como *quorum-sensing* (NJOROGE; SPERANDIO, 2009).

As sinalizações do mecanismo de *quorum-sensing* têm se mostrado fundamentais no desenvolvimento de biofilmes (DAVIES et al., 1998). Quando o ambiente cessa a capacidade de suportar a densidade da população bacteriana, é favorecida a dissociação de células individuais de um biofilme para a procura de habitats mais favoráveis (DUNNE, 2002).

Bactérias que crescem em um biofilme apresentam uma reduzida suscetibilidade aos antibióticos, contribuindo para infecções crônicas (ANWAR; DASGUPTA; COSTERTON, 1990; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; STEWART, 2002). Os mecanismos de proteção dos biofilmes se devem a uma combinação de fatores e parece ser distinto daqueles responsáveis pela resistência convencional aos antibióticos (STEWART, 2002). Uma hipótese é a falha na penetração do agente antimicrobiano ao longo do biofilme. Davenport, Call e Beyenal (2014) demonstraram que as substâncias poliméricas extracelulares que compõem a matriz dos biofilmes podem limitar a difusão do antibiótico dependendo da espécie bacteriana avaliada. Outra hipótese é a limitação de oxigênio e a baixa atividade metabólica no interior dos biofilmes, como determinado para biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* tolerantes aos antibióticos ciprofloxacina e tobramicina (WALTER et al., 2003). Ainda, a limitação de nutrientes, resposta adaptativa ao estresse e maior frequência de células persistentes (dormentes) tem sido sugerido como fatores que diminuem a sensibilidade dos biofilmes aos antimicrobianos (STEWART, 2002).

Skinner-Nemec e colaboradores (2007) foram os primeiros a avaliar a capacidade de formação de biofilmes *in vitro* por bactérias contaminantes da produção de etanol nos E.U.A. Análises fenotípicas e de sequenciamento mostraram que as espécies presentes nos biofilmes foram semelhantes àquelas encontradas nas amostras líquidas dos tanques de fermentação, ou seja, a diversidade de espécies no biofilme refletiu o inóculo. Neste caso, os biofilmes foram predominantemente compostos por bactérias ácido-lácticas, em sua maioria por *Lactobacillus*.

Apesar dos problemas causados pelos biofilmes, pouco se sabe sobre os biofilmes formados nas dornas industriais de fermentação alcoólica das destilarias brasileiras.

REFERÊNCIAS

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Evolution of ethanol fermentation in Brazil. In: BRYCE, J. H.; STEWART, G. G. (Ed.). **Distilled spirits**: tradition and innovation. v. 1, 1. ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2004. cap. 20, p. 143-146.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, D. R.; AUSTIN, G. D.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries. v. 1. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. cap. 5, p. 39–46.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. D.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 91, p. 1267-1275, 2011.

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

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; SILVA, L. F. L.; BERNARDINO, C.; GODOY, A.; ALVES, D. M. G. Impact of sugar cane quality on sugar and alcohol yields. **International Sugar Journal**, London, v. 102, n. 1214, p. 86-88, 2000.

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. MultiCiência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP, Campinas, v. 7, p. 1-16, 2006.

ANWAR, H.; STRAP, J. L.; COSTERTON, J. W. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, v. 36, n. 7, p. 1347-1351, 1992.

ANWAR, H.; DASGUPTA, M. K.; COSTERTON, J. W. Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 34, n. 11, p. 2043-2046, 1990.

BASSO, T. O.; GOMES, F. S.; LOPES, M. L.; AMORIM, H. V.; EGGLESTON, G.; BASSO, L. C. Homo- and heterofermentative lactobacilli differently affect sugarcane-based fuel ethanol fermentation. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 105, p. 169–177, 2014.

CAMPANA, F. B. **Monitoramento temporal e espacial de contaminações bacterianas na produção de bioetanol**: caracterização molecular por T-RFLP e detecção quantitativa por qPCR de comunidades formadoras de biofilmes. 2012. 170 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 2003. 124 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, Washington, DC, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

DAVENPORT, E. K.; CALL, D. R.; BEYENALL, H. Differential protection from tobramycin by extracellular polymeric substances from *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 58, n. 8, p. 4755-4761, 2014.

DAVIES, D. G.; PARSEK, M. R.; PEARSON, J. P.; IGLEWSKI, B. H.; COSTERTON, J. W.; GREENBERG, E. P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, Washington, DC, v. 280, p. 295-298, 1998.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

G-ALEGRÍA, E.; LÓPEZ, I.; RUIZ, J. I.; SÁENZ, J.; FERNÁNDEZ, E.; ZARAZAGA, M.; DIZY, M.; TORRES, C.; RUIZ-LARREA, F. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 230, p. 53-61, 2004.

GALLO, C. R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. 1990. 388 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

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

EGGLESTON, G.; MOREL DU BOIL, P. G.; WALFORD, S. N. A review of sugarcane deterioration in the United States and South Africa. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 81, p. 72-85, 2008.

LUCENA, B. T. L.; DOS SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L. S.; MOREIRA, A. P. B.; NUNES, A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F. L.; MORAIS, M. A. Diversity of latic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, London, v. 10, p. 298-305, 2010.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; DE ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 63-68, 2001.

LUSHIA, W.; HEIST, P. Antibiotic resistant bacteria in fuel ethanol fermentations. Ethanol Producer Magazine, Grand Forks, p. 80–82, 2005.

McLEAN, R. J. C. An overview of biofilm molecular ecology. In: McLEAN, R. J. C.; DECHO, A. W. (Ed.). Molecular ecology of biofilms. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2002. cap. 1, p. 1-21.

MENEGHIN, S. P.; REIS, F. C.; ALMEIDA, P. G.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Chlorine dioxide against bacteria and yeasts from the alcoholic fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 39, p. 337-343, 2008.

MOREIRA, A. L.; ALMEIDA, W. S.; SCABBIA, R. J. A; TEIXEIRA, R. R. P. Dosagem de ácido lático na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. **O Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 1, p. 69-76, 2009.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 37, p. 351-370, 2011.

NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 4158-4163, 1997.

NEVOIGT, E. Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, DC, v. 72, n. 3, p. 379–412, 2008.

NJOROGE, J.; SPERANDIO, V. Jamming bacterial communication: new approaches for the treatment of infectious diseases. **EMBO Molecular Medicine**, Chichester, v. 1, p. 201-210, 2009.

NOBRE, T. P.; HORII, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 20-25, 2007.

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

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 10-14, 2001.

PIACENTE, E. A. **Perspectivas do Brasil no mercado internacional de etanol.** 2006. 173 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento de Sistemas Energéticos) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

ROSALES, S. Y. R. **Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica**: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfectantes. 1989. 200 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1989.

SILVA-FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; MONTE RESENDE, A.; MORAIS, J. O. F.; MORAIS JUNIOR, M. A.; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuelethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 88, p. 13-23, 2005. SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Hampshire, v. 31, p. 401–408, 2004.

SKINNER-NEMEC, K. A.; NICHOLS, N. N.; LEATHERS, T. D. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 29, p. 379–383, 2007.

SOUZA, R. R. **Panorama, oportunidades e desafios para o mercado mundial do álcool automotivo.** 2006. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Planejamento Energético) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

SOUZA, M. A. C.; MUTTON, M. J. R. Floculação de leveduras por *Lactobacillus fermentum* em processos industriais de fermentação alcoólica avaliada por técnica fotométrica. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 893-898, 2004.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. International Journal of Medical Microbiology, Amsterdam, v. 292, p. 107-113, 2002.

STROPPA, C. T. Avaliação da ação de antibióticos utilizados na fermentação alcoólica através do consumo de açúcar por bactérias contaminantes. 1998. 71 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

WALTER, M. C.; ROE, F.; BUGNICOURT, A.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 47, n. 1, p. 317-323, 2003.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. Journal of Bacteriology, Washington, DC, v. 182, n. 10, p. 2675–2679, 2000.

WHEALS A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 17, p. 482-487, 1999.

YANG, L.; LIU, Y.; WU, H.; SONG, Z.; HOIBY, N.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Combating biofilms. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 65, p. 146–157, 2012.

2 ESTRUTURA, COMPOSIÇÃO E DINÂMICA DA COMUNIDADE BACTERIANA DE BIOFILMES CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Resumo

No presente estudo, a composição e a dinâmica da comunidade bacteriana de biofilmes coletados após 7, 14 e 21 dias de crescimento dentro de tangues de fermentação alcóolica foram determinadas, em dois anos consecutivos, através das análises das bibliotecas de clones do gene 16S rRNA. Neste contexto, biofilmes provenientes de dois tipos de fermentação foram avaliados separadamente: fermentação industrial (com teor alcoólico em torno de 9%) e fermentação de uma unidade piloto (com teor alcoólico entre 11 e 16%). De um modo geral, observou-se a predominância de clones afiliados ao grupo das bactérias ácido-lácticas (LAB), com destaque para Lactobacillus. Outros gêneros pertencentes ao grupo das LAB encontrados foram: Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Streptococcus e Weissella. Os biofilmes com 7 dias apresentaram um maior número de gêneros enquanto que os biofilmes mais velhos (21 dias) apresentaram um maior número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) relacionadas aos Lactobacillus, reforçando o fato de que bactérias deste gênero são altamente adaptadas ao processo de fermentação alcoólica. Na fermentação industrial, as UTOs que se destacaram pela persistência, ou seja, estiveram presentes em todos os períodos avaliados, foram aquelas relacionadas a L. casei, L. fermentum, L. vini e L. amylovorus. Na fermentação piloto, a única UTO presente em todas as amostras foi a afiliada a L. casei. A onipresença de L. casei neste trabalho sugere a importância desta espécie na formação dos biofilmes, independentemente do seu tempo de crescimento ou das condições de fermentação. Várias UTOs (28,9%) apresentaram menos de 96% de identidade com outras sequências depositadas no GenBank (NCBI), muitas delas afiliadas ao gênero Lactobacillus, indicando que muitas espécies que habitam as dornas de fermentação ainda não foram identificadas. Análises de microscopia eletrônica de varredura permitiram a visualização da estrutura dos biofilmes, compostos por leveduras e bactérias (biofilmes mistos). Para as amostras da fermentação industrial do segundo ano de coleta foram feitas quantificações dos genes 16S rRNA (bactéria) e 18S rRNA (fungo) por PCR em tempo real, nas quais amostras de biofilmes maduros (120 dias) foram incluídas para efeito comparativo. Os resultados mostraram um aumento expressivo da população bacteriana nos biofilmes maduros, enquanto que a população de leveduras foi maior nos biofilmes com 21 dias. Este foi o primeiro estudo a caracterizar os biofilmes contaminantes da fermentação alcoólica em escala industrial para a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: contaminação bacteriana, bioetanol, gene 16S rRNA, *Lactobacillus*, bactérias ácido-lácticas (LAB).

2 STRUCTURE, COMPOSITION AND DYNAMIC OF BACTERIAL COMMUNITY IN BIOFILMS CONTAMINANTS OF ETHANOL FERMENTATIONS

Abstract

In this study, composition and dynamic of bacteria community within biofilms collected after 7, 14 and 21 days of growth in fermentors for alcoholic fermentation were determined, for two consecutive years, by 16S rRNA gene clone libraries analysis. In this context, biofilms from two types of fermentation were evaluated: industrial fermentation (with alcoholic content around 9%) and fermentation of a pilot unit (with alcoholic content between 11 and 16%). The majority of clones were affiliated to Lactic Acid Bacteria (LAB), especially to Lactobacillus. Other LAB genera also found were: Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Streptococcus and Weissella. Biofilms with 7 days showed the highest number of genera while oldest biofilms (21 days) showed the highest numbers of operational taxonomic units (OTUs) related to Lactobacillus, confirming that bacteria of this genus are highly adapted to alcoholic fermentation. In industrial fermentation, the persistent OTUs (found in all period evaluated) were affiliated to L. casei, L. fermentum, L. vini and L. amylovorus. In a pilot fermentation, the only OTU found in all samples was affiliated to L. casei. The ubiquity of L. casei in this work suggests the importance of this species in biofilm formation, regardless of growth period or fermentation conditions. Several OTUs (28.9%) showed less than 96% of identity with other sequences found in GenBank (NCBI), some of them belonging to Lactobacillus, indicating that many species that inhabit fermentation tanks have not yet been identified. Scanning electron microscopy analysis allowed the observation of biofilms structure, composed by yeasts and bacteria (mixed-species biofilms). For industrial fermentation samples of the second year, 16S rRNA (bacteria) and 18S rRNA (fungi) genes were quantified by real-time PCR, wherein samples of mature biofilms (120 days) were included for comparative purposes. Quantitation results revealed a significant increase in bacterial population of mature biofilms while yeast population was higher in biofilms with 21 days. This was the first survey to characterize contaminant biofilms of sugarcane-based alcoholic fermentation for fuel ethanol production on a large scale.

Keywords: bacterial contamination, bioethanol, 16S rRNA gene, *Lactobacillus*, Lactic Acid Bacteria (LAB).

2.1 Introdução

Os produtores de bioetanol estão, atualmente, envolvidos com uma variedade de inovações tecnológicas para reduzir o consumo de energia e os custos da produção, assim como aumentar a eficiência na obtenção de etanol (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011). No entanto, neste processo de ampliação da produção, estimulado pela crescente demanda do mercado, a contaminação bacteriana acaba sendo um dos maiores entraves para a indústria do álcool (MUTHAIYAN; RICKE, 2010).

Devido as características não-assépticas do processo, uma vez que a esterilização de grandes volumes de caldo e água não são economicamente viáveis, e do sucessivo reciclo das leveduras, os micro-organismos contaminantes que entram no processo acabam permanecendo no ambiente da fermentação alcoólica, mostrando diferentes estratégias de sobrevivência e competição. Além de consumirem o açúcar destinado à formação do etanol, os contaminantes e seus metabólitos têm efeitos negativos no desempenho fermentativo das leveduras (AMORIM et al., 2011).

Entre os principais contaminantes da fermentação alcoólica estão as bactérias ácidolácticas (LAB) pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella* (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; CAMPANA, 2012; GALLO, 1990; LUCENA et al., 2010; ROSALES, 1989).

As populações bacterianas são normalmente controladas com o tratamento ácido durante o reciclo das leveduras e, algumas vezes, com a aplicação no mosto de antibióticos industriais como a monensina e a virginiamicina, produtos derivados do lúpulo (alfa e betaácidos) ou biocidas químicos (dióxido de cloro, por exemplo) (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009). Entretanto, contaminações de até 10⁵ UFC/ml no vinho bruto são consideradas aceitáveis devido à inviabilidade econômica das ações para reduzir este nível (ALCARDE; WALDER; HORII, 2003).

Uma vez que os processos industriais estão sujeitos à contaminação bacteriana, pode ocorrer também a formação de biofilmes. Foi demonstrado que bactérias contaminantes de fermentadores que utilizam o milho como substrato são capazes de formar biofilmes em condições laboratoriais (SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2007). Os biofilmes são ecossistemas microbianos complexos aderidos às superfícies, compostos por uma ou múltiplas espécies, envolvidos por uma matriz polimérica secretada constituída principalmente de exopolissacarídeo (McLEAN, 2002). Os estágios de desenvolvimento do biofilme são: transporte para a superfície, adesão reversível, adesão irreversível, maturação e

perda de agregados (dispersão) (DAVIES, 2002). Alguns biofilmes apresentam uma estrutura caracterizada por microcolônias (agrupamento de micro-organismos) unidas pela matriz polimérica e rodeados por uma rede de canais que permitem a troca de nutrientes através da comunidade do biofilme (DAVEY; O'TOOLE, 2000; LAWRENCE et al., 1991).

A estrutura do biofilme proporciona aos seus habitantes certo grau de proteção contra diversas ameaças do ambiente; bactérias crescidas em biofilmes são mais difíceis de serem removidas pelos processos de limpeza e, geralmente, apresentam maior resistência aos biocidas e antibióticos do que os organismos de vida-livre (DUNNE, 2002). Em certos casos, dependendo da combinação droga-espécie, a concentração de um antibiótico necessária para erradicar um biofilme pode ser de 100 a 1.000 vezes maior do que aquela para as populações planctônicas do mesmo organismo (CERI et al., 1999). Biofilmes resistentes agem como reservatórios de bactérias que se tornam constantes fontes de contaminação em tanques de fermentação alcoólica (SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2007).

O uso de antibióticos em escala industrial, para controlar as contaminações bacterianas crônicas, tem um custo considerável e pode promover a seleção de linhagens resistentes representando um potencial problema à saúde pública (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011; MUTHAIYAN; RICKE, 2010). Entretanto, faltam estudos sobre a diversidade bacteriana dos biofilmes contaminantes da fermentação alcoólica em escala industrial, para a produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, assim como a determinação destas comunidades ao longo dos estágios iniciais de estabelecimento destes biofilmes.

2.2 Hipótese

Este estudo buscou testar a hipótese de que os biofilmes provenientes da fermentação alcoólica em escala industrial podem abrigar novas espécies ou espécies ainda não reportadas para este ambiente fermentativo, mas que devam apresentar um perfil semelhante ao descrito para as amostras líquidas dos tanques de fermentação predominadas por bactérias ácido-lácticas, e ainda, que a composição das comunidades bacterianas possam apresentar variações conforme o período de desenvolvimento destes biofilmes (tempo de exposição ao processo fermentativo).

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi determinar a diversidade da comunidade bacteriana dos biofilmes formados nas dornas de fermentação alcoólica, em períodos correspondentes ao estágio inicial de estabelecimento destes biofilmes, visando contribuir com as estratégias de controle das contaminações da produção de bioetanol.

2.3.2 Objetivos específicos

Para alcançar o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram considerados:

- Determinar a composição das comunidades bacterianas através da construção de bibliotecas e sequenciamento dos clones do gene 16S rRNA;
- Verificar como esta composição varia conforme o período de crescimento dos biofilmes;
- Examinar a estrutura dos biofilmes através de microscopia eletrônica de varredura e PCR quantitativo dos genes 16S rRNA (bactéria) e 18S rRNA (fungos).

2.4 Material e métodos

2.4.1 Coleta das amostras

O experimento foi instalado em uma usina localizada no Estado de São Paulo, nos períodos de setembro de 2011 e setembro/outubro de 2012. Esta usina, referência no setor sucroalcooleiro, opera em batelada alimentada com reciclagem de levedura. Dois tipos de fermentação alcoólica foram avaliados de forma independente: fermentação em escala industrial (FI), com teor alcoólico em torno de 9% (v/v), e fermentação em escala piloto (FP) com teor alcoólico entre 11 e 16% (v/v). Além do teor alcoólico, as fermentações também diferiram em outros aspectos como: linhagem de levedura, mosto, temperatura e tempo de fermentação, tipo e frequência dos antibióticos aplicados (Tabela 1).

Amostras de biofilmes foram coletadas a partir de matrizes de aço inox penduradas por arame de aço galvanizado na altura do terço superior das dornas de fermentação e recolhidas após 7, 14 e 21 dias de exposição ao processo fermentativo (tempo de crescimento dos biofilmes). Durante o período de incubação, os biofilmes foram expostos ao processo regular de limpeza das dornas e ao estresse causado pelos antimicrobianos. A limpeza das dornas consiste em uma lavagem após cada ciclo fermentativo. Na dorna industrial (fermentação industrial), o antibiótico monensina (3 ppm) e o antimicrobiano alfa-ácido derivado do lúpulo (20 ppm) foram aplicados alternadamente, uma vez por semana, em ambos os anos amostrados. Na dorna piloto (fermentação piloto), o antibiótico monensina (5 ppm) foi aplicado três vezes por semana no primeiro ano e somente duas vezes (14° e 15° dias) no segundo ano (Tabela 1).

Após a coleta, as matrizes foram transportadas para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP) em recipientes contendo 200 ml de vinho da própria fermentação. Em fluxo laminar, as matrizes foram lavadas quatro vezes em solução salina (0,85%) estéril para a remoção das células planctônicas não-aderidas, sendo posteriormente submetidas ao esfregaço de superfície com o auxílio de um *swab* estéril. As amostras foram coletadas em triplicata (15 cm²), ressuspendidas em 500 μ l de solução salina (0,85%) e armazenadas a - 80°C até o processamento, em no máximo 72 horas.

Parâmetros de avaliação*	Fermentação Industrial	Fermentação Piloto
Linhagem de levedura	Selvagens (1°ano); FT858 (2°ano)	FT859 (1°ano); FT1500 (2°ano)
Teor Alcoólico	8 a 9% (v/v)	11 a 16% (v/v)
Mosto	Misto (caldo e melaço)	Melaço
Volume das dornas	600 m^3	$2,5 \text{ m}^3$
Sistema de refrigeração	Trocador de calor	Trocador de calor e chiller
Média das temperaturas máximas	37,4°C (1°ano); 36,1°C (2°ano)	28,1°C (1°ano); 28,9°C (2°ano)
Tempo de fermentação	8 a 10 horas	12 a 18 horas
Antibiótico/Antimicrobiano	Monensina e alfa-ácido	Monensina
Aplicação de antibiótico e/ou biocida	3 vezes (1° e 2° ano)	9 vezes (1° ano); 2 vezes (2° ano)
Lavagem das dornas	Flegmaça	Água de poço artesiano
Sistema de lavagem	Spraying System	Mangueira

Tabela 1 - Principais diferenças entre a fermentação alcoólica do processo industrial e da unidade piloto

* Durante o período de amostragem

2.4.2 Extração de DNA total dos biofilmes

Amostras dos biofilmes ressuspendidas em 500 µl de solução salina (0,85%) (item 2.4.1) foram concentradas por centrifugação a 12.000 rpm por 5 min. A partir dos precipitados, extraiu-se o DNA total dos biofilmes utilizando os kits comerciais *PowerSoilTM DNA Isolation* e *PowerBiofilmTM DNA Isolation* (MoBio Laboratories), conforme as instruções do fabricante.

Para a verificação da qualidade do DNA, uma alíquota de 5 μ l de cada amostra foi acrescida de 2 μ l de tampão de carregamento (sacarose 40%; azul de bromofenol 0,25%) e aplicada em gel de agarose 1% corado com *GelRedTM Nucleic Acids Stain* (Biotium) para uma corrida eletroforética em tampão TSB 1X (BRODY; KERN, 2004) a 90 V, por aproximadamente 30 minutos. A quantificação das amostras foi feita por espectrofotometria utilizando o *Nanodrop* 2000c (Thermo Fisher Scientific), adotando-se a relação de 1,0 de densidade ótica a 260 nm (OD₂₆₀) como sendo 50 ng de DNA/ μ l (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

2.4.3 Amplificação por PCR do gene 16S rRNA de bactéria

O gene bacteriano 16S rRNA foi amplificado, a partir do DNA total das amostras dos biofilmes, através de PCR utilizando os primers universais para o domínio Bacteria fD1 (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG et al., 1991). Os componentes da reação foram: 16,3 µl de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada, 2,5 µl de PCR Rxn Buffer (10x) (Invitrogen), 0,25 µl de dNTPs (10 mM), 0,75 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de cada primer (5 pmoles) (Bioneer), 0,2 µl de Platinum® Taq DNA polimerase (5 U/µl) (Invitrogen) e 3 µl de DNA (~15 ng), sendo o volume final de 25 µl. As amplificações foram feitas no termociclador MyGenieTM 96 Gradient Thermal Block (Bioneer) conforme o seguinte programa: desnaturação inicial a 96°C por 4 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 2 min, tendo uma extensão final a 72°C por 10 min. O tamanho esperado (~1.500 pb) para os produtos da PCR (amplicons) foi verificado por comparação com o padrão molecular Low Mass DNA Ladder (Invitrogen) em gel de agarose 1% corado com GelRedTM Nucleic Acids Stain (Biotium), após corrida eletroforética (90 V, 30 min) em tampão TSB 1X (BRODY; KERN, 2004).

Para cada amostra de biofilme foram feitas triplicatas da PCR, a fim de evitar os vieses da reação. Os *amplicons* das triplicatas foram unidos para posterior purificação das amostras utilizando o kit *IllustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

2.4.4 Construção das bibliotecas de clones do gene 16S rRNA e sequenciamento

Doze bibliotecas de clones do gene 16S rRNA foram construídas, correspondendo a cada período de crescimento dos biofilmes (7, 14 e 21 dias), tipo de fermentação avaliada (industrial e piloto) e ano de amostragem (2011 e 2012). Os procedimentos para a construção das bibliotecas e sequenciamento foram feitos individualmente para cada réplica biológica (três no total) e os resultados obtidos foram agrupados representando uma biblioteca.

Os *amplicons* purificados (item 2.4.3) foram ligados em um vetor comercial de clonagem *pGEM*®-*T Easy Vector System I* (Promega) conforme o protocolo do fabricante. Células competentes de *Escherichia coli* DH5 α foram transformadas com os vetores recombinantes e plaqueadas em meio LB contendo ampicilina, X-gal e IPTG (todos em uma concentração final de 100 µg/ml de meio). Após a triagem de colônias azuis e brancas, 288 colônias brancas (contendo o inserto de interesse) foram assepticamente recolhidas para cada biblioteca, sendo individualmente distribuídas em três placas de 96 cavidades (uma placa para cada réplica biológica) preenchidas com 10 µl TE (Tris 1M, pH 8.0; EDTA 0,5M, pH 8.0). As placas foram incubadas a 95°C por 10 min, a fim de promover a lise das células.

As amplificações dos insertos de interesse foram realizadas em placas, a partir do lisado celular, utilizando os *primers* M13F (5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCACG-3') e M13R (5'-GAGCGGATAACAATTTCACACAGG-3') (Invitrogen). As reações de amplificação foram feitas para um volume final de 25 µl contendo 18,3 µl de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada, 2,5 µl de *PCR Rxn Buffer* (10x) (Invitrogen), 0,25 µl de dNTPs (10 mM), 0,75 µl de MgCl₂ (50 mM), 1 µl de cada *primer* (5 pmoles), 0,2 µl *Platinum*® *Taq DNA polimerase* (5 U/µl) (Invitrogen) e 1 µl do lisado bacteriano. O programa de amplificação foi composto por um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 61°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min; uma extensão final de 10 min a 72°C foi adicionada. As PCRs foram realizadas no termociclador *GeneAmp*® *PCR System 9700* (PE Applied Biosystems). O tamanho esperado dos *amplicons* foi verificado para 16% das amostras de cada biblioteca, através de
comparação com o padrão molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) em gel de agarose 1% corado com *GelRedTM Nucleic Acids Stain* (Biotium), após corrida eletroforética (90 V, 30 min) em tampão TSB 1X (BRODY; KERN, 2004).

Os *amplicons* foram purificados em placas, adicionando-se 80 μ l de isopropanol 75%. A mistura foi homogeneizada com auxílio de vórtex, incubada a - 20°C por 16 horas e centrifugada a 4.000 rpm por 90 min (Eppendorf, 5804R). Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi lavado com 150 μ l de etanol 70% e centrifugado a 4.000 rpm por 90 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado seco a 40°C por 10 min para, então, ser ressuspendido em 25 μ l de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada.

As reações de sequenciamento, preparadas em microplacas de 96 cavidades, foram compostas por 1,5 µl do *amplicon* purificado, 2 µl de *BigDye Terminator Ready v.3.1* (Applied Biosystems), 1 µl do *primer* universal para eubacteria fD1 (5 pmoles), 2 µl do tampão de sequenciamento 2X (Applied Biosystems) e 3,5 µl de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada, totalizando um volume de 10 µl. As reações de amplificação foram realizadas no termociclador *GeneAmp*® *PCR System 9700* (PE Applied Biosystems) e consistiram em uma desnaturação inicial a 96°C por 1 min, seguida por 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 s, anelamento a 55°C por 10 s e extensão a 60°C por 4 min.

Após as reações de sequenciamento, as amostras foram precipitadas pela adição de 2 µl de acetato de sódio 3M/EDTA 125 mM e 60 µl de etanol absoluto, homogeneizadas com o auxílio de vórtex e centrifugadas a 4.000 rpm, por 45 min a 10°C (Eppendorf, 5804R). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 150 µl de etanol 70%. Após nova centrifugação a 4.000 rpm, por 15 min a 10°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em estufa a 45°C por 7 min. As amostras foram armazenadas a - 20°C até o momento do sequenciamento, realizado no sequenciador automático 3500 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Hitachi) (primeiro ano de amostragem) e no *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) (segundo ano de amostragem).

2.4.5 Análise das sequências e relações filogenéticas

Sequências parciais do gene 16S rRNA foram processadas utilizando as ferramentas disponíveis no *Ribosomal Database Project II* (RDP) (COLE et al., 2009), dentre elas o PHRED, que traduz o eletroferograma em uma sequência de bases com qualidades associadas e LUCY, que promove os cortes de qualidade e remove sequências provindas do vetor de

clonagem. O Naive Bayesian rRNA Classifier v.2.5 (RDP) foi utilizado para a classificação taxonômica com nível de confiança de 80% (WANG et al., 2007). Somente sequências acima de 500 pb e qualidade de base ≥ 20 (probabilidade de 1 erro para cada 100 pb) foram consideradas. A verificação de possíveis formações de quimeras foi feita pelo DECIPHER (WRIGHT et al., 2012) e o alinhamento das sequências pelo CLUSTAL W presente no BioEdit Sequence Aligment Editor (v. 7.0.5.3) (HALL, 1999). O programa MOTHUR v.1.8.1 (SCHLOSS et al., 2009) foi usado para relacionar as sequências às UTOs (Unidade Taxonômica Operacional) com o critério de 97% de identidade e selecionar um clone representativo dentro de cada UTO. Libshuff no MOTHUR foi utilizado para verificar, estatisticamente, as diferenças entre as bibliotecas. A cobertura das bibliotecas foi calculada com o estimador não-paramétrico C (GOOD, 1953), como descrito por Kemp e Aller (2004). Os clones representativos de cada UTO foram submetidos ao algoritmo BLASTN (Nucleotide BLAST - Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al., 1990), o qual permite a comparação com outras sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank-NCBI (National Center of Biotechnology Infomation - E.U.A), DDBJ (DNA DataBank of Japan) e EMBL (European Molecular Biology Laboratory). Através do software MEGA v.6 (TAMURA et al., 2013) foram feitas as análises de reconstrução filogenética utilizando o método de Neighbor-Joining; as distâncias evolutivas foram calculadas segundo o método Maximum Composite Likelihood, baseado no número de substituição de nucleotídeo por sítio. O valor de confiança dos braços das árvores foi determinado pelo método de Bootstrap, com 1.000 repetições. Diagramas de Venn foram construídos, através do MOTHUR, para verificar as UTOs únicas e as compartilhadas de um grupo específico dentro das bibliotecas.

2.4.6 Observação da estrutura dos biofilmes por microscopia eletrônica de varredura

A estrutura dos biofilmes formados sobre a superfície de cupons de aço inox (1 cm²) foi observada por microscopia eletrônica de varredura. Para a fermentação piloto, três períodos de crescimento foram avaliados: 7, 14 e 21 dias, correspondentes aos estágios iniciais do estabelecimento dos biofilmes. Para a fermentação industrial, além dos períodos anteriores, amostras com 120 dias, correspondentes a biofilmes maduros, também foram avaliadas para efeito comparativo. Para cada período de crescimento foi confeccionada uma placa de aço inox na qual foram amarrados 4 cupons (Figura 1). Após a incubação dentro das dornas de fermentação alcoólica, as placas foram coletadas e transportadas como

descrito no item 2.4.1. Posteriormente, os cupons foram lavados quatro vezes em solução salina (0,85%) estéril e fixados em vapor de ósmio (OsO4 2%) por 16 horas. Após secagem por 72 horas em recipiente contendo sílica gel, os cupons foram metalizados (Sputter Coater SCD 050, Bal-Tec) e examinados no microscópio LEO 435 VP (Cambridge, Inglaterra).



Figura 1 – Placa com quatro cupons de aço inox (1 cm x 1 cm): matriz para formação dos biofilmes

2.4.7 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Análises de PCR em tempo real foram realizadas para quantificação do número de cópias dos genes 16S rRNA e 18S rRNA nas amostras de biofilmes mistos formados nas dornas industriais de fermentação alcoólica, nos diferentes períodos de crescimento: 7, 14, 21 e 120 dias. As reações foram realizadas no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando o sistema *SYBR Green*.

2.4.7.1 Quantificação do gene 16S rRNA de bactéria

A amplificação do gene 16S rRNA por PCR em tempo real foi realizada com os *primers* universais para o domínio *Bacteria* U968F (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') (HEUER et al., 1997) e R1387 (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3') (MARCHESI et al., 1998), gerando fragmentos de 419 pb. As reações de amplificação foram preparadas com 5 µl de *Syber Green Rox qPCR* (Fermentas), 1 µl de cada *primer* (5 pmoles), 2 µl de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada e 1 µl de DNA (diluído 10x para as amostras de biofilmes com 120 dias e sem diluição para as demais amostras), sendo o volume final de 10 µl. Para cada amostra, as reações foram feitas em triplicata (réplicas técnicas). O programa de amplificação foi composto por uma desnaturação inicial a 94°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 s, anelamento a 56°C por 30 s e extensão a 72°C por 45 s. Ao final da reação, incluiu-se uma curva de *melting* constituída por uma desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento a 56°C por 1 min, para então a temperatura ser gradativamente aumentada até 95°C em 15 s, com leitura dos dados a cada 0,7°C.

A quantificação das amostras foi feita por comparação com um padrão cujo número de cópias do gene 16S rRNA é conhecido. Como padrão, utilizou-se um clone obtido durante a construção das bibliotecas (item 2.4.4). Os plasmídeos foram quantificados no espectrofotômetro *Nanodrop* 2000c (Thermo Fisher Scientific) e diluídos em série (1:10), sendo os intervalos de 10⁷ a 10³ genes/µl utilizados na construção da curva-padrão. Os valores de Cts (*cycle threshold*) foram usados como normalizadores para determinar a quantidade de DNA passível de amplificação de cada amostra. Os Cts são definidos como o número de ciclos requeridos para que o sinal fluorescente exceda o nível de ruído (*background*), sendo inversamente proporcional a quantidade de DNA-alvo da amostra.

2.4.7.2 Quantificação do gene 18S rRNA de fungo

Para a amplificação do gene 18S rRNA dos fungos foram utilizados os *primers* EF4f (5'-GGAAGGG[G/A]TGTATTTATTAG-3') e Fung5R (5'-GTAAAAGTCCTGGTTCCC-3') (VAN ELSAS et al., 2000), os quais geram fragmentos de 530 pb. As reações de amplificação, feitas em triplicata, apresentaram um volume final de 10 μ l e foram preparadas com 5 μ l de *Syber Green Rox qPCR* (Fermentas), 1 μ l de cada *primer* (5 pmoles), 2 μ l de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada e 1 μ l de DNA. O programa de amplificação foi composto por uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 51°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min. Ao final da reação, incluiu-se uma curva de *melting* constituída por uma desnaturação a 95°C por 15 s e anelamento a 51°C por 1 min, sendo a temperatura gradativamente aumentada até 95°C durante 15 s, com leitura dos dados a cada 0,7°C.

O DNA padrão para a construção da curva de qPCR foi obtido a partir de uma cultura pura de *Saccharomyces cerevisiae*, isolado PE-2, gentilmente cedida pela empresa Fermentec. Brevemente, o DNA de *S. cerevisiae* foi extraído conforme protocolo de Stirling (2003) e amplificado por PCR utilizando os *primers* EF4f e Fung5R (descritos acima). A reação de amplificação foi feita para um volume final de 50 µl contendo 36,6 µl de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada, 5 µl de *PCR Rxn Buffer* (10x) (Invitrogen), 0,5 µl de dNTPs (10 mM), 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 2 µl de cada *primer* (5 pmoles), 0,4 µl *Platinum*® *Taq DNA polimerase* (5 U/µl) (Invitrogen) e 2 µl do DNA da levedura. O programa de amplificação foi composto por um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, anelamento a 51°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min; e uma extensão final de 2 min a 72°C. A PCR foi realizada no termociclador *GeneAmp*® *PCR*

System 9700 (PE Applied Biosystems). O produto resultante da amplificação foi purificado com o kit *IllustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação da amostra foi feita por espectrofotometria utilizando o *Nanodrop* 2000c (Thermo Fisher Scientific) para posterior diluição em série (1:10), cujos intervalos de 10⁶ a 10² genes/µl foram utilizados na construção da curva-padrão. Os valores de Cts (*cycle threshold*) foram usados como normalizadores na determinação da quantidade de DNA passível de amplificação das amostras.

2.5 Resultados

2.5.1 Composição da comunidade bacteriana dos biofilmes e relações filogenéticas

A composição da comunidade bacteriana dos biofilmes, formados nos tanques de fermentação para a produção de bioetanol a partir da cana-de-açúcar, foi determinada através da análise das bibliotecas do gene 16S rRNA. Doze bibliotecas foram construídas e nomeadas de acordo com o tipo de fermentação (FI para fermentação industrial; FP para fermentação piloto), período de formação do biofilme (7, 14 e 21 dias) e período de amostragem ("a" para o primeiro ano e "b" para o segundo), sendo assim denominadas FI-7a, FI-7b, FI-14a, FI-14b, FI-21a, FI-21b, FP-7a, FP-7b, FP-14a, FP-14b, FP-21a e FP-21b. As características destas bibliotecas estão resumidas na Tabela 2. O grau de cobertura foi considerado experimentalmente alto para todas as bibliotecas, variando de 94,8% a 99,2%.

 Tabela 2 - Característica das bibliotecas dos clones do gene 16S rRNA, construídas a partir de amostras dos biofilmes formados nas dornas de fermentação alcoólica

		Fermentação Industrial						Fermentação Piloto				
Ano de amostragem		2011			2012			2011			2012	
Crescimento dos biofilmes (dias)	7	14	21	7	14	21	7	14	21	7	14	21
Nome da biblioteca	FI-7a	FI-14a	FI-21a	FI-7b	FI-14b	FI-21b	FP-7a	FP-14a	FP-21a	FP-7b	FP-14b	FP-21b
No. de clones	155	197	193	160	242	237	158	173	224	257	252	230
No. de UTOs (97% identidade) ^a	13	10	11	11	8	18	22	16	16	27	5	17
No. de singletons	4	5	3	5	2	8	7	9	5	12	2	8
Cobertura da biblioteca (%) ^b	97,4	97,5	98,4	96,9	99,2	96,6	95,6	94,8	97,8	95,3	99,2	96,5

^aAs UTOs foram definidas com sequências apresentando 97% de identidade.

^bC=1-(n/N), onde n é o número de singletons (UTO com um único clone) e N é o número total de clones.

A análise da composição bacteriana através da identificação taxonômica pelo *Naive Bayesian rRNA Classifier* (RDP II) revelou que, no primeiro ano de amostragem, as bibliotecas FI foram constituídas por 3 a 5 gêneros. A biblioteca correspondente aos biofilmes mais jovens (FI-7a) foi a que apresentou o maior número de gêneros (total de 5) sendo composta por *Lactobacillus* (94,2%), *Acetobacter* (1,9%), *Paenibacillus* (1,9%), *Pseudomonas* (1,3%) e *Tumebacillus* (0,7%). FI-14a foi composta por *Lactobacillus* (97,5%), *Pseudomonas* (1,5%) e *Burkholderia* (0,5%), sendo que 0,5% dos clones não apresentaram classificação quanto ao gênero. A biblioteca FI-21a foi constituída por *Lactobacillus* (91,2%), *Acetobacter* (4,1%), *Komagataeibacter* (4,1%) e *Pseudomonas* (0,6%). Nas bibliotecas FI do segundo ano, todos os clones mostraram-se afiliados ao gênero *Lactobacillus* (100%).

Estes resultados mostraram a predominância de *Lactobacillus* (> 90%) em todas as bibliotecas da fermentação industrial, sendo este o único gênero pertencente ao grupo das LAB (bactérias ácido-lácticas) encontrado nas 6 bibliotecas. Uma pequena porcentagem dos clones (< 10%) estava relacionada às bactérias Gram-negativas (*Acetobacter, Burkholderia, Komagataeibacter* e *Pseudomonas*) somente nas bibliotecas do 1° ano, enquanto que clones relacionados a bactérias Gram-positivas não pertencentes ao grupo das LAB (*Paenibacillus* e *Tumebacillus*) (2,58%) estiveram presentes em uma única biblioteca (FI-7a) (Figura 2).



Figura 2 – Classificação das sequências dos clones do gene 16S rRNA das bibliotecas construídas a partir de amostras de biofilmes com diferentes períodos de crescimento dentro das dornas de fermentação alcoólica em escala industrial

As bibliotecas FP do primeiro ano de amostragem apresentaram entre 6 e 12 gêneros. Também a biblioteca correspondente aos biofilmes com 7 dias (FP-7a) foi a que apresentou o maior número de gêneros (12 no total), sendo os mais abundantes Lactobacillus (28,5%), Leuconostoc (16,5%), Bacillus (5,7%) e Pseudomonas (5,1%), além de uma quantidade expressiva de clones não classificados quanto ao gênero (36,6%). Nesta biblioteca foram também encontrados Lactococcus (1,3%), Weissella (1,3%), Ochrobactrum (1,3%), Undibacterium (1,3%), Tumebacillus (0,6%), Dialister (0,6%), Duganella (0,6%) e Nevskia (0,6%). A biblioteca FP-14a teve a predominância do gênero Weissella (87,3%), seguido por Lactobacillus (7,5%). Esta biblioteca também foi composta por Pseudomonas (1,1%), Enterococcus (0,6%), Lactococcus (0,6%), Streptococcus (0,6%), Komagataeibacter (0,6%), *Clostridium* (0,6%) e alguns clones não classificados quanto ao gênero (1,1%). A biblioteca FP-21a foi constituída por 6 gêneros sendo eles Lactobacillus (94,6%), Enterococcus (2,7%), Acinetobacter, Dialister, Pseudomonas e Propionibacterium (< 0.5% cada), além de alguns clones não classificados ao nível de gênero (0,9%). No segundo ano, todas as bibliotecas FP foram compostas predominantemente pelo gênero Lactobacillus (> 65%). FP-7b, correspondente aos biofilmes mais jovens, também foi a que apresentou o maior número de gêneros, sendo estes afiliados a Lactobacillus (69,3%), Lactococcus (7,0%), Leuconostoc (6,2%), Tumebacillus (5,8%), Acetobacter (2,3%), Bacillus (1,6%), Kurthia (1,2%), Azotobacter (0,8%), Comamonas (0,8%), Ethanoligenes (0,8%), Komagataeibacter (0,8%), Enterococcus, Herbaspirillum, Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Ignatzschineria, Proteus, Providencia e Streptomyces (< 0,5% cada). Somente um clone não foi classificado quanto ao gênero. A biblioteca FP-14b foi a que apresentou o menor número de gêneros, sendo constituída somente por Lactobacillus (99,2%) e Leuconostoc (0,8%). FP-21b foi representada por Lactobacillus (97,4%), Bacillus (0,9%), Leuconostoc e Clostridium (< 0,5% cada) onde 0,9% dos clones não apresentaram classificação quanto ao gênero.

Assim como na fermentação industrial, os resultados encontrados para a fermentação na unidade piloto mostraram a predominância do grupo das LAB em todas as bibliotecas. Este grupo, que foi composto por *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Streptococcus* e *Weissella*, correspondeu a mais de 80% dos clones em 5 das 6 bibliotecas, com exceção da biblioteca FP-7a (com abundância de 47,5%), em que 36,6% dos clones não puderam ser classificados quanto ao gênero. Clones relacionados às bactérias Gram-negativas tiveram abundância inferior a 10%, sendo este grupo representado por *Acetobacter, Acinetobacter, Bradyrhizobium, Clostridium, Comamonas, Dialister, Duganella, Ethanoligenes, Herbaspirillum, Ignatzschineria, Komagataeibacter, Mesorhizobium, Nevskia,*

Ochrobactrum, Proteus, Providencia, Pseudomonas e Undibacterium. O grupo de bactérias Gram-positivas que não pertencem ao grupo das LAB foi representado em 4 das 6 bibliotecas com abundância máxima de 9%, composto por *Bacillus, Kurthia, Propionibacterium, Streptomyces e Tumebacillus* (Figura 3).



Figura 3 – Classificação das sequências dos clones do gene 16S rRNA das bibliotecas construídas a partir de amostras de biofilmes com diferentes períodos de crescimento dentro da dorna de fermentação alcoólica da unidade piloto

Análises de agrupamento dos clones das bibliotecas FI revelaram um total de 34 UTOs, das quais 29 UTOs pertenceram ao filo *Firmicutes* (Fi), 4 UTOs ao filo *Proteobacteria* (Pr) e 1 UTO ao filo *Actinobacteria* (Ac) (Figura 4). Quatro UTOs (Fi4, Fi6, Fi15 e Fi24) mostraram-se presentes em todas as bibliotecas, tendo-se destacado também pela abundância relativa em algumas delas. As sequências representativas destas UTOs apresentaram 99% de identidade com *Lactobacillus fermentum* e 100% de identidade com *L. amylovorus, L. casei* e *L. vini*, respectivamente. A UTO Fi22, cuja sequência representativa foi idêntica a de *L. parabuchneri*, apesar de ausente em uma única biblioteca (FI-14a), mostrou expressiva abundância (19,7 a 59,3%) nas demais bibliotecas. As UTOs Fi19 (0,5 a 12,2%) e Pr4 (0,5 a 1,5%) mostraram persistência nas bibliotecas do primeiro ano, embora não tenham sido encontradas no segundo ano. Suas sequências representativas apresentaram 99% de identidade com *L. silagei* e *Pseudomonas fluorescens*, respectivamente. A UTO Fi3 mostrou 99% de identidade com *L. panis* e esteve presente em metade das bibliotecas avaliadas, com maior abundância no primeiro ano (26,5% em FI-14a) do que no segundo (0,6% em FI-7b e 3,3% em FI-14b). Das 34 UTOs encontradas, 15 mostram baixa identidade (de 96 a 91%) com as sequências depositadas no *GenBank* (NCBI), sendo 13 destas UTOs (86,7%) afiliadas ao grupo dos *Lactobacillus*. As bibliotecas FI do mesmo ano, quando comparadas entre si, apresentaram diferenças significativas quanto a sua composição (P<0,05), segundo o teste de *Libshuff*.

			10		ANO 1			ANO 2				Identidade
			UTOs	FI-7a	FI-14a	FI-21a	FI-7b	FI-14b	FI-21b	Espécie proximamente relacionada	N° de acesso	(%)
		65	— Fi1	-	-	-	-	-	0.8	Lactobacillus secaliphilus	AM411002.1	99
		52	— Fi2	-	-	0.5	-	-	-	Lactobacillus panis	KF418828.1	94
		52	— Fi3	-	26.5	-	0.6	3.3	-	Lactobacillus panis	NR_026310.1	99
			— Fi4	1.9	68.0	1.0	15.0	9.5	1.7	Lactobacillus fermentum	AB911499.1	99
		92	— Fi5	-	-	-	0.6	-	-	Lactobacillus fermentum	DQ486144.1	95
		55	Fi6	3.2	1.0	3.6	6.3	25.2	33.0	Lactobacillus amylovorus	AB911468.1	100
			_ Fi7	-	-	-	-	-	0.8	Lactobacillus amylovorus	AB911468.1	97
	51		Fi8	-	-	-	-	-	0.8	Lactobacillus amylovorus	AB911468.1	93
		7	Fi9	-	-	-	0.6	-	-	Lactobacillus casei	HM462414.1	94
			— Fi10	-	-	0.5	-	-	-	Lactobacillus kefiranofaciens	AB690262.1	95
			Fi11	-	-	-	0.6	-	-	Lactobacillus amylovorus	AB911468.1	94
			Fi12	-	-	-	-	-	0.4	Lactobacillus parafarraginis	JN987663.1	94
		Ξ,	Fi13	-	-	-	-	-	0.8	Lactobacillus parabuchneri	JX003594.1	93
		4	Fi14	-	-	-	-	-	0.4	Lactobacillus secaliphilus	AM411002.1	94
		60	Fi15	13.5	1.0	50.3	32.5	1.3	11.9	Lactobacillus casei	KJ781354.1	100
			Fi16	-	-	-	0.6	-	0.4	Lactobacillus paracasei	AF243168.1	96
			Fi17	-	-	-	2.5	-	0.4	Lactobacillus parabuchneri	HQ293092.1	96
	100	90	Fi18	-	-	-	-	-	0.4	Lactobacillus rhamnosus	NR_102778.1	96
		- ,	Fi19	12.2	0.5	6.2	-	-	-	Lactobacillus silagei	NR_114388.1	99
			Fi20	1.3	-	-	-	-	0.4	Lactobacillus camelliae	KF418823.1	91
		Ч —	Fi21	-	-	-	-	0.4	0.4	Lactobacillus hilgardii	FM878600.1	99
		Ч,	Fi22	59.3	-	19.7	35.0	55.8	25.8	Lactobacillus parabuchneri	HM218284.1	100
85		72	Fi23	-	-	-	-	-	0.4	Lactobacillus buchneri	CP002652.1	97
		r	Fi24	2.6	0.5	9.3	5.7	4.1	21.2	Lactobacillus vini	AY681132.1	100
		57	Fi25	-	-	-	-	0.4	-	Lactobacillus acidipiscis	AB598991.1	99
-			Fi26	0.7	-	-	-	-	-	Paenibacillus cineris	KF979149.1	99
			Fi27	0.7	-	-	-	-	-	Paenibacillus aestuarii	HG974506.1	97
		87	— Fi28	0.7	-	-	-	-	-	Paenibacillus validus	HQ284867.1	99
			— Fi29	0.7	-	-	-	-	-	Tumebacillus ginsengisoli	KC921162.1	92
			— Ac1	-	0.5	-	-	-	-	Dietzia timorensis	NR_112775.1	94
		100	— Pr1	1.9	-	4.2	-	-	-	Acetobacter tropicalis	KJ526825.1	99
		99	Pr2	-	-	4.2	-	-	-	Komagataeibacter intermedius	NR_113394.1	99
		99	— Pr3	-	0.5	-	-	-	-	Burkholderia cepacia	AB695353.1	100
		94	— Pr4	1.3	1.5	0.5	-	-	-	Pseudomonas fluorescens	KC865280.1	99

Figura 4 – Distribuição filogenética das UTOs baseadas nas sequências dos clones do gene 16S rRNA das bibliotecas construídas a partir de amostras de biofilmes com diferentes períodos de crescimento nas dornas de fermentação alcoólica em escala industrial. O dendrograma indica as relações filogenéticas entre as sequências representativas das UTOs (definidas por ≥ 97% de identidade); os valores de *bootstrap* acima de 50% foram mostrados. A tabela indica a abundância relativa dos clones de cada UTO e os resultados de BLASTN das sequências representativas. As UTOs descritas no texto encontram-se em negrito. As cores de fundo destacam as UTOs pertencentes ao mesmo filo: *Firmicutes* (Fi), *Actinobacteria* (Ac) e *Proteobacteria* (Pr)

O agrupamento dos clones das bibliotecas FP revelou um total de 63 UTOs, dos quais 41 UTOs foram afiliadas ao filo *Firmicutes* (Fi), 18 UTOs a *Proteobacteria* (Pr), 2 UTOs a *Actinobacteria* (Ac), 1 UTO a *Verrucomicrobia* (Ve) e 1 UTO a *Chloroflexi* (Ch) (Figura 5). A única UTO presente em todas as bibliotecas foi Fi12, a qual mostrou 99% de identidade com *L. casei*. Esta UTO foi a mais abundante em 4 das 6 bibliotecas: FP-7a (21,5%), FP-21a (32,1%), FP-7b (56,8%) e FP-14b (92,8%).

A UTO Fi29 foi encontrada em 5 bibliotecas, tendo uma abundância expressiva em FP-7a (17,1%). Análises de BLASTN mostraram que a sequência representativa desta UTO apresentou somente 93% de identidade com a espécie mais proximamente relacionada, *Enterococcus díspar*, sugerindo que esta UTO possa representar uma nova espécie dentro deste gênero. As UTOs Fi5 e Fi25 estiveram presentes em 4 das 6 bibliotecas, com abundância máxima de 25,8% e 16,5%. As sequências destas UTOs foram idênticas as de *L. plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*, respectivamente. A UTO Fi26 foi predominante em FP-14a, representando 87,3% dos clones obtidos nesta biblioteca. Sua sequência representativa apresentou 99% de identidade com *Weissella paramesenteroides*. A UTO Fi1, com 99% de identidade em relação a *L. parabuchneri*, esteve presente nas bibliotecas dos biofilmes com 7 e 21 dias, nos dois anos de amostragem, sendo mais abundantes nos biofilmes mais velhos (12,5% em FP-21a e 20,9% em FP-21b). Destacando-se na biblioteca FP-21b, as UTOs Fi15 (29,6%) e Fi19 (24,8%) apresentaram 99% de identidade com *L. vini* e *L. amylovorus*, respectivamente.

A UTO Ve1 (10,8%), relacionada ao filo *Verrucomicrobia*, esteve presente somente em uma biblioteca (FP-7a). Sua sequência apresentou somente 85% de identidade com a espécie mais proximamente relacionada, *Chthoniobacter flavus*, sugerindo uma nova espécie, ou até mesmo um novo gênero na classe *Spartobacteria*.

A UTO mais abundante relacionada ao filo *Proteobacteria*, Pr4 (8,2%), também foi encontrada somente na biblioteca FP-7a. Esta UTO apresentou 96% de identidade com a sequência de *Methylovirgula ligni*, sugerindo uma nova espécie dentro deste gênero. Apesar de pouca abundância (0,5 a 3,8%), a UTO Pr18 foi persistente nas bibliotecas do primeiro ano. Esta UTO mostrou 99% de identidade com *Pseudomonas fluorescens*.

Das 63 UTOs encontradas, 13 UTOs (20,6%) apresentaram baixa identidade (\leq 96%) com outras sequências depositadas no *GenBank* (NCBI). As bibliotecas FP do mesmo ano, quando comparadas entre si, apresentaram diferenças significativas quanto a sua composição (P<0,001), segundo o teste de *Libshuff*.

				ANO 1			ANO 2				Identidade
		UTOs	FP-7a	FP-14a	FP-21a	FP-7b	FP-14b	FP-21b	Espécie proximamente relacionada	N° de acesso	(%)
	53	Fi1	1.3	-	12.5	4.6	-	20.9	Lactobacillus parabuchneri	JX003594.1	99
	78	Fi2	-	-	-	-	-	0.4	Lactobacillus parafarraginis	JN987663.1	99
		Fi3	0.6	-	-	1.2	-	-	Lactobacillus hilgardii	FM878600.1	99
		Fi4	-	0.6	5.8	-	-	-	Lactobacillus similis	AB512775.1	99
	68	Fi5	0.6	1.1	25.8	4.2	-	-	Lactobacillus plantarum	KJ526930.1	100
		Fi6	-	0.6	4.0	1.2	-	-	Lactobacillus brevis	KJ361843.1	99
		Fi7	-	-	0.9	-	-	-	Lactobacillus coryniformes	HQ293050.1	99
		Fi8	-	-	-	0.4	0.4	-	Lactobacillus harbinenis	JQ249071.1	99
	94	Fi9	-	-	-	-	-	0.4	Lactobacillus perolens	AB690232.1	96
		Fi10	-	-	-	-	-	0.4	Lactobacillus vini	AY681131.1	95
	78	Fi11	-	0.6	7.6	-	-	-	Lactobacillus manihotivorans	NR 024835.1	99
	п Чг	Fi12	21.5	1.7	32.1	56.8	92.8	15.3	Lactobacillus casei	KF245561.1	99
	84	Fi13	-	-	4.5	-	-	-	Lactobacillus pantheris	NR 025189.1	99
		Fi14	2.5	-	-	-	-	-	Lactobacillus satsumensis	NR 028658.1	99
	61	Fi15	-	-	-	-	5.6	29.6	Lactobacillus vini	AY681132.1	99
	50	Fi16	-	-	-	-	0.4	-	Lactobacillus casei	KF245561.1	95
	66	Fi17	-	0.6	1.3	-	-	-	Lactobacillus acidipiscis	AB598989.1	99
	95-	Fi18	-	-	-	0.4	-	-	Lactobacillus acetotolerans	NR 117073.1	99
	97	Fi19	-	-	-	-	-	24.8	Lactobacillus amylovorus	AB911468.1	99
		Fi20	-	-	-	-	-	0.9	Lactobacillus amylovorus	AB911468.1	94
	85-	Fi21	-	-	-	-	-	0.9	Lactobacillus vaginalis	AB911497.1	98
	64	Fi22	-	-	-	-	-	1.3	Lactobacillus secaliphilus	AM411002.1	99
	⁶³ 74	Fi23	1.9	2.3	-	0.4	-	2.2	Lactobacillus fermentum	JF414736.1	98
		Fi24	-	-	-	-	-	0.4	Lactobacillus fermentum	DQ680024.1	94
	54 -	Fi25	16.5	-	-	6.2	0.8	0.4	Leuconostoc mesenteroides	KJ026692.1	100
	99	Fi26	1.3	87.3	-	-	-	-	Weissella paramesenteroides	AB775182.1	99
		Fi27	-	-	0.5	-	-	-	Enterococcus hermaniensis	AY396046.1	99
ſ		Fi28	-	0.6	2.2	0.4	-	-	Enterococcus italicus	GQ131186.1	99
	51	Fi29	17.1	1.1	0.9	0.4	-	0.9	Enterococcus dispar	NR 113927.1	93
	55	Fi30	1.3	0.6	-	7.0	-	-	Lactococcus latis	NR 103918.1	99
00	64	Fi31	-	0.6	-	-	-	-	Streptococcus lutetiensis	KF245562.1	99
~~~~		Fi32	-	-	-	1.5	-	-	Bacillus ginsengihumi	NR 041378.1	99
		Fi33	-	-	-	-	-	0.4	Bacillus ramilacticus	D16279.1	99
	63	Fi34	5.7	-	-	-	-	-	Bacillus cereus	HF584854.1	99
		Fi35	-	-	-	-	-	0.4	Bacillus subtilis	KJ526895.1	99
		Fi36	-	-	-	1.2	-	-	Kurthia aibsonii	KJ722472.1	99
$\neg \square$		Fi37	0.6	-	-	5.8	-	-	Tumebacillus ginsengisoli	KC921162.1	92
		Fi38	0.6	-	0.5	-	-	-	Dialister propionicifaciens	NR 043231.1	93
	59	Fi39	-	0.6	-	-	-	-	Clostridium autoethanogenum	NR 121758.1	97
	54	Fi40	-	-	-	-	-	0.4	Clostridium amyadalinum	NR 115211.1	99
ſ		Fi41	-	-	-	0.8	-	-	Ethanoligenes harbinense	NR 042828.1	97
	98	Ac1	-	-	-	0.4	-	-	Streptomyces tumescens	AF346485.1	99
		Ac2	-	-	0.5	-	-	-	Propionibacterium acnes	NR_074675.1	99
		Ch1	0.6	-	-	-	-	-	Thermomicrobium roseum	NR_102959.1	85
79	94	Ve1	10.8	-	-	-	-	-	Chthoniobacter flavus	NR_115225.1	85
	98	Pr1	1.3	-	-	-	-	-	Ochrobactrum tritici	AM490635.1	99
	89	Pr2	-	-	-	0.4	-	-	Mesorhizobium amorphae	EU130449.1	98
l		Pr3	-	-	-	0.4	-	-	Bradyrhizobium japonicum	FJ025100.1	100
	77-	Pr4	8.2	-	-	-	-	-	Methylovirgula ligni	FM252035.1	96
		Pr5	-	-	-	2.3	-	-	Acetobacter pasteurianus	FN429074.1	99
	100	Pr6	-	0.6	-	0.8	-	-	Komagataeibacter saccharivorans	NR_113398.1	99
	50	Pr7	1.3	-	-	-	-	-	Undibacterium pigrum	NR_042557.1	96
	99 90	Pr8	0.6	-	-	-	-	-	Duganella zoogloeoides	AB495150.1	99
	98	Pr9	-	-	-	0.4	-	-	Herbaspirillum seropedicae	AF164065.2	97
		Pr10	-	-	-	0.8	-	-	Comamonasthiooxydans	NR_115741.1	99
	100	Pr11	-	-	-	0.4	-	-	Proteus mirabilis	NR_114419.1	100
	/0	Pr12	-	-	-	0.4	-	-	Providencia rettgeri	FJ151630.1	99
	98	Pr13	-	-	-	0.4	-	-	Ignatzschineria larvae	HQ696404.1	98
	~~~	Pr14	-	-	0.5	-	-	-	Acinetobacter guillouiae	HM536960.1	98
	<u> </u>	Pr15	0.6	-	-	-	-	-	Nevskia persephonica	JQ710442.1	97
	35 L	Pr16	-	-	-	0.8	-	-	Azotobacter beijerinckii	AB429527.1	98
	67	Pr17	1.3	-	-	-	-	-	Pseudomonas denitrificans	CP004143.1	99
	~~ <u>60</u>	Pr18	3.8	1.1	0.5	-	-	-	Pseudomonas fluorescens	KC865280.1	99

Figura 5 – Distribuição filogenética das UTOs baseadas nas sequências dos clones do gene 16S rRNA das bibliotecas construídas a partir de amostras de biofilmes com diferentes períodos de crescimento na dorna de fermentação alcoólica da unidade piloto. O dendrograma indica as relações filogenéticas entre as sequências representativas das UTOs (definidas por ≥ 97% de identidade); os valores de *bootstrap* acima de 50% foram mostrados. A tabela indica a abundância relativa dos clones de cada UTO e os resultados de BLASTN das sequências representativas. As UTOs descritas no texto encontram-se em negrito. As cores de fundo destacam as UTOs pertencentes ao mesmo filo: *Firmicutes* (Fi), *Actinobacteria* (Ac); *Verrucomicrobia* (Ve), *Chloroflexi* (Ch) e *Proteobacteria* (Pr)

Quando os clones pertencentes às UTOs relacionadas ao grupo *Lactobacillus* foram analisados separadamente dos demais grupos, as bibliotecas dos biofilmes mais velhos (21 dias) foram as que exibiram maior riqueza de UTOs quando comparadas às bibliotecas dos biofilmes de 7 e 14 dias, tanto na fermentação industrial quanto na fermentação piloto, como ilustram os diagramas de Venn, evidenciando o número de UTOs únicas e compartilhadas (intersecções) entre as bibliotecas (Figura 6).



Figura 6 – Diagramas de Venn (*cutoff* 0.03) baseados nas UTOs afiliadas ao grupo *Lactobacillus* presente nas bibliotecas do gene 16S rRNA construídas a partir de biofilmes com diferentes períodos de crescimento nas dornas de fermentação alcoólica. A) Fermentação em escala industrial; B) Fermentação na unidade piloto

2.5.2 Estrutura dos biofilmes

Imagens de microscopia eletrônica de varredura da superfície dos cupons de aço-inox incubados por diferentes períodos, nos tanques de fermentação industrial e fermentação piloto, revelaram a presença de biofilmes mistos, compostos por bactérias e leveduras. Nos biofilmes com 7, 14 e 21 dias pôde-se observar a adesão dos micro-organismos à superfície e a formação de microcolônias, principalmente naqueles com 21 dias de crescimento (Figuras 7 e 8). Os biofilmes maduros, com 120 dias, amostrados somente na fermentação industrial, apresentaram um maior número de bactérias quando comparados com os biofilmes mais jovens, sendo possível a observação da matriz de exopolissacarídeo nestas amostras (Figura 9). Os resultados de qPCR mostraram um aumento significativo no número de cópias do gene 16S rRNA de bactéria nas amostras do biofilme maduro, quando comparado com os biofilmes mais jovens. Para o gene 18S rRNA de fungo, o maior número de cópias foi obtido nos biofilmes com 21 dias (Figura 10).



Figura 7- Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos estágios iniciais da formação de biofilmes sobre a superfície de cupons de aço inox incubados, em dorna industrial de fermentação alcoólica, por 7 dias (A1 e A2), 14 dias (B1 e B2) e 21 dias (C1 e C2). Detalhes das leveduras e bactérias (D1 e D2)



Figura 8 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos estágios iniciais da formação de biofilmes sobre a superfície de cupons de aço inox incubados, em dorna de fermentação alcoólica de uma unidade piloto, por 7 dias (A1 e A2), 14 dias (B1 e B2) e 21 dias (C1 e C2). Detalhes das leveduras e bactérias (D1 e D2)



Figura 9 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de biofilmes maduros formados sobre a superfície de cupons de aço inox incubados por 120 dias em dornas industriais de fermentação alcoólica. A, B e C: biofilmes mistos de leveduras e bactérias em diferentes aumentos (600x, 4.000x e 8.000x, respectivamente). D: Detalhe das bactérias e da matriz de exopolissacarídeo



Figura 10 – Resultado da quantificação, por PCR em tempo real, do número de cópias dos genes 16S rRNA de bactéria (A) e 18S rRNA de fungo (B) a partir de amostras de DNA de biofilmes formados nas dornas industriais de fermentação alcoólica, em diferentes períodos de crescimento. O sombreado corresponde ao intervalo de confiança. Letras distintas indicam diferenças estatísticas (teste de Tukey; P < 0,01) entre os biofilmes com diferentes idades</p>

2.6 Discussão

É de amplo conhecimento que a contaminação bacteriana é um dos entraves do processo de produção do bioetanol, ocasionando perdas econômicas significativas para a indústria do álcool (AMORIM et al., 2011; MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011; MUTHAIYAN; RICKE, 2010; NARENDRANATH et al., 1997; THOMAS; HYNES; INGLEDEW, 2001). O difícil controle e reincidência das contaminações durante o processo fermentativo sugerem a participação dos biofilmes como um reservatório de bactérias (RICH et al., 2011; SKINNER; LEATHERS, 2004; SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2007). Entretanto, faltam estudos sobre a diversidade bacteriana e estrutura dos biofilmes formados nos tanques industriais de fermentação alcoólica que tem a cana-de-açúcar como substrato.

No presente estudo, método independente de cultivo foi utilizado para a análise da comunidade bacteriana de biofilmes. De um modo geral, a comunidade bacteriana dos biofilmes foi composta predominantemente pelas bactérias ácido-lácticas (LAB), independente do período de crescimento dos biofilmes e do teor alcoólico da fermentação, semelhante ao relatado para as amostras líquidas dos tanques de fermentação da cana-de-açúcar (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; CAMPANA, 2012; GALLO, 1990; LUCENA, 2010; ROSALES, 1989) e para os biofilmes de fermentação de alto teor alcoólico em escala piloto (CAMPANA, 2012) e biofilmes formados *in vitro* a partir de fermentação do milho (SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2007).

O grupo das LAB tem sido relatado como o mais prejudicial para a indústria do bioetanol (G-ALEGRIA et al., 2004; LUCENA et al., 2010; LUSHIA; HEIST, 2005; SKINNER; LEATHERS, 2004). Este grupo é composto por bactérias Gram-positivas, conhecidas pela resistência a altas temperaturas e baixo pH, assim como pela habilidade de rápido crescimento (NARENDRANATH et al., 1997). As LAB convertem os açúcares em ácidos orgânicos os quais diminuem o pH do meio, tornando o ambiente desfavorável para as leveduras (NARENDRANATH; POWER, 2005). Além disto, os requisitos nutricionais destas bactérias incluem uma grande variedade de aminoácidos e vitaminas (SNELL, 1945), fazendo com que o seu crescimento dentro das dornas de fermentação limite os nutrientes necessários para o adequado metabolismo das leveduras (BAYROCK; INGLEDEW, 2004).

Dentro do grupo das LAB, o gênero *Lactobacillus* foi o que apresentou o maior número de clones a ele afiliados. Os lactobacilos são comumente encontrados em ambientes fermentativos com uma grande variedade de açúcares; muitas espécies possuem alto nível de tolerância ao etanol (GOLD et al., 1992). Historicamente, o gênero *Lactobacillus* tem sido reportado como um dos principais contaminantes da fermentação alcoólica (CHANG et al., 1995; GALLO, 1990; LUCENA 2010; SCHELL et al., 2007; SKINNER; LEATHERS, 2004; SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2007; ROSALES, 1989). Outros gêneros encontrados nas bibliotecas e que compõem o grupo das LAB foram: *Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Streptococcus* e *Weissella*.

As bactérias Gram-positivas de maior destaque, que não pertencem ao grupo das LAB, foram as esporuladas, representadas pelos gêneros *Bacillus, Paenibacillus* e *Tumebacillus*. Bactérias esporuladas são mais resistentes a altas temperaturas, irradiação, ácidos fortes e desinfetantes (TODAR, 2012). No processo de descontaminação do mosto por irradiação, bactérias esporuladas exigem doses mais altas do que as bactérias não-esporuladas (ALCARDE; WALDER; HORII, 2003). *Bacillus* são frequentemente relatados como contaminantes do processo fermentativo (AMORIM; OLIVEIRA, 1982; CAMPANA, 2012; GALLO, 1990; ROSALES, 1989), podendo diminuir a viabilidade das leveduras (NOBRE, 2005) e também competir pelo açúcar do meio para a produção de levânio (SHIH et al., 2005). Ao contrário de *Bacillus*, os gêneros *Tumebacillus* e *Paenibacillus* não foram descritos como contaminantes da fermentação alcoólica. *Tumebacillus* foi proposto por Steven e colaboradores em 2008; a espécie *T. ginsengisoli* é encontrada no solo e apresenta crescimento entre 20 e 42°C, e pH entre 5,0 e 8,5. *Paenibacillus* pertencia ao gênero *Bacillus*, sendo posteriormente reclassificado como um novo gênero (ASH; PRIEST; COLLINS, 1993).

Bactérias Gram-negativas são menos frequentes nas dornas de fermentação, mas também são de difícil controle (AMORIM; BASSO; LOPES, 2004). Dentro deste grupo, as que apresentaram maior abundância foram as relacionadas a *Acetobacter* e *Komagataeibacter*, sendo este último proposto como um novo gênero a partir de *Gluconacetobacter* (YAMADA et al., 2012). Bactérias destes gêneros são resistentes a vários antibacterianos comumente utilizados nas indústrias (HEIST, 2009). Elas afetam o rendimento do processo fermentativo transformando o etanol em ácido acético, o qual acaba promovendo a acidificação do meio e, consequentemente, a diminuição da viabilidade das leveduras. Além da glicose, estes microorganismos utilizam outras fontes de carbono para o seu crescimento como o etanol, o glicerol e o ácido lático, normalmente presentes no mosto fermentado (AMORIM; BASSO; LOPES, 2004).

Análises de agrupamentos evidenciaram a predominância de UTOs relacionadas ao filo *Firmicutes*, seguido por *Proteobacteria* e *Actinobacteria* nos dois tipos de fermentação (industrial e piloto). Na fermentação piloto, houve ainda 1 UTOs afiliada a *Verrucomicrobia* e outra afiliada a *Chloroflexi*. Sharmin e colaboradores (2013) avaliaram, através de *PhyloChip*, a diversidade da comunidade bacteriana de amostras coletadas de distintos ambientes das fábricas australianas de processamento da cana-de-açúcar como o líquido resultante da lixiviação do bagaço (ambiente rico em hemi-celulose), água da torre de resfriamento (ambiente pobre em hemi-celulose) e fossa de despejo de sedimentos (relacionado com o odor do ambiente e questões de saúde humana). Os autores relataram que *Firmicutes* foi o filo predominante, seguido por *Proteobacteria, Bacteroidetes* e *Chloroflexi*. Apesar de menos frequentes, outros filos também foram encontrados, dentre eles, *Actinobacteria* e *Verrucomicrobia*.

Na fermentação industrial, as UTOs que se destacaram por estarem presentes em todas as bibliotecas, e também pela abundância em algumas delas, foram aquelas relacionadas às espécies *L. casei*, *L. fermentum*, *L. vini* e *L. amylovorus*. Apesar de ausente em uma única biblioteca (FI-14a), *L. parabuchneri* teve uma expressiva abundância nas demais bibliotecas.

L. fermentum e *L. amylovorus* foram relatados nos biofilmes formados em condições laboratoriais a partir de amostras líquidas provindas da fermentação alcoólica do milho (SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2007). Segundo estes autores, estas espécies juntamente com *L. vaginalis*, se tornaram mais abundantes nos biofilmes do que nas amostras líquidas, sugerindo que estes micro-organismos tem seu crescimento favorecido sobre superfícies. Ensaios de crescimento de biofilmes a partir de culturas puras de *L. fermentum*, *L. johnsonii*, *L. mucosae* e *L. amylovorus*, isolados de biofilmes produzidos nas mesmas condições anteriores, mostraram que as estirpes de *L. fermentum* foram as que apresentaram os maiores níveis de formação dos biofilmes (RICH et al., 2011).

Recentemente, Murphree, Heist e Moe (2014) avaliaram a capacidade de formação de biofilmes de bactérias contaminantes de oito destilarias americanas. Alguns isolados de *L. casei, L. paracasei, L. plantarum, L. fermentum, Weissella confusa, Lactococcus latis* e *Pediococcus pentosaceus* foram considerados produtores moderados de biofilmes, enquanto que outros isolados de *L. fermentum* e *Pediococcus pentosaceus* foram classificados como fortes produtores de biofilmes. Os autores concluíram que a variabilidade na capacidade de formação dos biofilmes ocorre dentro da própria espécie, uma vez que as diferenças foram observadas conforme o isolado.

Lactobacillus vini ainda não foi descrito na literatura como integrante dos biofilmes da fermentação alcoólica, mas tem sido relatado como um dos principais contaminantes da produção de bioetanol em algumas destilarias do nordeste brasileiro (LUCENA et al., 2010). Esta espécie tem sido observada em associação com a levedura *Dekkera bruxellensis* na produção de etanol na Suécia (PASSOTH; BLOMQVIST; SCHNURER, 2007) e no Brasil (LUCENA et al., 2010; SOUZA et al., 2012). Tiukova, Eberhard e Passoth (2014) observaram a formação de co-agregados de *L. vini* e *Dekkera bruxellensis*, assim como de *L. vini* e *Saccharomyces cerevisiae* quando cultivados em culturas mistas; relataram ainda o alto grau de floculação desta bactéria, principalmente na presença de etanol.

A espécie *L. parabuchneri* tem sido reportada na fermentação de bebidas destiladas como o uísque (SIMPSON; PETTERSSON; PRIEST, 2001), o shochu (ENDO; OKADA, 2007), o mezcal (NARVÁEZ-ZAPATA et al., 2010) ou outras bebidas como o kefir brasileiro (MAGALHÃES et al., 2011). Através de análises de T-RFLP, Campana (2012) relatou a presença de *L. parabuchneri* em amostras de melaço, mosto, pé-de-cuba, vinho e biofilmes de centrífuga, trocador de calor e dorna de fermentação com alto teor alcoólico, em escala piloto.

Apesar de ausentes nas bibliotecas do segundo ano de amostragem da fermentação industrial, *L. silagei* e *Pseudomonas fluorescens* foram persistentes nas bibliotecas do primeiro ano. A espécie *L. silagei*, descrita em 2013 por Tohno e colaboradores, foi isolada de silagem de gramíneas; é anaeróbia facultativa e apresenta crescimento em temperaturas de 15 a 45°C e pH entre 3,5 a 7,5. Bactérias do gênero *Pseudomonas* foram relatadas por Campana (2012) como presentes em diversos biofilmes (dorna, tubulação de água, centrífuga e trocador de calor). Os biofilmes formados pelo patógeno oportunista *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, são bem conhecidos pela alta resistência aos antibióticos (STEWART, 2002).

Algumas diferenças observadas entre as bibliotecas do primeiro e do segundo ano do mesmo sistema fermentativo podem ter ocorrido devido a fatores que influenciam na composição bacteriana do substrato fermentativo, caldo-de-cana e/ou melaço, reportados como uma das principais fontes de contaminantes no processo. Tais fatores estão relacionados às condições ambientais como temperatura, umidade, intensidade de chuva no período e também à origem da cana-de-açúcar e tempo entre a colheita e a moagem (AMORIM et al., 2000; EGGLESTON; MOREL DU BOIL; WALFORD, 2008; GALLO, 1990). Lucena et al. (2010) relataram diferenças no perfil das comunidades bacterianas presentes no início (1 a 30 dias) e no final do período de fermentação nas destilarias (60 a 180 dias).

Na fermentação piloto, a única UTO presente em todas as bibliotecas (UTO Fi12) foi aquela relacionada à *Lactobacillus casei*, que também esteve presente em todas as bibliotecas da fermentação industrial. Isto mostra a onipresença de *L. casei* neste trabalho, sugerindo a importância desta espécie no processo de desenvolvimento dos biofilmes em diferentes condições de fermentação.

Outras UTOs que se destacaram por estarem presentes em 4 ou 5 bibliotecas da fermentação piloto foram as relacionadas a *L. parabuchneri*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Enterococcus* sp., sendo todas descritas em biofilmes da produção de etanol (CAMPANA, 2012; SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2007). *Leuconostoc* e *Enterococcus* também pertencem ao grupo das LAB. Bactérias do gênero *Leuconostoc* produzem vários tipos de glucanas (polissacarídeos) como a dextrana. Apesar de os polissacarídeos serem componentes importantes da matrix extracelular dos biofilmes, a dextrana parece não afetar a habilidade de formação dos biofilmes destas espécies (LEATHERS; BISCHOFF, 2011). *Enterococcus* sp é normalmente encontrado no trato intestinal dos mamíferos. Sua entrada no processo de produção de etanol provavelmente acontece através da água (HEIST, 2009).

As UTOs relacionadas à *L. vini, L. amylovorus* e *Weissella paramesenteroides* tiveram destaque na abundância, mas foram encontradas somente em duas ou uma biblioteca. *Weissella paramesenteroides* foi encontrada como contaminante de amostras de tanque de fermentação (LUCENA et al., 2010; THANH; MAI; TUAN, 2008) e em biofilmes de diversos pontos da fermentação piloto com alto teor alcoólico (CAMPANA, 2012). A UTO Pr19 relacionada à *Pseudomonas fluorescens* (também descrita anteriormente), apesar da pouca abundância, apresentou persistência nas bibliotecas do primeiro ano e esteve ausente nas bibliotecas do segundo ano, exatamente como observado na fermentação industrial.

As variações quanto à presença e ausência de algumas UTOs conforme o período de crescimento dos biofilmes, considerando as bibliotecas do mesmo sistema fermentativo e do mesmo ano de amostragem, eram esperadas já que a sucessão microbiana é um tema comum no desenvolvimento dos biofilmes (DANG et al., 2008; DANG; LOVELL, 2000). Estudos de biofilmes marinhos mostraram mudanças significativas na composição da comunidade bacteriana quando avaliados em períodos de 24 e 72 horas, indicando que novos organismos são recrutados enquanto outros são perdidos; exemplo disto foi *Alteromonas* sp., detectada somente no primeiro estágio de colonização (biofilmes com 24 horas) enquanto que espécies de *Roseobacter* mostram-se onipresentes nestes biofilmes (DANG et al., 2008; DANG; LOVELL, 2000).

Uma semelhança observada nos dois tipos de fermentação foi o maior número de UTOs relacionadas a diferentes gêneros nos biofilmes mais jovens (7 dias) quando comparados com os biofilmes de 14 e 21 dias, exceto na fermentação industrial do segundo ano de amostragem na qual 100% dos clones de todas as bibliotecas foram afiliados a um único gênero, *Lactobacillus*. O menor número de gêneros nos biofilmes mais velhos (14 e 21 dias) pode estar relacionado a um maior tempo de exposição destes biofilmes ao processo fermentativo. Segundo Lucena e colaboradores (2010), as difíceis condições do processo como a presença de antibióticos, alta temperatura, baixo pH e alta concentração de álcool possivelmente exercem uma pressão seletiva sobre a microbiota, levando à seleção de certos tipos resistentes de LAB.

Ainda, os biofilmes com 21 dias foram os que apresentaram maior riqueza de UTOs relacionadas a diferentes espécies de *Lactobacillus*, quando comparados aos biofilmes de 7 e 14 dias. Isto, somado a predominância deste gênero (> 90%) nos biofilmes com 21 dias, reforça a ideia de que os lactobacilos estão altamente adaptados ao processo fermentativo da produção de bioetanol (LUCENA et al., 2010; MURPHREE; HEIST; MOE, 2014), assim como a este nicho particular de complexas relações interespecíficas que é o biofilme. Nele, as bactérias regulam suas atividades cooperativas e processos fisiológicos através do mecanismo conhecido como *quorum-sensing*, nos quais estes micro-organismos se comunicam através da liberação, percepção e resposta a pequenas moléculas sinalizadoras. A habilidade das bactérias na comunicação e comportamento em grupo tem lhes permitido benefícios significativos como a defesa contra competidores e adaptação às mudanças ambientais (LI; TIAN, 2012).

Um número considerável de UTOs (28,9%) apresentaram $\leq 96\%$ de identidade com sequências depositadas no *GenBank* (NCBI). Destas UTOs, 64,3% foram afiliadas ao grupo dos *Lactobacillus*. Segundo Drancourt e Raoult (2005), dois isolados bacterianos irão pertencer a diferentes espécies se a similaridade na sequência do gene 16S rRNA for menor que 97%. Isto indica que várias espécies bacterianas que habitam as dornas de fermentação alcoólica ainda não foram identificadas, muitas delas pertencentes ao grupo *Lactobacillus*, um dos gêneros de maior relevância como contaminante deste ambiente.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura revelaram biofilmes mistos compostos por leveduras e bactérias. A formação dos biofilmes não é restrita às bactérias: *Archaea*, bacteriófagos, eucariotos como protozoários, fungos e algas também são encontrados em comunidades de biofilmes (MCLEAN, 2002). Como a fermentação alcoólica nas destilarias brasileiras é caracterizada pela alta densidade de células de leveduras

(10 - 15% m/v) e pelo constante controle das populações bacterianas (AMORIM et al., 2011), torna-se compreensível o fato das leveduras participarem como colonizadoras primárias das superfícies internas das dornas de fermentação. As imagens de microscopia associadas à quantificação do gene 16S rRNA mostraram uma tendência no aumento da população bacteriana conforme o desenvolvimento dos biofilmes. Em contrapartida, a quantificação do gene 18S rRNA mostrou uma queda na população de leveduras nos biofilmes maduros quando comparada com os biofilmes de 21 dias.

De acordo com Bojsen, Andersen e Regenberg (2012), a levedura *Saccharomyces cerevisiae* segue os padrões comuns dos biofilmes microbianos, com adesão célula-célula e célula-superfície. A formação de biofilmes pelas leveduras envolve um complexo mecanismo que integra informações sobre o estado interno da célula, os nutrientes e diversos estresses ambientais (GRANEK; MAGWENE, 2010). O gene *FLO11* de *S. cerevisiae* codifica uma adesina que está associada a diferentes fenótipos como a aderência a superfícies sólidas, hidrofobicidade e formação de biofilmes (ZARA et al., 2009).

A interação entre leveduras e bactérias na formação de biofilmes mistos tem sido investigada por vários pesquisadores. Combinações de diferentes linhagens de *S. cerevisiae* com *L. casei* subsp. *rhamnosus*, *L. acidophilus* e *Pediococcus acidilactici* mostraram distinta capacidade de formação de biofilmes mistos, sendo que nenhum destes isolados apresentou a formação de biofilme em monocultura (KAWARAI et al., 2007). Em outro estudo, *S. cerevisiae* e *L. plantarum* formaram um espesso biofilme quando co-cultivados em meio estático, diferente do padrão observado quando cultivados separadamente (FURUKAWA et al., 2010). Furukawa e colaboradores (2011) demonstraram que a adesão célula-célula e célula-superfície são controladas por diferentes mecanismos, sugerindo que a co-agregação entre *S. cerevisiae* e *L. plantarum* é mediada por interações entre proteínas da superfície da bactéria e do polissacarídeo manana da superfície da levedura (HIRAYAMA et al., 2012). Segundo Golowczyc e colaboradores (2009), esta co-agregação é mediada pela atividade tipo lectina das proteínas da superfície bacteriana, como observado na interação entre *L. kefir* e *S. lipolytica*.

2.7 Conclusão

As comunidades bacterianas dos biofilmes formados nas dornas de fermentação alcoólica a partir da cana-de-açúcar mostraram a predominância do grupo das bactérias ácidolácticas (LAB), mais especificamente do gênero *Lactobacillus*. Clones relacionados à espécie *L. casei* foram os únicos presentes em todas as bibliotecas, independentemente do período de crescimento dos biofilmes, do processo fermentativo avaliado e do ano de amostragem, indicando a versatilidade desta espécie e sua importância no desenvolvimento destes biofilmes. Análises comparativas das sequências do gene 16S rRNA sugerem que várias espécies bacterianas que habitam as dornas de fermentação alcoólica ainda não foram identificadas, sendo muitas delas afiliadas ao gênero *Lactobacillus*.

A estrutura dos biofilmes revelou que estes são compostos por bactérias e leveduras (biofilmes mistos). Desde que as leveduras participam da formação e desenvolvimento dos biofilmes, os quais afetam negativamente a fermentação alcoólica, esta característica deve ser considerada nos programas de seleção de linhagens de levedura para a produção de bioetanol.

Referências

ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. Scientia Agricola, Piracicaba, v. 60, n. 4, p. 677-681, 2003.

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

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Evolution of ethanol fermentation in Brazil. In: BRYCE, J. H.; STEWART, G. G. (Ed.). **Distilled spirits**: tradition and innovation. v. 1. 1. ed. Nottingham: Nottingham University Press, 2004. cap. 20, p. 143-146.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, D. R.; AUSTIN, G. D.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries. v. 1. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. cap. 5, p. 39–46.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. D.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H.; Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 91, p. 1267-1275, 2011.

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

AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; SILVA, L. F. L.; BERNARDINO, C.; GODOY, A.; ALVES, D. M. G. Impact of sugar cane quality on sugar and alcohol yields. **International Sugar Journal**, London, v. 102, n. 1214, p. 86-88, 2000.

ASH, C.; PRIEST, F. G.; COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test: proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 64, p. 253-260, 1993.

BAYROCK, D. P.; INGLEDEW, W. M. Inhibition of yeast by lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity? Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Hampshire, v. 31, p. 362–368, 2004.

BOJSEN, R. K.; ANDERSEN, K. S.; REGENBERG, B. *Saccharomyces cerevisiae* – a model to uncover molecular mechanisms for yeast biofilm biology. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 65, p. 169–182, 2012.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v. 36, p. 214-216, 2004.

CAMPANA, F. B. **Monitoramento temporal e espacial de contaminações bacterianas na produção de bioetanol**: caracterização molecular por T-RFLP e detecção quantitativa por qPCR de comunidades formadoras de biofilmes. 2012. 170 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

CERI, H.; OLSON, M. E.; STREMICK, C.; READ, R. R.; MORCK, D.; BURET, A. The calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 37, n. 6, p. 1771–1776, 1999.

CHANG, I. S.; KIM, B. H.; SHIN, P. K.; LEE, W. K. Bacterial contamination and its effects on ethanol fermentation. Journal of Microbiology and Biotechnology, Seoul, v. 5, n. 6, p. 309-314, 1995.

COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAIN, B.; FARRIS, R. J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN; A. S.; MCGARRELL, D. M.; MARSH, T.; GARRITY, G. M.; TIEDJE; J. M.. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, (Database issue):D141-145, 2009.

DANG, H.; LI, T.; CHEN, M.; HUANG, G. Cross-ocean distribution of *Rhodobacterales* bacteria as primary surface colonizers in temperate coastal marine waters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 74, n. 1, p. 52–60, 2008.

DANG, H.; LOVELL, C. R. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 66, n. 2, p. 467–475, 2000.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 64, n. 4, p. 847–867, 2000.

DAVIES, D. G. Regulatory events in biofilm development. In: McLEAN, R. J. C.; DECHO, A. W. (Ed.). **Molecular ecology of biofilms**. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2002. cap. 3, p. 57-82.

DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 43, n. 9, p. 4311–4315, 2005.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 15, n. 2, p. 155-166, 2002.

EGGLESTON, G.; MOREL, DU BOIL, P. G.; WALFORD, S. N. A review of sugarcane deterioration in the United States and South Africa. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 81, p. 72-85, 2008.

ENDO, A.; OKADA, S. *Lactobacillus farraginis* sp. nov. and *Lactobacillus parafarraginis* sp. nov., heterofermentative lactobacilli isolated from a compost of distilled shochu residue. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, p. 708–712, 2007.

FURUKAWA, S.; NOJIMA, N.; YOSHIDA, K; HIRAYAMA, S.; OGIHARA, H.; MORINAGA, Y. The importance of inter-species cell-cell co-aggregation between *Lactobacillus plantarum* ML11-11 and *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 in mixed-species biofilm formation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 75, n. 8, p. 1430-1434, 2011.

FURUKAWA, S.; YOSHIDA, K.; OGIHARA, H.; YAMASAKI, M.; MORINAGA, Y. Mixed-species biofilm formation by direct cell-cell contact between brewing yeasts and lactic acid bacteria. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 74, n. 11, p. 2316-2319, 2010.

G-ALEGRÍA, E.; LÓPEZ, I.; RUIZ, J. I.; SÁENZ, J.; FERNÁNDEZ, E.; ZARAZAGA, M.; DIZY, M.; TORRES, C.; RUIZ-LARREA, F. High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 230, p. 53-61, 2004.

GALLO, C. R. Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica. 1990. 388 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.

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

GOLOWCZYC, M. A.; MOBILI, P.; GARROTE, G. L.; SERRADELL, M. A.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. **Journal of Dairy Research**, London, v. 76, p. 111–116, 2009.

GOOD, I. J. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. **Biometrika**, London, v. 40, n. 3/4, p. 237-264, 1953.

GRANEK, J. A.; MAGWENE, P. M. Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 6, n. 1, e1000823, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, London, v. 41, p. 95-98, 1999.

HEIST, P. Identifying, controlling the most common microbial contaminants. **Ethanol Producer Magazine**, Grand Forks, 2009. Disponível em: http://www.ethanolproducer.com/articles/5464/ identifying-controlling-the-most-common-microbial-contaminants/>. Acesso em: 15 set. 2014.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. H. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gelelectrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, n. 8, p. 3233–3241, 1997.

HIRAYAMA, S.; FURUKAWA, S.; OGIHARA, H.; MORINAGA, Y. Yeast mannan structure necessary for co-aggregation with *Lactobacillus plantarum* ML11-11. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 419, p. 652–655, 2012.

KAWARI, T.; FURUKAWA, S.; OGIHARA, H.; YAMASAKI, M. Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, n. 14, p. 4673–4676, 2007.

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

LAWRENCE, J. R.; KORBER, D. R.; HOYLE, B. D.; COSTERTON; J. W.; CALDWELL, D. E. Optical sectioning of microbial biofilms. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 173, n. 20, p. 6558-6567, 1991.

LEATHERS, T. D.; BISCHOFF, K. M. Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 33, p. 517–523, 2011.

LI, Y. H.; TIAN, X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. Sensors, Basel, v. 12, p. 2519-2538, 2012.

LUCENA, B. T. L.; DOS SANTOS, B. M.; MOREIRA, J. L. S.; MOREIRA, A. P. B.; NUNES, A. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A.; THOMPSON, F. L.; MORAIS, M. A. Diversity of latic acid bacteria of the bioethanol process. **BMC Microbiology**, London, v. 10, p. 298-305, 2010.

LUDWIG, K. M.; OLIVA-NETO, P.; DE ANGELIS, D. F. Quantificação da floculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 1, p. 63-68, 2001.

LUSHIA, W.; HEIST, P. Antibiotic resistant bacteria in fuel ethanol fermentations. **Ethanol Producer Magazine**, Grand Forks, p. 80–82, 2005.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R. F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian** Journal of Microbiology, Rio de Janeiro, v. 42, p. 693-702, 2011.

MARCHESI, J. R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A. J.; MARTIN, T. A.; FRY, J. C.; HIOM, S. J.; WADE, W. G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16s rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 64, n. 2, p. 795–799, 1998.

McLEAN, R. J. C. An overview of biofilm molecular ecology. In: McLEAN, R. J. C.; DECHO, A. W. (Ed.). Molecular ecology of biofilms. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2002. cap. 1, p. 1-21.

MURPHREE, C. A.; HEIST, E. P.; MOE, L. A. Antibiotic resistance among cultured bacterial isolates from bioethanol fermentation facilities across the United States. **Current Microbiology**, New York, v. 69, n. 3, p. 277-285, 2014.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 37, p. 351-370, 2011.

MUTHAIYAN, A.; RICKE, S. C. Current perspectives on detection of microbial contamination in bioethanol fermenters. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 5033–5042, 2010.

NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 63, p. 4158-4163, 1997.

NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, n. 5, p. 2239–2243, 2005.

NARVÁEZ-ZAPATA, J. A.; ROJAS-HERRERA, R. A.; RODRÍGUEZ-LUNA, I. C.; LARRALDE-CORONA, C. P. Culture-independent analysis of lactic acid bacteria diversity associated with mezcal fermentation. **Current Microbiology**, New York, v. 61, p. 444–450, 2010.

NOBRE, T. P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. 2005. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

PASSOTH, V.; BLOMQVIST, J.; SCHNURER, J. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, n. 13, p. 4354–4356, 2007.

RICH, J. O.; LEATHERS, T. D.; NUNNALLY, M. S.; BISCHOFF, K. M. Rapid evaluation of the antibiotic susceptibility of fuel ethanol contaminant biofilms. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, p. 1124–1130, 2011.

ROSALES, S. Y. R. **Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica**: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfectantes. 1989. 200 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 1989.

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

SCHELL, D. J.; DOWE, N.; IBSEN, K. N.; RILEY, C. J.; RUTH, M. F.; LUMPKIN, R. E. Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, p. 2942–2948, 2007.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER; C. F. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SHARMIN, F.; WAKELIN, S.; HUYGENS, F.; HARGREAVES, M. *Firmicutes* dominate the bacterial taxa within sugar-cane processing plants. **Scientific Reports**, London, v. 3, p. 1-7, 2013.

SHIH, I. L.; YU, Y. T.; SHIEH, C. J.; HSIEH, C. Y. Selective production and characterization of levan by *Bacillus subtilis* (natto) Takahashi. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, DC, v. 53, p. 8211-8215, 2005.

SIMPSON, K. L.; PETTERSSON, B.; PRIEST, F. G. Characterization of lactobacilli from Scotch malt whisky distilleries and description of *Lactobacillus ferintoshensis* sp. nov., a new species isolated from malt whisky fermentations. **Microbiology**, Reading, v. 147, p. 1007–1016, 2001.

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

SKINNER-NEMEC, K. A.; NICHOLS, N. N.; LEATHERS, T. D. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 29, p. 379–383, 2007.

SNELL, E. E. The nutritional requirements of the lactic acid bacteria and their application to biochemical research. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 50, n. 4, p. 373-82, 1945.

SOUZA, R. B.; SANTOS, B. M.; SOUZA, R. F. R.; SILVA, P. K. N.; LUCENA, B. T. L.; MORAIS JUNIOR, M. A. The consequences of *Lactobacillus vini* and *Dekkera bruxellensis* as contaminants of the sugarcane-based ethanol fermentation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Hampshire, v. 39, p. 1645–1650, 2012.

STEVEN, B.; CHEN, M. Q.; GREER, C. W.; WHYTE, L. G.; NIEDERBERGER, T. D. *Tumebacillus permanentifrigoris* gen. nov., sp. nov., an aerobic, spore-forming bacterium isolated from Canadian high Arctic permafrost. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 58, p. 1497–1501, 2008.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. International Journal of Medical Microbiology, Amsterdam, v. 292, p. 107-113, 2002.

STIRLING, D. DNA extraction from fungi, yeast and bacteria. In: BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. (Ed.). **Methods in molecular biology**: PCR protocols. 2. ed. Totowa: Humana Press, 2003. cap. 13, p. 53-54.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TIUKOVA, I.; EBERHARD, T.; PASSOTH, V. Interaction of *Lactobacillus vini* with the ethanol-producing yeasts *Dekkera bruxellensis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology** and **Applied Biochemistry**, Malden, v. 61, n. 1, p. 40-44, 2014.

THANH, V. N.; MAI, L. T.; TUAN, D. A. Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters (bahn men) as determined by PCR-mediated DGGE. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 128, p. 268-273, 2008.

THOMAS, K.C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, p. 819-828, 2001.

TODAR, K. The genus *Bacillus*. In: _____. (Ed.). **Todar's online textbook of bacteriology**. Madison: University of Wisconsin, 2012. Disponível em: http://textbookofbacteriology.net/Bacillus_3.html. Acesso em: 10 set. 2014.

TOHNO, M.; KITAHARA, M.; IRISAWA, T.; MASUDA, T.; UEGAKI, R.; OHKUMA, M.; TAJIMA, K. *Lactobacillus silagei* sp. nov., isolated from orchardgrass silage. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Reading, v. 63, p. 4613–4618, 2013.

VAN ELSAS, J. D.; DUARTE, G. F.; KEIJZER-WOLTERS, A.; SMIT, E. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 43, p. 133–151, 2000.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M.; COLE, J. R. Naïve Bayesian Classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WRIGHT, E. S. DECIPHER - a search-based approach to chimera identification for 16s rRNA sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 78, n. 3, p. 717-725, 2012.

YAMADA, Y.; YUKPHAN, P.; VU, H. T. L.; MURAMATSU, Y.; OCHAIKUL, D.; TANASUPAWAT, S.; NAKAGAWA, Y. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). Journal of General and Applied Microbiology, Tokyo, v. 58, p. 397–404, 2012.

ZARA, G.; ZARA, S.; PINNA, C.; MARCEDDU, S.; BUDRONI, M. *FLO11* gene length and transcriptional level affect biofilm-forming ability of wild flor strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, Reading, v. 155, p. 3838–3846, 2009.

3 SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR BACTÉRIAS CONTAMINANTES DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Resumo

Micro-organismos em um biofilme (células sésseis) apresentam características fisiológicas distintas daqueles de vida-livre (células planctônicas), principalmente em relação à resistência aos antibióticos e desinfetantes. No presente estudo, a suscetibilidade aos antimicrobianos (monensina, virginiamicina e beta-ácido derivado do lúpulo) e a capacidade de formação de biofilme em cultura pura foram avaliadas para bactérias contaminantes da fermentação alcoólica isoladas de vinho bruto (fonte de células planctônicas) e de biofilmes (fonte de células sésseis) formados dentro dos tanques de fermentação. Neste contexto, dois tipos de fermentação foram avaliados: fermentação industrial (com teor alcoólico em torno de 9%) e fermentação de uma unidade piloto (com teor alcoólico entre 11 e 16%). Um total de 50 isolados foi obtido, sendo todos pertencentes ao gênero Lactobacillus. Diferenças na sensibilidade aos antimicrobianos puderam ser observadas entre os isolados da mesma espécie. Para os isolados da fermentação industrial, não houve uma relação entre suscetibilidade aos antimicrobianos e fonte de isolamento; já na fermentação piloto, L. casei, L. brevis e L. plantarum originários do biofilme apresentaram menor sensibilidade ao betaácido quando comparados, dentro da própria espécie, com aqueles oriundos do vinho (com exceção de dois isolados de L. plantarum do vinho que apresentaram perfil semelhante aos do biofilme). Ainda, isolados de L. brevis do biofilme também foram menos sensíveis à monensina do que os do vinho. Por outro lado, os isolados de L. acidipiscis do vinho foram resistentes à virginiamicina, o que não ocorreu para o isolado do biofilme. Quanto à capacidade de formação de biofilmes em cultura pura, diferenças também puderam ser observadas entre os isolados da mesma espécie, não havendo relação com a fonte de isolamento para aqueles da fermentação industrial. Em contrapartida, na fermentação piloto, as amostras obtidas a partir de biofilmes apresentaram uma predominância de isolados altamente produtores de biofilmes, enquanto que as provenientes do vinho foram predominadas por isolados moderadamente produtores de biofilme. Neste caso, houve uma correlação negativa para L. plantarum e positiva para L. casei entre a propensão em formar biofilme e a sensibilidade ao beta-ácido. Os resultados demonstraram que, em alguns casos, o perfil apresentado tanto para a suscetibilidade aos antimicrobianos como para a capacidade de formação de biofilmes foi influenciado pela fonte de isolamento do micro-organismo. Este foi o primeiro estudo envolvendo a capacidade de formação de biofilmes por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica da cana-de-açúcar, assim como a suscetibilidade aos antimicrobianos de isolados provenientes de biofilmes dos tanques de fermentação.

Palavras-chave: contaminação bacteriana, bioetanol, *Lactobacillus*, sensibilidade aos antimicrobianos, TSA.

3 ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AND BIOFILM FORMATION BY BACTERIAL CONTAMINANTS OF FUEL ETHANOL FERMENTATION

Abstract

The physiology of microorganisms within a biofilm (sessile cells) differs significantly from those growing planktonically (free-living cells), particularly with respect to high resistance to antibiotics and disinfectants. In the present study, antimicrobial susceptibility (monensin, virginiamicin and beta-acids from hops) and biofilm formation in pure culture were assessed for bacteria contaminants of sugarcane-based ethanol fermentation, isolated from wine (source of planktonic cells) and biofilms (source of sessile cells) in fermentation tanks. In this context, two types of fermentation were evaluated: industrial fermentation (with alcoholic content around 9%) and fermentation of a pilot unit (with alcoholic content between 11 and 16%). Fifty isolates belonging to genus Lactobacillus were obtained. Differences in antimicrobial sensitivity were observed among isolates of the same species. For industrial fermentation, no relation was observed between antimicrobial susceptibility and isolation source; for pilot fermentation, L. casei, L. brevis and L. plantarum isolated from biofilm showed less sensitivity to beta-acids when compared, within species, to those from wine (with exception of two L. plantarum isolates from wine that were similar to those from biofilm). Moreover, biofilm isolates of L. brevis were also less susceptible to monensina than those from wine. On the other hand, L. acidipiscis isolates from wine, but not from biofilm, were resistant to virginiamicin. In regard to the ability to form biofilms in pure culture, differences were observed within species, with no relation to isolation source for isolates from industrial fermentation. However, for pilot fermentation, samples obtained from biofilms were dominated by high biofilm producers while wine samples were mainly composed by moderate biofilm producers. In this fermentation, the propensity for biofilm formation and the susceptibility to beta-acids from hops showed a negative and positive correlation for L. plantarum and L. casei, respectively. The results showed that, in some cases, both biofilm formation and antimicrobial susceptibility were influenced by isolation source. This was the first investigation concerning the ability of biofilm formation by bacteria contaminants of sugarcane-based ethanol fermentation as well as the antimicrobial susceptibility of isolates from biofilms formed in fermentation tanks.

Keywords: bacterial contamination, bioethanol, Lactobacillus, antimicrobial sensitivity, AST.

3.1 Introdução

Um dos grandes problemas da fermentação alcoólica em larga escala é a contaminação bacteriana, a qual reduz significativamente a produtividade do etanol. Em alguns casos, as contaminações atingem 10⁸ UFC/ml causando perdas de 10.000 a 30.000 litros de etanol por dia em uma destilaria que produz 1 milhão de litros/dia (AMORIM et al., 2011). Dependendo de sua magnitude, as contaminações podem impossibilitar a fermentação levando à interrupção de todo o processo fermentativo para a execução dos procedimentos de assepsia que incluem, por exemplo, limpeza das moendas, tubulações e instalações da fermentação, centrifugação do fermento e tratamento ácido ou, até mesmo, reintrodução de um novo fermento (LOPES; SILVA, 2011; MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011; RICH et al., 2011).

As usinas produtoras de etanol geralmente controlam os problemas de contaminação bacteriana com o tratamento ácido durante o reciclo das leveduras e com o uso de biocidas químicos, antibióticos e antimicrobianos naturais (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009). A aplicação de antibióticos nos tanques de fermentação, tanto de forma profilática como em resposta aos elevados níveis de ácidos orgânicos (BAYROCK; THOMAS; INGLEDEW, 2003), tem sugerido a seleção de resistência entre os contaminantes, podendo limitar a eficácia destes agentes (BISCHOFF; SKINNER-NEMEC; LEATHERS, 2007; LUSHIA; HEIST, 2005). Além disto, muitos produtores de etanol vendem o fermento seco para a alimentação animal (FERNANDES et al., 1998) e os mercados internacionais têm se tornado cada vez mais rigorosos na questão do uso de antibióticos em produtos destinados ao consumo animal com o intuito de reduzir e/ou eliminar esta prática (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011).

Atualmente há uma tendência para o uso de agentes antimicrobianos naturais como os beta-ácidos derivados do lúpulo, a fim de reduzir os impactos dos antibióticos no ambiente (AMORIM; BASSO; LOPES, 2009). Entretanto, os compostos derivados do lúpulo estão sujeitos ao desenvolvimento de resistência bacteriana como qualquer outro antimicrobiano e têm provocado resistência entre algumas bactérias produtoras de ácido-lático (LAB) contaminantes da produção de cerveja (SUZUKI et al., 2006).

As contaminações endêmicas persistentes nos tanques de fermentação alcoólica têm sido associadas aos biofilmes (SKINNER; LEATHERS, 2004; SKINNER-NEMEC; NICHOLS; LEATHERS, 2007). A fisiologia dos micro-organismos em biofilmes (células sésseis) difere significativamente dos micro-organismos planctônicos (células em suspensão),

principalmente no que diz respeito à resistência aos antibióticos e desinfetantes (McLEAN, 2002). Em um biofilme, o estado fisiológico das células é heterogêneo sendo determinado pela posição individual da célula em relação às múltiplas camadas celulares que formam um biofilme. As células localizadas na região superior do biofilme têm livre acesso aos nutrientes, ao oxigênio e têm menos problemas com os resíduos metabólicos; estas células são metabolicamente ativas e com características semelhantes àquelas que vivem de forma planctônica. Já as células do interior dos biofilmes têm acesso restrito aos nutrientes essenciais e ao oxigênio, além de enfrentarem problemas associados ao acúmulo de resíduos metabólicos, uma vez que estes produtos são constantemente removidos do meio. Entretanto, estas células estão mais sujeitas a uma variedade de situações adversas de natureza química, física e biológica (ANWAR; STRAP; COSTERTON, 1992).

Bactérias em biofilmes apresentam uma redução na sensibilidade aos antibióticos quando comparadas com células da mesma estirpe crescidas em suspensão. Esta característica ocorre devido a um conjunto de fatores como a penetração dificultada dos antibióticos, limitação de nutrientes, baixa taxa de crescimento, resposta adaptativa ao estresse e formação de células persistentes (bactérias em estado de dormência temporariamente hiper-resistentes aos antimicrobianos) (STEWART, 2002).

Pesquisas têm sido realizadas sobre potenciais formas de combate aos biofilmes incluindo novos agentes antimicrobianos, abordagens físico-químicas, tratamentos enzimáticos e inibidores de *quorum-sensing* (BELOIN et al., 2014; YANG et al., 2012). Todavia, os biofilmes continuam sendo um grande problema no cenário clínico e industrial, e pouco se sabe a respeito dos biofilmes envolvendo espécies do gênero *Lactobacillus*, particularmente das estirpes contaminantes da fermentação alcoólica para produção de etanol (LEATHERS et al., 2014). Neste contexto, há uma ausência de estudos tanto sobre a capacidade de formação de biofilmes pelas bactérias contaminantes da fermentação alcoólica a partir da cana-de-açúcar, bem como se a fonte de isolamento dos micro-organismos (células sésseis do biofilme e células planctônicas do vinho) influencia no perfil apresentado para a propensão em formar biofilmes e para a sensibilidade aos principais antimicrobianos utilizados nas destilarias brasileiras.

3.2 Hipótese

Este estudo buscou testar a hipótese de que bactérias contaminantes da fermentação alcoólica da cana-de-açúcar, isoladas dos biofilmes formados nos tanques de fermentação (células sésseis), podem responder diferentemente daquelas isoladas do vinho (células planctônicas) quanto à sensibilidade aos antimicrobianos e habilidade de formar biofilmes em culturas puras.

3.3 Objetivos

3.3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar a suscetibilidade aos antimicrobianos e a capacidade de formação de biofilmes de bactérias isoladas dos biofilmes formados nos tanques de fermentação alcoólica (fonte de células sésseis) e do vinho bruto (fonte de células planctônicas).

3.3.2 Objetivos específicos

A fim de concretizar o objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Avaliar a sensibilidade dos diferentes isolados bacterianos em relação à monensina, virginiamicina e ao beta-ácido derivado do lúpulo, frequentemente utilizados nas destilarias brasileiras, através do método de disco-difusão em ágar.
- Verificar a capacidade de formação de biofilme dos isolados através de ensaio colorimétrico baseado na coloração com cristal violeta.

3.4 Material e métodos

3.4.1 Coleta das amostras

Amostras de biofilmes e vinho bruto provenientes da fermentação alcoólica foram coletadas no mês de novembro de 2013, na mesma usina referida no item 2.4.1 (estudo anterior). Dois tipos de fermentação foram independentemente avaliados:

fermentação em escala industrial com teor alcoólico em torno de 9% (v/v) e fermentação em escala piloto, com teor alcoólico entre 11 e 16% (v/v). Além do teor alcoólico, as fermentações apresentaram diferenças quanto à linhagem de levedura, mosto, temperatura e tempo de fermentação, tipo e frequência dos antibióticos utilizados (Tabela 1).

Parâmetros de avaliação*	Fermentação Industrial	Fermentação Piloto
Linhagem de levedura	Mix de Saccharomyces	Fermel
Teor Alcoólico	8 a 9% (v/v)	11 a 16% (v/v)
Mosto	Misto (caldo e melaço)	Melaço
Volume das dornas	600 m^3	$2,5 \text{ m}^3$
Sistema de refrigeração	Trocador de calor	Trocador de calor e chiller
Média das temperaturas máximas	36,6°C	31,5°C
Tempo de fermentação	8 a 10 horas	16 a 20 horas
Antimicrobiano	Monensina (1 aplicação)	-
Biocida químico	Dióxido de cloro (1 aplicação)	-
Lavagem das dornas	Flegmaça	Água de poço artesiano
Sistema de lavagem	Spraying System	Mangueira

Tabela 1 - Principais diferenças entre a fermentação alcoólica do processo industrial e da unidade piloto

* Durante o período de amostragem

Para a obtenção das amostras de biofilmes, matrizes de aço inox (4 cm x 10 cm) foram colocadas dentro das dornas de fermentação alcoólica, com o auxílio de arame galvanizado. As matrizes, posicionadas no terço superior das dornas, foram expostas ao processo fermentativo durante 24 dias para a fermentação piloto e 28 dias para a fermentação industrial. Durante o período de incubação, os biofilmes foram expostos ao processo regular de limpeza das dornas, consistindo na sua lavagem após cada ciclo fermentativo.

Após o período de crescimento dos biofilmes, as matrizes foram coletadas em recipientes plásticos e cobertas com vinho da própria fermentação (200 ml). Os recipientes haviam sido previamente lavados com detergente, enxaguados em água corrente, mergulhados em álcool, enxaguados em água destilada, secos a temperatura ambiente e tratados com luz U.V. por 30 min. Em paralelo, 30 ml de vinho foram recolhidos em tubos Falcon estéreis, os quais foram acondicionados em isopor contendo gelo picado. As amostras de biofilme e vinho, coletadas em triplicata, foram imediatamente transportadas para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular (CENA/USP).
3.4.2 Isolamento, purificação e preservação das culturas bacterianas

Em fluxo laminar, as matrizes de aço foram lavadas quatro vezes em solução salina (0,85%) estéril para a remoção das células planctônicas não-aderidas e submetidas ao esfregaço de superfície com o auxílio de um *swab* estéril. Os biofilmes, recolhidos pela técnica de esfregaço, foram ressuspendidos em 300 μ l de solução salina (0,85%) estéril para posterior diluição em série (10⁻¹ a 10⁻⁴). Alíquotas de 100 μ l do tubo original e de cada uma das diluições foram utilizadas para o plaqueamento. Para as amostras de vinho foram feitas diluições em série de 10⁻¹ a 10⁻⁷, sendo as alíquotas de 100 μ l das diluições de 10⁻³ a 10⁻⁷ utilizadas no plaqueamento.

Os plaqueamentos foram feitos em meio MRS ágar (Difco, E.U.A.) originalmente desenvolvido por De Man, Rogosa e Sharp (1960) para favorecer o crescimento de bactérias do gênero *Lactobacillus*, embora também permita o crescimento de outros gêneros da ordem *Lactobacillales* como *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Os meios foram acrescidos de ciclohexamida (10 μ g/ml) (Inlab, Brasil) a fim de inibir o crescimento das leveduras presente nas amostras. As placas foram mantidas em câmara de crescimento a 37°C, durante 48 horas.

Após o período de incubação e em ambiente asséptico, algumas colônias foram individualmente reinoculadas em meio de composição idêntica ao original, através do método de estrias de esgotamento, sendo posteriormente colocadas em câmara de crescimento a 37°C por 48 horas. Para a purificação destes isolados, este procedimento de repicagem foi realizado três vezes para que, então, as colônias fossem individualmente inoculadas em 5 ml de caldo MRS e incubadas a 37°C por 48 horas.

Ao final do período de crescimento em meio líquido, estoques foram feitos com alíquotas de 750 μ l das culturas puras, recolhidas em duplicata, para preservação em glicerol 15% (v/v) a -80°C. O restante da cultura foi utilizado para a extração de DNA total.

3.4.3 Extração de DNA total

O DNA total das bactérias foi extraído conforme o protocolo de Stirling (2003). Brevemente, 1,5 ml da suspensão bacteriana (item 3.4.2) foi centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 400 µl do tampão A (Triton-X 2%; SDS 1%; 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8 e água ultrapura), sendo posteriormente transferido para novo tubo plástico (2,0 ml) contendo 220 mg de pérolas de vidro 0,1 mm. Após a adição de 200 µl de fenol e 200 µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), a amostra foi homogeneizada durante 3 min, com o auxílio de vórtex. Em seguida, foram adicionados 400 µl de T.E. (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA pH 8) e a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo no qual foi misturado a 1 ml de etanol absoluto, sendo novamente centrifugado a 14.000 rpm por 4 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 400 µl de T.E. (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA pH 8) para então, ser acrescido de 10 µl de acetato de amônio (4M) e 1 ml de etanol absoluto, homogeneizado e o precipitado a 14.000 rpm durante 4 min. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o precipitado e o precipitado, após secagem a temperatura ambiente por aproximadamente 30 min, foi ressuspendido em 40 µl de Tris-RNAse (10 mM Tris-HCl pH 8; 10 µg/µl de RNAse), incubado a 37°C por 30 min e armazenado a -20° C.

Para a verificação da qualidade do DNA, uma alíquota de 5 μ l de cada amostra foi acrescida de 2 μ l de tampão de carregamento (sacarose 40%; azul de bromofenol 0.25%) e aplicada em gel de agarose 1% corado com *GelRedTM Nucleic Acids Stain* (Biotium) para uma corrida eletroforética em tampão TSB 1X (BRODY; KERN, 2004) a 90 V, por aproximadamente 30 minutos. A quantificação das amostras foi feita por espectrofotometria utilizando o *Nanodrop* 2000c (Thermo Fisher Scientific), adotando-se a relação de 1,0 de densidade ótica a 260 nm (DO₂₆₀) como sendo 50 ng de DNA/ μ l (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

3.4.4 Identificação das bactérias por sequenciamento

A identificação dos isolados bacterianos foi feita através da análise da sequência do gene 16S rRNA amplificado por PCR tanto a partir de DNA total extraído das culturas puras (item 3.4.3) como também do produto de lise celular. Neste último caso, uma colônia de cada um dos isolados foi assepticamente recolhida com palito esterilizado e inoculada individualmente em 50 µl de T.E. (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA pH 8) contidos em tubos de PCR (300 µl). Para o rompimento das células e liberação do DNA no meio, os tubos foram incubados a 96°C por 15 min no termociclador *GeneAmp*® *PCR System 9700* (PE Applied Biosystems). As amostras foram mantidas a -20°C até o momento de sua utilização nas reações de PCR.

O gene bacteriano 16S rRNA foi amplificado através de PCR utilizando os *primers* universais para o domínio *Bacteria* fD1 (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG et al., 1991). Os componentes da reação

foram: 2,5 μl de *PCR Rxn Buffer* (10x) (Invitrogen), 0,25 μl de dNTPs (10 mM), 0,75 μl de MgCl₂ (50 mM), 1 μl de cada *primer* (5 pmoles) (Bioneer), 0,2 μl de *Platinum*® *Taq DNA polimerase* (5 U/μl) (Invitrogen), 2 μl de DNA extraído das culturas puras ou 1 μl do produto de lise, e água ultrapura (Milli-Q) autoclavada para um volume final de 25 μl. As amplificações foram feitas no termociclador *GeneAmp*® *PCR System 9700* (PE Applied Biosystems) conforme o seguinte programa: desnaturação inicial a 96°C por 4 min, 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 2 min, tendo uma extensão final a 72°C por 10 min. Uma alíquota de 5 μl do produto da PCR foi utilizada para verificação do tamanho esperado dos *amplicons* (~1.500 pb) por comparação com o padrão molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen) em gel de agarose 1% corado com *GelRedTM Nucleic Acids Stain* (Biotium), após corrida eletroforética a 90 V por 30 min, em tampão TSB 1X (BRODY; KERN, 2004). O restante do produto da PCR (20 μl) foi purificado utilizando o kit *IllustraTM GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante, para posterior sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram feitas, individualmente, com quatro *primers* universais para o gene 16S rRNA de bactéria: fD1 e rD1 (mencionados anteriormente) (*primers* externos), e 704F (5'-GTAGSGGTGAAATSCGTAGA-3') e 685R (5'-TCTA CGSATTTCCACCSCTAC-3') (JOHNSON, 1994) (*primers* internos). As reações, preparadas em microplaca de 96 cavidades, foram compostas por 1,5 µl dos produtos de PCR purificados, 2 µl de *BigDye Terminator Ready v.3.1* (Applied Biosystems), 1 µl do *primer* (5 pmoles), 2 µl do tampão de sequenciamento 2X (Applied Biosystems) e 3,5 µl de água ultrapura (Milli-Q) autoclavada, totalizando um volume de 10 µl. As amplificações foram realizadas no termociclador *GeneAmp*® *PCR System 9700* (PE Applied Biosystems) de acordo com o programa que constituiu em uma desnaturação inicial a 96°C por 1 min, seguida por 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 15 s, anelamento a 55°C por 10 s e extensão a 60°C por 4 min.

Após a amplificação, as amostras foram precipitadas pela adição de 2 µl de acetato de sódio 3M/EDTA 125 mM e 60 µl de etanol absoluto, homogeneizadas com o auxílio de vórtex e centrifugadas a 4.000 rpm, por 45 min a 10°C (Centrifuga Eppendorf, modelo 5804R). O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 150 µl de etanol 70%. Após centrifugação a 4.000 rpm, por 15 min a 10°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco em estufa a 45°C por 7 min. As amostras foram armazenadas a - 20°C até o momento do sequenciamento, realizado no sequenciador automático *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

A partir das sequências parciais geradas pelos 4 *primers* utilizados para cada um dos isolados bacterianos, foram montadas sequências consenso com o auxílio do *software CodonCode Aligner v.5.0.2* (CodonCode Co., EUA). Cada base da sequência apresentou pelo menos duas leituras independentes para que ela fosse considerada. As sequências consenso foram verificadas quanto à formação de quimeras através do DECIPHER (WRIGHT et al., 2012) e submetidas ao algoritmo BLASTN (Nucleotide BLAST - Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al., 1990), permitindo sua comparação com outras sequências de nucleotídeos depositadas no *GenBank*-NCBI (National Center of Biotechnology Infomation – E.U.A), DDBJ (DNA DataBank of Japan) e EMBL (European Molecular Biology Laboratory).

3.4.5 Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

Com o intuito de comparar os isolados bacterianos provindos do vinho com aqueles dos biofilmes, o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA), também conhecido como antibiograma, foi realizado para três antimicrobianos frequentemente utilizados nas destilarias brasileiras, os quais foram gentilmente cedidos pela empresa Fermentec: monensina (antibiótico), virginiamicina (antibiótico) e beta-ácido derivado do lúpulo (antimicrobiano natural).

Inicialmente, uma colônia de uma cultura crescida por 48 horas a 35°C em meio MRS ágar (Difco, E.U.A.) foi inoculada em 5 ml de caldo MRS contidos em tubo de ensaio. Após incubação a 35°C por 16 horas, subamostras da suspensão bacteriana foram recolhidas em tubos Eppendorf (1,5 ml) para a determinação da densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro *UV/VIS Spectrometer Lambda Bio* (Perkin Elmer) e ajuste do inóculo através da adição de caldo MRS até uma DO de 0,3, correspondendo entre 1 a 2 x 10^8 UFC/ml. Esta relação entre densidade ótica da suspensão bacteriana e número de unidades formadoras de colônias foi previamente estabelecida para alguns dos microorganismos teste, de acordo com o descrito por Lelliott e Stead (1987).

A condução do TSA foi feita pelo método de disco-difusão (BAUER et al., 1966). Um *swab* estéril foi introduzido no tubo contendo o inóculo com 10^8 UFC/ml e, após a remoção do excesso de líquido pela compressão do mesmo contra a parede do tubo, foi utilizado para semear a superfície do meio MRS ágar de 4 mm de espessura, em três direções, a fim de permitir o crescimento confluente. Após 10 minutos para a absorção do inóculo, discos de 5 mm de diâmetro (confeccionados a partir de papel de filtro Whatman, n° 1 e previamente

esterilizados), contendo 10 µl do agente antimicrobiano, foram adequadamente posicionados na superfície do ágar com o auxílio de uma pinça histológica de ponta fina. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas e o diâmetro dos halos de inibição dos micro-organismos ao redor dos discos foi medido com um paquímetro digital (Pantec). Quanto maior o halo, maior a suscetibilidade do micro-organismo ao antimicrobiano em teste.

O TSA foi realizado em duplicata para cada um dos isolado. Em todos os plaqueamentos, os discos foram aplicados em triplicata para cada antimicrobiano e um disco contendo etanol absoluto foi utilizado como controle negativo, sendo este posicionado no centro das placas (Figura 1). Duas estirpes da Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas Celulares (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen – DSMZ) também foram incluídas nos testes: *Lactobacillus casei* (DSM 20011) e *Leuconostoc paramesenteroides* (DSM 20193). Os resultados foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey através *software* R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) utilizando o pacote *agricolae*.



Figura 1 – Esquema ilustrativo da posição dos discos contendo monensina (M), virginiamicina (V), beta-ácido derivado do lúpulo (B) e etanol (-) (controle negativo) para o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

3.4.6 Ensaio de formação de biofilme

O ensaio de formação de biofilme foi realizado conforme Al-Ahmad e colaboradores (2014), com algumas modificações. Primeiramente, uma colônia de uma cultura crescida por

48 horas a 35°C em meio MRS ágar (Difco, E.U.A.) foi utilizada para inocular 5 ml de caldo MRS contidos em tubo de ensaio. Após incubação a 35°C por 16 horas, subamostras da suspensão bacteriana foram recolhidas em tubos Eppendorf (1,5 ml) para a determinação do log¹⁰ da unidade formadora de colônia, através de leitura da densidade ótica a 600 nm, em espectrofotômetro UV/VIS Spectrometer Lambda Bio (Perkin Elmer), como descrito no item 3.4.5. Após o ajuste do inóculo para 10⁸ UFC/ml (DO_{600nm} 0,3), uma alíquota de 20 µl foi transferida para microplacas de poliestireno com 96 cavidades de fundo plano (Greiner Bio-One, E.U.A.) preenchidas com 180 µl de caldo MRS fresco. As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas para a formação dos biofilmes. Após o período de incubação, o meio de cultura foi descartado e as cavidades foram lavadas 3 vezes com 300 µl de solução salina fosfatada (PBS) (Sigma, E.U.A.) para a remoção das células não-aderidas. As placas foram secas à temperatura ambiente e coradas com 200 µl de cristal violeta 0,1% (Inlab, Brasil) por 10 min. O corante foi descartado e o excedente, removido com três lavagens de 200 µl de água destilada. Após secagem na estufa a 60°C por 10 min, 50 µl de etanol absoluto (Merck) foi adicionado em cada cavidade para a ressolubilização do corante. A densidade ótica foi medida a 595 nm no Leitor de Microplacas de 96 poços, modelo Infinite M200 (Tecan).

O experimento foi conduzido duas vezes e os testes foram realizados em triplicata para que as médias fossem determinadas. Três categorias para a formação de biofilmes foram estabelecidas de acordo com dois diferentes valores de corte, os quais foram fixados para determinar as seguintes categorias: não-produtores de biofilme (1), produtores moderados (2) e altamente produtores de biofilmes (3). O menor valor de corte foi fixado adicionando-se três vezes o desvio-padrão ao valor da média das leituras do controle negativo. O maior valor de corte foi definido como sendo três vezes o menor valor de corte (AL-AHMAD et al., 2014).

As estirpes de *Lactobacillus casei* (DSM 20011) e *Leuconostoc paramesenteroides* (DSM 20193), da Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas Celulares, também foram incluídas nos testes.

3.5 Resultados

3.5.1 Identificação das bactérias isoladas do biofilme e vinho bruto

Foram obtidos e sequenciados 23 isolados bacterianos durante a fermentação industrial, todos pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (Tabela 2).

Isolado	Tamanho seq	Identificação	Similaridade	e Cobertura	ID/NCBI	Fonte de isolamento da referência - país/coleção (país)
BI-1.1	1.436 pb	Lactobacillus casei	100%	100%	KF245561.1	Tanque de fermentação de bioetanol/E.U.A.
BI-1.2	1.465 pb	Lactobacillus casei	100%	100%	KF245561.1	Tanque de fermentação de bioetanol/E.U.A.
BI-1.3	1.498 pb	Lactobacillus casei	100%	100%	CP006690.1	Silagem de milho/E.U.A
BI-1.5	1.473 pb	Lactobacillus fermentum	99%	100%	AB911499.1	Coleção JCM (Japão)
BI-2.1	1.471 pb	Lactobacillus casei	100%	100%	KF245561.1	Tanque de fermentação de bioetanol/E.U.A.
BI-2.2	1.464 pb	Lactobacillus casei	100%	100%	KF245561.1	Tanque de fermentação de bioetanol/E.U.A.
BI-2.3	1.452 pb	Lactobacillus fermentum	99%	100%	AB911499.1	Coleção JCM (Japão)
BI-2.4	1.486 pb	Lactobacillus fermentum	99%	100%	AB911499.1	Coleção JCM (Japão)
BI-2.5	1.475 pb	Lactobacillus fermentum	99%	100%	AB911499.1	Coleção JCM (Japão)
BI-3.1	1.424 pb	Lactobacillus casei	100%	100%	KF245561.1	Tanque de fermentação de bioetanol/E.U.A.
BI-3.2	1.408 pb	Lactobacillus casei	100%	100%	KF245561.1	Tanque de fermentação de bioetanol/E.U.A.
BI-3.4	1.436 pb	Lactobacillus casei	99%	100%	HM058925.1	Produtos lácteos-China/Coleção IMAU (China)
BI-3.5	1.471 pb	Lactobacillus fermentum	99%	100%	AB911499.1	Coleção JCM (Japão)
VI-1.1	1.475 pb	Lactobacillus fermentum	99%	100%	AB911499.1	Coleção JCM (Japão)
VI-1.2	1.469 pb	Lactobacillus fermentum	99%	100%	AB911499.1	Coleção JCM (Japão)
VI-1.3	1.494 pb	Lactobacillus fermentum	99%	100%	AP008937.1	Material vegetal fermentado/Japão
VI-1.5	1.497 pb	Lactobacillus delbrueckii	95%*	100%	CP002341.1	Leite fermentado/China
VI-2.2	1.475 pb	Lactobacillus buchneri	99%	100%	AB429368.1	Sunki (picles)/Japão
VI-2.3	1.134 pb	Lactobacillus fermentum	99%	99%	AB911499.1	Coleção JCM (Japão)
VI-2.4	1.466 pb	Lactobacillus casei	100%	100%	KF245561.1	Tanque de fermentação de bioetanol/E.U.A.
VI-2.5	1.445 pb	Lactobacillus fermentum	99%	100%	AB911499.1	Coleção JCM (Japão)
VI-3.1	1.466 pb	Lactobacillus fermentum	99%	100%	AB911499.1	Coleção JCM (Japão)
VI-3.5	1.476 pb	Lactobacillus fermentum	99%	100%	HM058429.1	Produtos lácteos-China/Coleção IMAU (China)

Tabela 2 – Identificação dos isolados bacterianos, provindos das amostras de biofilmes (BI) e vinho (VI) da fermentação industrial, pela análise do gene 16S rRNA e similaridade com as sequências do banco de dados do *GenBank* (NCBI)

Para todas as análises o *E-value* foi igual a 0.0, ou seja, os alinhamentos foram significativos.

* O isolado VI-1.5 apresentou < 97% de identidade com a espécie mais proximamente relacionada, sendo denominado neste trabalho como Lactobacillus sp.

Destes 23 isolados, 13 foram obtidos das amostras de biofilme (BI) e 10 das amostras de vinho (VI). Os isolados do biofilme foram identificados como *Lactobacillus casei* (8) e *L. fermentum* (5). Já os isolados do vinho foram classificados como sendo *L. fermentum* (7), *L. casei* (1), *L. buchneri* (1) e *Lactobacillus* sp (1). Este último apresentou somente 95% de identidade com a espécie mais proximamente relacionada, *L. delbrueckii* e, de acordo com Drancourt e Raoult (2005), dois isolados bacterianos apresentando menos de 97% de similaridade na sequência do gene 16S rRNA pertencem a diferentes espécies.

Na fermentação piloto foram obtidos 27 isolados bacterianos, todos pertencentes ao gênero *Lactobacillus* sendo 14 provenientes dos biofilmes (BP) e 13 do vinho (VP) (Tabela 3). Os isolados do biofilme foram *L. plantarum* (7), *L. brevis* (3), *L. fermentum* (2), *L. casei* (1) e *L. acidipiscis* (1). Os isolados do vinho foram classificados como *L. plantarum* (7), *L. brevis* (2), *L. casei* (2) e *L. acidipiscis* (2).

3.5.2 Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

Um total de 50 isolados bacterianos contaminantes da fermentação alcoólica, pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, foram avaliados quanto à sensibilidade aos antimicrobianos monensina, virginiamicina e beta-ácido derivado do lúpulo. Dentre os isolados, 27 vieram de uma fonte de células sésseis (biofilmes), enquanto 23 vieram de uma fonte de células planctônicas (vinho bruto). Além dos isolados mencionados, duas estirpes-padrão *L. casei* (DSM 20011) e *Leuconostoc mesenteroides* (DSM 20193) foram incluídas nas análises. Algumas imagens dos halos de inibição formados ao redor dos discos contendo os antimicrobianos podem ser visualizadas na Figura 2. Os resultados do TSA podem ser verificados nas Tabelas 4 e 5 para os isolados da fermentação industrial e fermentação piloto, respectivamente. Os testes de Tukey encontram-se no Anexo.

Os isolados de *L. fermentum* da fermentação industrial (Tabela 4) mostraram-se resistentes à virginiamicina, independentemente da fonte de isolamento (biofilme ou vinho). O isolado do biofilme *L. fermentum* BI-2.3 foi o mais sensível à monensina; já o isolado do vinho *L. fermentum* VI- 2.3 foi o menos suscetível a este antibiótico; ambos apresentaram um padrão semelhante aos demais isolados (biofilme e vinho) quanto ao beta-ácido. Para *L. casei*, o único isolado do vinho (VI-2.4) apresentou sensibilidade parecida com a de alguns isolados do biofilme em relação à virginiamicina e ao beta-ácido, e nível intermediário quanto à monensina.

Isolado	Tamanho seq	Identificação	Similaridade	Cobertura	ID/NCBI	Fonte de isolamento da referência - país/coleção (país)
BP-1.1	1.486 pb	Lactobacillus fermentum	100%	100%	NR_104927.1	Beterraba fermentada/Coleção Instituto Pasteur (França)
BP-1.2	1.411 pb	Lactobacillus acidipiscis	99%	100%	NR_112693.1	Peixe fermentado - Tailândia/Coleção NBRC (Japão)
BP-1.4	1.466 pb	Lactobacillus brevis	99%	100%	AB911501.1	Coleção JCM (Japão)
BP-1.5	1.465 pb	Lactobacillus plantarum	99%	100%	CP006033.1	Malte/Coleção NCIMB (Escócia)
BP-2.1	1.431 pb	Lactobacillus brevis	97%	100%	GU125505.1	kimchi sauerkraut (picles)/China
BP-2.2	1.455 pb	Lactobacillus plantarum	100%	100%	CP006033.1	Malte/Coleção NCIMB (Escócia)
BP-2.3	1.457 pb	Lactobacillus plantarum	100%	100%	CP006033.1	Malte/Coleção NCIMB (Escócia)
BP-2.4	1.232 pb	Lactobacillus plantarum	99%	100%	CP006033.1	Malte/Coleção NCIMB (Escócia)
BP-2.5	1.456 pb	Lactobacillus casei	100%	100%	KF245561.1	Tanque de fermentação de bioetanol/E.U.A.
BP-3.1	1.494 pb	Lactobacillus plantarum	99%	100%	CP006033.1	Malte/Coleção NCIMB (Escócia)
BP-3.2	1.467 pb	Lactobacillus plantarum	100%	100%	CP006033.1	Malte/Coleção NCIMB (Escócia)
BP-3.3	1.471 pb	Lactobacillus brevis	99%	100%	AB911501.1	Coleção JCM (Japão)
BP-3.4	1.463 pb	Lactobacillus plantarum	100%	100%	CP006033.1	Malte/Coleção NCIMB (Escócia)
BP-3.5	1.475 pb	Lactobacillus fermentum	100%	100%	NR_104927.1	Beterraba fermentada/Coleção Instituto Pasteur (França)
VP-1.1	1.494 pb	Lactobacillus plantarum	100%	100%	JX025073.1	Vinho/França
VP-1.2	1.442 pb	Lactobacillus plantarum	100%	100%	CP006033.1	Malte/Coleção NCIMB (Escócia)
VP-1.3	1.463 pb	Lactobacillus plantarum	100%	100%	AB713898.1	Pastagem de gramíneas forrageiras/Japão
VP-1.4	1.389 pb	Lactobacillus brevis	100%	100%	AB911501.1	Coleção japonesa de micro-organismos (JCM)/Japão
VP-2.1	1.449 pb	Lactobacillus plantarum	99%	100%	AB713898.1	Pastagem de gramíneas forrageiras/Japão
VP-2.2	1.452 pb	Lactobacillus brevis	100%	100%	AB911501.1	Coleção japonesa de micro-organismos (JCM)/Japão
VP-2.3	1.458 pb	Lactobacillus plantarum	99%	100%	CP006033.1	Malte/Coleção NCIMB (Escócia)
VP-2.4	1.458 pb	Lactobacillus plantarum	100%	100%	JN408516.1	Leite fermentado/China
VP-2.5	1.430 pb	Lactobacillus acidipiscis	99%	100%	NR_112693.1	Peixe fermentado - Tailândia/Coleção NBRC (Japão)
VP-3.2	1.471 pb	Lactobacillus casei	99%	100%	KF245561.1	Tanque de fermentação de bioetanol/E.U.A.
VP-3.3	1.464 pb	Lactobacillus plantarum	99%	100%	AB713898.1	Pastagem de gramíneas forrageiras/Japão
VP-3.4	1.374 pb	Lactobacillus casei	100%	100%	KF245561.1	Tanque de fermentação de bioetanol/E.U.A.
VP-3.5	1.449 pb	Lactobacillus acidipiscis	99%	100%	NR_112693.1	Peixe fermentado - Tailândia/Coleção NBRC (Japão)

Tabela 3 – Identificação dos isolados bacterianos, provindos das amostras de biofilmes (BP) e vinho (VP) da fermentação piloto, pela análise do gene 16S rRNA e similaridade com as sequências do banco de dados do *GenBank* (NCBI)

Para todas as análises o *E-value* foi igual a 0.0, ou seja, os alinhamentos foram significativos.



Figura 2 - Imagens evidenciando os halos de inibição após 48 horas da aplicação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) por disco-difusão, para alguns isolados de *Lactobacillus* spp. provenientes da fermentação alcoólica a partir da cana-de-açúcar. Monensina (K); virginiamicina (L), beta-ácido (B) e controle negativo (-)

Tabela 4 – Valores da média (milímetros) e desvio-padrão das medidas dos halos de inibição dos isolados bacterianos contaminantes da fermentação alcoólica industrial, provenientes de amostras de biofilmes (BI) e vinho (VI)

Isolado bacteriano		Monensina*	Virginiamicina*	Beta-ácido*
		(250 ppm)	(10 ppm)	(3000 ppm)
	L. casei (BI-1.1)	$9,52 \pm 0,3$	$6,56 \pm 0,1$	$9,55 \pm 0,6$
	L. casei (BI-1.2)	$14,32 \pm 0,9$	$13,\!67 \pm 0,\!8$	$11,87 \pm 0,7$
В	L. casei (BI-1.3)	$13,65 \pm 0,3$	$11,99 \pm 0,4$	$11,73 \pm 0,6$
I	L. casei (BI-2.1)	$9,17 \pm 0,4$	$7,01 \pm 0,2$	$11,76 \pm 0,3$
0	L. casei (BI-2.2)	$9,59 \pm 0,3$	$7,70 \pm 0,3$	$10,52 \pm 0,4$
F	L. casei (BI-3.1)	$8,81 \pm 0,6$	$7,03 \pm 0,2$	$11,28 \pm 0,4$
I	L. casei (BI-3.2)	$9,22 \pm 0,3$	$7,91 \pm 0,5$	$11,27 \pm 0,3$
L	L. casei (BI-3.4)	$12,78 \pm 1,1$	$11,13 \pm 0,3$	$11,39 \pm 0,9$
Μ	L. fermentum (BI-1.5)	$11,\!66 \pm 0,\!6$	0,00	$10,\!42 \pm 0,\!3$
Е	L. fermentum (BI-2.3)	$15,\!05 \pm 0,\!8$	0,00	$10,\!20 \pm 0,\!5$
	L. fermentum (BI-2.4)	$12,15 \pm 0,6$	0,00	$9,66 \pm 0,3$
	L. fermentum (BI-2.5)	$12,05 \pm 0,5$	0,00	$10,51 \pm 0,4$
	L. fermentum (BI-3.5)	$11,71 \pm 0,5$	0,00	$10,04 \pm 0,6$
	L. fermentum (VI-1.1)	$11, 67 \pm 0,2$	0,00	$10,07 \pm 0,5$
	L. fermentum (VI-1.2)	$12,10 \pm 0,6$	0,00	$10,84 \pm 0,8$
V	L. fermentum (VI-1.3)	$11,88 \pm 0,5$	0,00	$9,98 \pm 0,5$
I	L. fermentum (VI-2.3)	$10,32 \pm 0,3$	0,00	$9,85 \pm 0,3$
Ν	L. fermentum (VI-2.5)	$13,58 \pm 0,3$	0,00	$10,96 \pm 0,5$
н	L. fermentum (VI-3.1)	$11,\!68 \pm 0,\!8$	0,00	$9,88 \pm 0,3$
0	L. fermentum (VI-3.5)	$13,16 \pm 0,6$	0,00	$9,72 \pm 0,2$
	L. casei (VI-2.4)	$11,\!67 \pm 0,\!3$	$7,\!35 \pm 0,\!2$	$12,10 \pm 0,5$
	L. buchneri (VI-2.2)	$13,55 \pm 0,5$	8,15 ± 0,2	$9,56 \pm 0,2$
	Lactobacillus sp (VI-1.5)	$11,81 \pm 0,3$	10,04 ± 0,2	6,60 ± 0,2
	L. casei (DSM 20011)	$17,67 \pm 0,8$	$6,76 \pm 0,1$	8,54 ± 0,5
	Leuconostoc (DSM 20193)	$17,80 \pm 0,2$	6,80 ± 0,2	9,61 ± 0,2

Na fermentação piloto (Tabela 5), *L. plantarum* apresentou um único isolado (BP-1.3) resistente à virginiamicina, sendo este oriundo do biofilme; em contrapartida, um isolado do vinho (VP-1.1) foi o único resistente à monensina. Dentro desta espécie, os isolados do biofilme apresentaram menor suscetibilidade ao beta-ácido do que a maioria dos isolados do vinho (com exceção de VP-1.2 e VP-3.3). O mesmo padrão de menor sensibilidade ao beta-ácido pelos isolados de biofilme também foi observado para *L. casei* e *L. brevis*, mas não para *L. acidipiscis* quando comparados, dentro da mesma espécie, com os isolados do vinho. Além disto, os isolados de *L. brevis* do biofilme (BP-1.4, BP-2.1 e BP-3.3) também foram menos susceptíveis à monensina quando comparados com os isolados do vinho (VP-1.4 e VP-2.2).

Os isolados de *L. acidipiscis* do vinho (VP-2.5 e VP3.5) mostraram resistência à virginiamicina, o que não ocorreu para o isolado do biofilme (BP-1.2). Isolados de *L. fermentum* (BP-1.1 e BP-3.5), obtidos somente dos biofilmes, se destacaram pelos maiores halos de inibição em relação à monensina e virginiamicina, dentre todos os isolados da fermentação piloto.

Tabela 5 – Valores da média (milímetros) e desvio-padrão das medidas dos halos de inibição dos isolados bacterianos contaminantes da fermentação alcoólica na unidade piloto, oriundos de amostras de biofilmes (BP) e vinho (VP)

Isolado bacteriano		Monensina*	Virginiamicina*	Beta-ácido*
		(250 ppm)	(10 ppm)	(3000 ppm)
	L. plantarum (BP-1.5)	$7,22 \pm 0,2$	6,10 ± 0,3	8,24 ± 0,2
	L. plantarum (BP-2.2)	$7,20 \pm 0,5$	$6,15 \pm 0,1$	$8,29 \pm 0,5$
	L. plantarum (BP-2.3)	$6,20 \pm 0,1$	$6,\!60 \pm 0,\!2$	$5,66 \pm 0,1$
В	L. plantarum (BP-2.4)	7,71 ± 0,2	$6,\!47 \pm 0,\!2$	$8,07 \pm 0,3$
I.	L. plantarum (BP-3.1)	$6,\!27 \pm 0,\!1$	0,00	$9,03 \pm 0,3$
0	L. plantarum (BP-3.2)	$7,56 \pm 0,2$	$6,\!98 \pm 0,\!2$	$8,65 \pm 0,1$
F	L. plantarum (BP-3.4)	$6,52 \pm 0,1$	$6,50 \pm 0,1$	$8,76 \pm 0,4$
Т	L. brevis (BP-1.4)	$6,50 \pm 0,3$	$6,79 \pm 0,2$	$8,\!17 \pm 0,\!5$
L	L. brevis (BP-2.1)	$7,\!14 \pm 0,\!5$	$6,72 \pm 0,2$	$8,\!43 \pm 0,\!4$
М	L. brevis (BP-3.3)	$6,\!68 \pm 0,\!3$	$6,\!97 \pm 0,\!5$	$8,\!84 \pm 0,\!5$
Е	L. fermentum (BP-1.1)	$18,\!98 \pm 0,\!6$	$13,54 \pm 0,9$	$11,66 \pm 1,0$
	L. fermentum (BP-3.5)	$13,\!48 \pm 0,\!8$	$10,80 \pm 1,1$	$9,16 \pm 0,7$
	L. casei (BP-2.5)	$10,\!40 \pm 0,\!4$	$6,70 \pm 0,3$	$11,95 \pm 0,7$
	L. acidipiscis (BP-1.2)	$8,\!44 \pm 0,\!4$	$9,\!67 \pm 0,\!6$	$8,\!24 \pm 0,\!2$
	L. plantarum (VP-1.1)	0,00	$6,14 \pm 0,2$	$12,\!18 \pm 0,\!8$
	L. plantarum (VP-1.2)	$6,\!48 \pm 0,\!2$	$6,\!27 \pm 0,\!2$	6,16 ± 0,3
	L. plantarum (VP-1.3)	$6,\!62 \pm 0,\!2$	$7,56 \pm 0,2$	$12,08 \pm 0,6$
	L. plantarum (VP-2.1)	7,61 ± 0,2	$7,20 \pm 0,3$	$12,83 \pm 1,2$
V	L. plantarum (VP-2.3)	$6,82 \pm 0,1$	$6,72 \pm 0,1$	$11,21 \pm 0,7$
Т	L. plantarum (VP-2.4)	$6,\!90 \pm 0,\!2$	$6,\!98 \pm 0,\!4$	$12,00 \pm 1,4$
Ν	L. plantarum (VP-3.3)	$6,53 \pm 0,2$	$7,03 \pm 0,2$	$6,\!41 \pm 0,\!3$
н	L. brevis (VP-1.4)	$9,82 \pm 0,5$	9,21 ± 1,7	$9,96 \pm 0,4$
0	L. brevis (VP-2.2)	$8,76 \pm 0,2$	$7,35 \pm 0,2$	$10,23 \pm 1,1$
	L. casei (VP-3.2)	$8,\!39 \pm 0,\!5$	$8,\!45 \pm 0,\!3$	$14,96 \pm 0,7$
	L. casei (VP-3.4)	$9,70 \pm 0,4$	$7,43 \pm 0,3$	$14,\!68 \pm 1,\!5$
	L. acidipiscis (VP-2.5)	$9,75 \pm 0,3$	0,00	8,11 ± 0,5
	L. acidipiscis (VP-3.5)	$7,14 \pm 0,1$	0,00	$6,19 \pm 0,3$

Os resultados mostraram diferenças na sensibilidade aos antimicrobianos entre os isolados de *Lactobacillus* spp. Para *L. casei* e *L. brevis* da fermentação piloto, uma relação entre a fonte de isolamento (biofilme) e menor sensibilidade ao beta-ácido foi observada. Este mesmo padrão pode ser visto para a maioria dos isolados de *L. plantarum*.

3.5.3 Capacidade de formação de biofilme em cultura pura

A capacidade de formação de biofilme foi testada para os 50 isolados bacterianos, sendo estes divididos em três categorias: não-produtores de biofilmes (1), produtores moderados (2) e altamente produtores de biofilmes (3). As densidades óticas (DO) correspondentes ao menor e maior valor de corte foram 0,12 e 0,36, respectivamente. Valores de DO menores que 0,12 representaram os isolados não-produtores de biofilmes; valores entre 0,12 e 0,36 foram associados aos produtores moderados de biofilmes; já os valores acima de 0,36 corresponderam aos altamente produtores de biofilmes. Os resultados relativos à capacidade de formação de biofilme dos isolados bacterianos contaminantes da produção de etanol oriundos de amostras de biofilmes e de vinho bruto das dornas de fermentação alcoólica estão representados nas Figuras 3 e 4 para a fermentação industrial e piloto, respectivamente.

Dentre os isolados da fermentação industrial (Figura 3), três originários do biofilme (BI-2.3, BI-2.4 e BI-2.5) e três do vinho (VI-1.2, VI-3.1 e VI-3.5), todos da espécie *L. fermentum*, não foram capazes de produzir biofilme, assim como a estirpe-padrão *L. casei* (DSM 20011). Os isolados de vinho *L. buchneri* (VI-2.2) e *Lactobacillus* sp (VI-1.5) foram classificados como altamente produtores de biofilmes. Os demais isolados espécies *L. fermentum* e *L. casei* (biofilme e vinho) foram considerados produtores moderados de biofilme, com também *Leuconostoc paramesenteroides* (DSM 20193).

De acordo com os resultados para os contaminantes da fermentação industrial, a capacidade de formação de biofilmes variou conforme o isolado, não havendo relação com a fonte de isolamento (vinho e biofilme).

Na fermentação piloto (Figura 4), a maioria dos isolados vindos do biofilme foi altamente produtora de biofilme, compreendendo todos os isolados de *L. plantarum* (BP-1.5, BP-2.2, BP-2.3, BP-2.4, BP-3.1, BP-3.2 e BP-3.4), dois isolados de *L. brevis* (BP-1.4 e BP-2.1) e dois de *L. fermentum* (BP-1.1 e BP-3.5). Neste caso, somente três isolados, *L. casei* (BP-2.5), *L. acidipiscis* (BP-1.2) e *L. brevis* (BP-3.3) foram produtores moderados de biofilmes. Em relação aos isolados oriundos do vinho, dois pertencentes à

espécie *L. plantarum* (VP-1.2 e VP-3.3) e dois *L. casei* (VP-3.2 e VP-3.4) foram altamente produtores de biofilme, enquanto os demais isolados foram produtores moderados, sendo eles das espécies *L. plantarum*, *L. acidipiscis* e *L. brevis*.



Figura 3 – Formação de biofilme pelos isolados bacterianos contaminantes da fermentação alcoólica industrial, oriundos de amostras de biofilmes (BI) e vinho (VI). Não-produtores de biofilmes, produtores moderados de biofilmes e altamente produtores de biofilmes estão representados pelas barras branca, cinza e preta, respectivamente



Figura 4 — Formação de biofilme pelos isolados bacterianos contaminantes da fermentação alcoólica na unidade piloto, oriundos de amostras de biofilmes (BP) e vinho (VP). Não-produtores de biofilmes, produtores moderados de biofilmes e altamente produtores de biofilmes estão representados pelas barras branca, cinza e preta, respectivamente

Os resultados da capacidade de formação de biofilmes pelas bactérias contaminantes da fermentação piloto também mostraram variações entre os isolados da mesma espécie como, por exemplo, entre os isolados de *L. brevis* do biofilme, ou ainda, entre os isolados de *L. plantarum* do vinho. Houve, também, uma maior frequência de isolados altamente produtores de biofilme nas amostras dos biofilmes do que nas amostras de vinho bruto, sendo este último predominado por produtores moderados de biofilme.

Uma forte correlação entre a capacidade de formação de biofilme e a suscetibilidade ao beta-ácido derivado do lúpulo pode ser observada dentro de algumas espécies obtidas da fermentação piloto. Para *L. plantarum*, os isolados com menor sensibilidade ao beta-ácido foram altamente produtores de biofilme ($r^2 = -0,71$). Para *L. casei*, esta correlação foi exatamente contrária, ou seja, os isolados mais sensíveis ao beta-ácido foram os altamente produtores de biofilme ($r^2 = 0,72$). Os isolados de *L. brevis* não apresentaram nenhuma correlação. Estes resultados sugerem que a correlação entre capacidade de formação de biofilme e suscetibilidade aos antimicrobianos de bactérias do gênero *Lactobacillus* varia conforme a espécie avaliada.

3.6 Discussão

Vários estudos envolvendo bactérias contaminantes de diferentes amostras líquidas da fermentação alcoólica para a produção de etanol no Brasil têm abordado a sensibilidade destes micro-organismos aos mais diversos antibióticos e antimicrobianos (GÓIS et al., 2013; LEITE, 2011; LOPES; SILVA, 2011; OLIVA-NETO; YOKOYA, 2001; PRADO, 2014; RODRIGUES; DANTAS; FINZER, 2009; SILVA, 2010; STROPPA, 1998; VIÉGAS, 2011). Porém, faltam estudos sobre a suscetibilidade aos antimicrobianos pelas bactérias participantes dos biofilmes formados dentro das dornas de fermentação. Além disto, faltam trabalhos referentes à capacidade de formação de biofilmes das bactérias presentes neste ambiente fermentativo, tendo a cana-de-açúcar como substrato. Neste estudo foi apresentada, pela primeira vez, a caracterização da capacidade de formação de biofilme de 50 isolados de *Lactobacillus* spp. provindos de biofilmes e vinho bruto de tanques de fermentação alcoólica, assim como seus padrões de sensibilidade à monensina, virginiamicina e beta-ácido derivado do lúpulo.

A resistência de bactérias isoladas da fermentação alcoólica aos antimicrobianos tem sido enfatizada na literatura. Lushia e Heist (2005) avaliaram a suscetibilidade à penicilina e à virginiamicina de contaminantes da produção de etanol nos E.U.A. e verificaram que estes antibióticos controlaram todos os isolados industriais de *Lactobacillus, Leuconostoc pseudomesenteroides* e um isolado de *Weissella confusa*. Porém, outro isolado de *Weissella confusa* teve seu crescimento inibido somente com 25 ppm de virginiamicina, enquanto que a dose geralmente utilizada é de 0,5 ppm, sendo a máxima recomendada de 6 ppm. Já um isolado de *Pediococcus acidilactici* apresentou crescimento em meio contendo 100 ppm de virginiamicina e 50 ppm de penicilina; os autores ressaltaram que bactérias deste gênero podem ter uma resistência intrínseca à virginiamicina, mas normalmente são susceptíveis à penicilina.

Bischoff e colegas (2007) encontraram valores mais elevados da concentração inibitória mínima (MIC) para a ampicilina, cloranfenicol, penicilina, tetraciclina, pristinamicina e virginiamicina nos isolados de *Lactobacillus* obtidos de uma destilaria americana com moagem seca, que faz uso frequente de antibióticos, do que para os isolados de uma destilaria com moagem úmida que não utilizava antibióticos no controle das contaminações. Os resultados de MIC₉₀ (μ g/ml) destes antibióticos registrados para os isolados das usinas com moagem seca e moagem úmida, respectivamente, foram: ampicilina 1/>8; cloranfenicol 4/>16; penicilina 2/>8; tetraciclina 16/32; pristinamicina 1/>4 e virginiamicina 0,25/4.

Em seus estudos, Rich e colaboradores (2011) examinaram a sensibilidade à virginiamicina de 10 estirpes de *Lactobacillus* isoladas de biofilmes formados em condições laboratoriais a partir de amostras líquidas dos tanques de fermentação alcoólica do milho de uma destilaria que faz uso frequente deste antibiótico. Isolados de *L. fermentum* apresentaram diferenças na suscetibilidade à virginiamicina com MIC variando entre $\leq 0,5$ a 16 µg/ml.

Ensaios recentes de MIC com penicilina, eritromicina e virginiamicina entre 32 isolados de bactérias ácido-láticas (LAB) de oito destilarias americanas revelaram ampla resistência aos antibióticos, assim como altos níveis de resistência individual para cada um destes antibióticos (MURPHREE; HEIST; MOE, 2014). A variação na sensibilidade aos antibióticos também pôde ser observada entre isolados da mesma espécie, como no caso de *L. fermentum* F1S1 e F4S8 com MIC (μ g/ml) de \leq 0,5 e 64 para penicilina e \leq 0,5 e 32 para virginiamicina, respectivamente.

No presente trabalho, variações na sensibilidade aos antimicrobianos também foram observadas não só entre diferentes espécies de *Lactobacillus*, mas entre os isolados da mesma espécie, com padrões distintos conforme o antimicrobiano avaliado. Estes resultados corroboram com os descritos na literatura para os isolados da fermentação alcoólica que utilizam o milho como substrato e reforçam a importância da identificação das espécies de *Lactobacillus* num evento de contaminação industrial.

Os lactobacilos podem desenvolver resistência aos antibióticos pela aquisição de elementos genéticos transmissíveis ou resistência intrínseca a múltiplas drogas por mutação causada pela exposição prolongada aos antimicrobianos presentes nos fermentadores de bioetanol (MUTHAIYAN; LIMAYEM; RICKE, 2011). Desta forma, baseado na espécie bacteriana contaminante, o uso da concentração apropriada do antibiótico é de extrema importância: doses abaixo da recomendada aumentam o risco do desenvolvimento da resistência; doses superiores, além do prejuízo econômico, não controlam o problema caso a bactéria seja resistente, podendo ainda afetar negativamente o desempenho das leveduras (LUSHIA; HEIST, 2005). A emergência de isolados resistentes pode limitar a eficácia dos agentes antimicrobianos (BISCHOFF et al., 2009), sendo crucial o uso destes de forma adequada caso permaneçam como uma opção viável para os produtores de etanol combustível (LUSHIA; HEIST, 2005).

No caso da fermentação piloto, *L. casei, L. brevis* e *L. plantarum* isolados do biofilme foram menos sensíveis ao beta-ácido do que aqueles isolados do vinho. Somente dois isolados de *L. plantarum* provenientes do vinho apresentaram comportamento semelhante aos isolados do biofilme, sendo estes os únicos altamente produtores de biofilme dentre os isolados do vinho desta espécie. Ainda, isolados de *L. brevis* do biofilme também apresentaram menor sensibilidade à monensina quando comparados com os do vinho. Em contrapartida, os isolados de *L. acidipiscis* do vinho foram resistentes à virginiamicina, o que não ocorreu com o isolado do biofilme.

A variação na capacidade de formação de biofilme pelas bactérias contaminantes da fermentação industrial e piloto também foi observada entre os isolados de uma mesma espécie. A habilidade de formar biofilme em cultura pura foi investigada, por Rich e colaboradores (2011), em espécies de *Lactobacillus* contaminantes da fermentação alcoólica para produção de etanol nos E.U.A. Os autores verificaram que esta habilidade não está simplesmente relacionada à espécie, mas sim à estirpe, como observado para seis isolados de *L. fermentum*. Em um estudo mais abrangente, envolvendo 32 isolados de LAB provindos de oito destilarias americanas, Murphree, Heist e Moe (2014) também notaram a diferença na

capacidade de formação de biofilmes entre os isolados de uma mesma espécie, sendo elas representadas por *L. casei*, *L. fermentum*, *Pediococcus pentosaceus* e *Weissella confusa*.

Para os isolados da fermentação industrial deste estudo, não houve relação entre a capacidade de formação de biofilme e a fonte da qual os micro-organismos foram isolados, ou seja, biofilme e vinho bruto. Bactérias originalmente isoladas de um biofilme misto não são, necessariamente, capazes de formar biofilmes em culturas puras, já que os biofilmes naturais apresentam uma complexa interação entre seus habitantes (RICH et al., 2011).

Por outro lado, na fermentação piloto, pôde-se notar a predominância de isolados altamente produtores de biofilme nas amostras oriundas dos biofilmes, enquanto que a maioria dos isolados das amostras de vinho bruto foi classificada como produtores moderados de biofilme.

Uma forte correlação entre a capacidade de formação de biofilme e a sensibilidade ao antimicrobiano beta-ácido derivado do lúpulo foi encontrada para *L. plantarum* e *L. casei* oriundos da fermentação piloto. Para *L. plantarum*, os isolados com menor sensibilidade ao beta-ácido foram os que apresentaram maior capacidade de produção de biofilme; para *L. casei* o inverso foi observado, ou seja, os mais suscetíveis apresentaram maior capacidade de formação de biofilme. Este resultado está de acordo com Murphree, Heist e Moe (2014) que sugeriram que os baixos níveis de resistência de alguns isolados de *L. casei* podem ser mediados pela formação de biofilmes.

Nenhuma correlação foi encontrada para os antibióticos monensina e virginiamicina, corroborando com o relatado por Murphree, Heist e Moe (2014) que não encontraram correlação entre a propensão em formar biofilme e os altos níveis de resistência à virginiamicina, penicilina e eritromicina de diversas LAB isoladas da fermentação alcoólica do milho.

Este foi o primeiro relato apontando que a fonte de isolamento das bactérias contaminantes da fermentação alcoólica pode influenciar no perfil exibido para a suscetibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilmes em culturas puras.

3.7 Conclusão

A suscetibilidade aos antimicrobianos e a capacidade de formar biofilmes em cultura pura pelos *Lactobacillus* contaminantes da fermentação alcoólica da cana-de-açúcar mostraram variações tanto entre as espécies, como entre os isolados da mesma espécie. Em alguns casos, a fonte de isolamento influenciou no perfil apresentado.

Este foi o primeiro estudo comparativo entre bactérias contaminantes da fermentação alcoólica provenientes de biofilmes (células sésseis) e vinho bruto (células planctônicas) no que diz respeito à sensibilidade aos antimicrobianos industriais e habilidade de formação de biofilmes.

Referências

AL-AHMAD, A.; AMEEN, H.; PELZ, K.; KARYGIANNI, L.; WITTMER, A.; ANDERSON, A. C.; SPITZMULLER, B.; HELLWIG, E. Antibiotic resistance and capacity for biofilm formation of different bacteria isolated from endodontic infections associated with root-filled teeth. **Journal of Endodontics,** Chicago, v. 40, n. 2, p. 223-230, 2014.

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

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, D. R.; AUSTIN, G. D.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook**: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries. v. 1. Nottingham: Nottingham University Press, 2009. cap. 5, p. 39–46.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. D.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 91, p. 1267-1275, 2011.

ANWAR, H.; STRAP, J. L.; COSTERTON, J. W. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, v. 36, n. 7, p. 1347-1351, 1992.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 45, p. 493-496, 1966.

BAYROCK, D. P.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Control of *Lactobacillus* contaminants in continuous fuel ethanol fermentations by constant or pulsed addition of penicillin G. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 62, p. 498–502, 2003.

BELOIN, C.; RENARD, S.; GHIGO, J. M.; LEBEAUX, D. Novel approaches to combat bacterial biofilms. **Current Opinion in Pharmacology**, London, v. 18, p. 61–68, 2014.

BISCHOFF, K. M.; LIU, S.; LEATHERS, T. D.; WORTHINGTON, R. E.; RICH, J. O. Modeling bacterial contamination of fuel ethanol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 103, n. 1, p. 117-122, 2009.

BISCHOFF, K. M.; SKINNER-NEMEC, K. A.; LEATHERS, T. D. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus* species isolated from commercial ethanol plants. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Hampshire, v. 34, p. 739–744, 2007.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: atriz-less, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v. 36, p. 214-216, 2004.

De MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARP, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.

DRANCOURT, M.; RAOULT, D. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 43, n. 9, p. 4311–4315, 2005.

FERNANDES, E. A. N.; NEPOMUCENO, N.; TREVIZAM, A. B.; AMORIM, H. V. From potential to reality: Yeasts derived from ethanol production for animal nutrition. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Budapest, v. 234, n. 1-2, p. 113-118, 1998.

GÓIS, C. G. M.; LOPES-SANTOS, L.; BERANGER, J. P. O.; OLIVEIRA, A. G.; SPAGO, F. R.; ANDRADE, G. The control of *Lactobacillus* sp. by extracellular compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* in the fermentation process of fuel ethanol industry in Brazil. **Journal of Sustainable Bioenergy Systems**, Coulterville, CA, v. 3, p. 194-201, 2013.

JOHNSON, J. L. Similarity analysis of rRNAs. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R. (Ed.). **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994. p. 683-700.

LEATHERS, T. D.; BISCHOFF, K. M.; RICH, J. O.; PRICE, N. P. J.; MANITCHOTPISIT, P.; NUNNALLY, M. S.; ANDERSON, A. M. Inhibitors of biofilm formation by biofuel fermentation contaminants. **Bioresource Technology**, Essex, v. 169, p. 45–51, 2014.

LEITE, I. R. Avaliação da ação de antibiótico natural na fermentação alcoólica contaminada por cultura mista. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

LELLIOTT, R. A.; STEAD, D.E. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. In: PREECE, T. F. (Ed.). **Methods in plant pathology**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987. v. 2, cap. 5, p. 152-168.

LOPES, M. B.; SILVA, T. M. B. Teste de sensibilidade *in vitro* aos antibióticos do processo de fermentação de uma usina sucroalcooleira no interior do Paraná. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v. 4, n. 3, p. 445-465, 2011.

LUSHIA, W.; HEIST, P. Antibiotic resistant bacteria in fuel ethanol fermentations. **Ethanol Producer Magazine**, Grand Forks, p. 80–82, 2005.

McLEAN, R. J. C. An overview of biofilm molecular ecology. In: McLEAN, R. J. C.; DECHO, A. W. (Ed.). Molecular ecology of biofilms. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2002. cap. 1, p. 1-21.

MURPHREE, C. A.; HEIST, E. P.; MOE, L. A. Antibiotic resistance among cultured bacterial isolates from bioethanol fermentation facilities across the United States. **Current Microbiology**, New York, v. 69, n. 3, p. 277-285, 2014.

MUTHAIYAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 37, p. 351-370, 2011.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 10-14, 2001.

PRADO, J. L. Uso de antibióticos convencionais e antimicrobianos a base de lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcoólica. 2014. 45 f. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2014.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2011.

RICH, J. O.; LEATHERS, T. D.; NUNNALLY, M. S.; BISCHOFF, K. M. Rapid evaluation of the antibiotic susceptibility of fuel ethanol contaminant biofilms. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, p. 1124–1130, 2011.

RODRIGUES, L. M.; DANTAS, R.; FINZER, J. R. D. Utilização de produto natural durante a fermentação alcoólica visando uma produção que se enquadre nos parâmetros de atividade sustentável. **FAZU em Revista**, Uberaba, n. 6, p. 53-82, 2009.

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

SILVA, G. K. C. Avaliação da ação de diferentes antibióticos sobre o crescimento de microrganismos contaminantes do processo fermentativo para a obtenção do etanol. 2010. 50 f. Trabalho de Conclusão do Curso (Tecnologia em Biocombustíveis) - Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, Araçatuba, 2010.

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

SKINNER-NEMEC, K. A.; NICHOLS, N. N.; LEATHERS, T. D. Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 29, p. 379–383, 2007.

STEWART, P. S. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. International Journal of Medical Microbiology, Amsterdam, v. 292, p. 107-113, 2002.

STIRLING, D. DNA extraction from fungi, yeast and bacteria. In: BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. (Ed.). **Methods in molecular biology**: PCR protocols. 2. ed. Totowa: Humana Press, 2003. cap. 13, p. 53-54.

STROPPA, C. T. Avaliação da ação de antibióticos utilizados na fermentação alcoólica através do consumo de açúcar por bactérias contaminantes. 1998. 71 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

SUZUKI, K.; IIJIMA, K.; SAKAMOTO, K.; SAMI, M.; YAMASHITA, H. A review of hop resistance in beer spoilage lactic acid bacteria. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 112, n. 2, p. 173-191, 2006.

VIÉGAS, E. K. D. **Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica**. 2011. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WRIGHT, E. S. DECIPHER - a search-based approach to chimera identification for 16s rRNA sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 78, n. 3, p. 717-725, 2012.

YANG, L.; LIU, Y.; WU, H.; SONG, Z.; HOIBY, N.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. Combating biofilms. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 65, p. 146–157, 2012.

ANEXOS

Anexo A - Valores da média (milímetros) e desvio-padrão das medidas dos halos de inibição dos isolados de *L. casei* da fermentação alcoólica industrial, provenientes de biofilmes (BI) e vinho (VI)

Isolado bacteriano	Monensina	Virginiamicina	Beta-ácido
	(250 ppm)	(10 ppm)	(3000 ppm)
L. casei (BI-1.1)	$9,52 \pm 0,3 \text{ d}$	$6,56 \pm 0,1e$	$9,55 \pm 0,6$ c
L. casei (BI-1.2)	$14,32 \pm 0,9$ a	$13,67 \pm 0,8$ a	$11,87 \pm 0,7$ a
L. casei (BI-1.3)	$13,65 \pm 0,3$ ab	$11,99 \pm 0,4$ b	$11,73 \pm 0,6$ a
L. casei (BI-2.1)	$9,17 \pm 0,4$ d	$7,01 \pm 0,2$ cde	11,76 ± 0,3 a
L. casei (BI-2.2)	$9,59 \pm 0,3 \text{ d}$	$7,70 \pm 0,3$ cd	$10,52 \pm 0,4$ bc
L. casei (BI-3.1)	$8,81 \pm 0,6 \text{ d}$	$7,03 \pm 0,2$ cde	$11,28 \pm 0,4$ ab
L. casei (BI-3.2)	$9,22 \pm 0,3 \text{ d}$	$7,91 \pm 0,5$ c	$11,27 \pm 0,3$ ab
L. casei (BI-3.4)	$12,78 \pm 1,1$ b	$11,13 \pm 0,3$ b	11,39 ± 0,9 ab
L. casei (VI-2.4)	$11,67 \pm 0,3$ c	$7,35 \pm 0,2$ cde	$12,10 \pm 0,5$ a

Letras diferentes referem-se a diferenças nas médias dos halos (P < 0,001; Tukey).

Anexo B - Valores da média (milímetros) e desvio-padrão das medidas dos halos de inibição dos isolados de *L. fermentum* da fermentação alcoólica industrial, provenientes de biofilmes (BI) e vinho (VI)

Isolado bacteriano	Monensina	Virginiamicina	Beta-ácido
	(250 ppm)	(10 ppm)	(3000 ppm)
L. fermentum (BI-1.5)	$11,66 \pm 0,6$ c	0,00	$10,42 \pm 0,3$ abc
L. fermentum (BI-2.3)	$15,05 \pm 0,8$ a	0,00	$10,20 \pm 0,5$ abc
L. fermentum (BI-2.4)	$12,15 \pm 0,6$ c	0,00	$9,66 \pm 0,3$ c
L. fermentum (BI-2.5)	$12,05 \pm 0,5$ c	0,00	$10,51 \pm 0,4$ abc
L. fermentum (BI-3.5)	$11,71 \pm 0,5$ c	0,00	$10,04 \pm 0,6$ bc
L. fermentum (VI-1.1)	11, 67 \pm 0,2 c	0,00	$10,07 \pm 0,5$ bc
L. fermentum (VI-1.2)	$12,10 \pm 0,6$ c	0,00	$10,\!84 \pm 0,\!8$ ab
L. fermentum (VI-1.3)	$11,88 \pm 0,5$ c	0,00	$9,98 \pm 0,5$ bc
L. fermentum (VI-2.3)	$10,32 \pm 0,3 \text{ d}$	0,00	$9,85 \pm 0,3$ c
L. fermentum (VI-2.5)	$13,58 \pm 0,3$ b	0,00	$10,96 \pm 0,5$ a
L. fermentum (VI-3.1)	$11,68 \pm 0,8$ c	0,00	$9,88 \pm 0,3$ c
L. fermentum (VI-3.5)	$13,16 \pm 0,6$ b	0,00	$9,72 \pm 0,2$ c

Letras diferentes referem-se a diferenças nas médias dos halos (P < 0,001; Tukey).

Anexo C - Valores da média (milímetros) e desvio-padrão das medidas dos halos de inibição dos isolados de *L. plantarum* da fermentação alcoólica da unidade piloto, provenientes de biofilmes (BP) e vinho (VP)

Isolado bacteriano	Monensina	Virginiamicina	Beta-ácido
	(250 ppm)	(10 ppm)	(3000 ppm)
L. plantarum (BP-1.5)	$7,22 \pm 0,2$ abc	$6,10 \pm 0,3$ e	$8,24 \pm 0,2 \text{ cd}$
L. plantarum (BP-2.2)	$7,20 \pm 0,5$ abc	$6,15 \pm 0,1$ de	$8,29 \pm 0,5 \text{ cd}$
L. plantarum (BP-2.3)	$6,20 \pm 0,1 \text{ d}$	$6,60 \pm 0,2$ bcde	$5,66 \pm 0,1$ e
L. plantarum (BP-2.4)	$7,71 \pm 0,2$ a	$6,47 \pm 0,2$ bcde	$8,07 \pm 0,3 \text{ d}$
L. plantarum (BP-3.1)	$6,27 \pm 0,1 \text{ d}$	0,00 f	$9,03 \pm 0,3$ c
L. plantarum (BP-3.2)	$7,56 \pm 0,2$ ab	$6,98 \pm 0,2$ abcd	$8,65 \pm 0,1 \text{ cd}$
L. plantarum (BP-3.4)	$6,52 \pm 0,1 \text{ cd}$	$6,50 \pm 0,1$ bcde	$8,76 \pm 0,4 \text{ cd}$
L. plantarum (VP-1.1)	0,00 e	$6,14 \pm 0,2 \text{ de}$	$12,18 \pm 0,8$ a
L. plantarum (VP-1.2)	$6,48 \pm 0,2 \text{ cd}$	$6,27 \pm 0,2$ cde	$6,16 \pm 0,3 e$
L. plantarum (VP-1.3)	$6,62 \pm 0,2 \text{ cd}$	$7,56 \pm 0,2$ a	$12,\!08 \pm 0,\!6 \text{ ab}$
L. plantarum (VP-2.1)	$7,61 \pm 0,2$ ab	$7,20 \pm 0,3$ ab	12,83 ± 1,2 a
L. plantarum (VP-2.3)	$6,82 \pm 0,1$ bcd	$6,72 \pm 0,1$ abcde	11,21 ± 0,7 b
L. plantarum (VP-2.4)	$6,90 \pm 0,2$ abcd	$6,98 \pm 0,4$ abcd	$12,00 \pm 1,4 \text{ ab}$
L. plantarum (VP-3.3)	$6,53 \pm 0,2 \text{ cd}$	$7,03 \pm 0,2$ abc	6,41 ± 0,3 e

Letras diferentes referem-se a diferenças nas médias dos halos (P < 0,001; Tukey).

Anexo D - Valores da média (milímetros) e desvio-padrão das medidas dos halos de inibição dos isolados de *L. brevis* da fermentação alcoólica da unidade piloto, provenientes de biofilmes (BP) e vinho (VP)

Isolado bacteriano	Monensina	Virginiamicina	Beta-ácido
	(250 ppm)	(10 ppm)	(3000 ppm)
L. brevis (BP-1.4)	$6,50 \pm 0,3$ b	$6,79 \pm 0,2$ b	$8,17 \pm 0,5$ b
L. brevis (BP-2.1)	$7,14 \pm 0,5$ b	$6,72 \pm 0,2$ b	$8,43 \pm 0,4$ b
L. brevis (BP-3.3)	6,68 ± 0,3 b	$6,97 \pm 0,5$ b	$8,84 \pm 0,5$ b
L. brevis (VP-1.4)	$9,82 \pm 0,5$ a	9,21 ± 1,7 a	$9,96 \pm 0,4$ a
L. brevis (VP-2.2)	$8,76 \pm 0,2$ a	$7,35 \pm 0,2$ b	$10,23 \pm 1,1$ a

Letras diferentes referem-se a diferenças nas médias dos halos ($P \le 0,001$; Tukey).

Anexo E - Valores da média (milímetros) e desvio-padrão das medidas dos halos de inibição dos isolados de *L. casei* da fermentação alcoólica da unidade piloto, provenientes de biofilmes (BP) e vinho (VP)

Isolado bacteriano	Monensina	Virginiamicina	Beta-ácido
	(250 ppm)	(10 ppm)	(3000 ppm)
L. casei (BP-2.5)	$10,40 \pm 0,4$ a	$6,70 \pm 0,3$ b	$11,95 \pm 0,7$ b
L. casei (VP-3.2)	$8,39 \pm 0,5$ b	$8,45 \pm 0,3$ a	$14,96 \pm 0,7$ a
L. casei (VP-3.4)	$9,70 \pm 0,4$ a	$7,43 \pm 0,3$ ab	$14,68 \pm 1,5$ a

Letras diferentes referem-se a diferenças nas médias dos halos (P < 0,001; Tukey).

Anexo F - Valores da média (milímetros) e desvio-padrão das medidas dos halos de inibição dos isolados de *L. acidipiscis* da fermentação alcoólica da unidade piloto, provenientes de biofilmes (BP) e vinho (VP)

Isolado bacteriano	Monensina (250 ppm)	Virginiamicina (10 ppm)	Beta-ácido (3000 ppm)
L. acidipiscis (BP-1.2)	8,44 ± 0,4 b	9,67 ± 0,6 a	$8,24 \pm 0,2$ a
L. acidipiscis (VP-2.5)	$9,75 \pm 0,3$ a	0,00 b	8,11 ± 0,5 a
L. acidipiscis (VP-3.5)	$7,14 \pm 0,1$ c	0,00 b	$6,19 \pm 0,3$ b

Letras diferentes referem-se a diferenças nas médias dos halos (P < 0,001; Tukey).