

Desenvolvimento de um produto de controle de bactérias formadoras de biofilmes do sistema de produção industrial de etanol

Elizandra Faria Viana¹; Juliana Fernandes Moreira²; Alcilene de Abreu Pereira³

(1) Estudante de Engenharia de Alimentos, (2) Estudante de Ciências Biológicas. Instituto Federal Minas Gerais (IFMG) campus Bambuí. Rod. Bambuí/Medeiros km 5. CEP: 38900-000. Bambuí-MG. Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC) – CNPQ. (3) Professor Orientador – IFMG.

RESUMO: A deposição de biofilmes tem gerado transtornos a indústria sucro-alcooleira devido ao acúmulo bactérias metabolizadoras de sacarose, glicose e frutose que consomem parte significativa dos carboidratos disponíveis e alteram as condições do meio, diminuindo a eficiência de fermentação etílica por meio das leveduras. A maioria dos trabalhos que visam à detecção e controle de microrganismos nas usinas sucroalcooleiras foi realizada fora do Brasil e focam no controle da qualidade bacteriológica do produto final e não no processo de formação de biofilmes. Dessa forma, o objetivo geral deste projeto é desenvolver um produto eficiente de combate à bactérias formadoras de biofilmes do sistema de produção industrial de etanol, por meio da combinação de agentes bactericidas específicos para grupos bacterianos identificados. As etapas iniciais de processamento e extração do DNA das amostras foram realizadas com sucesso e a realização da análise metagenômica das amostras revelou a predominância de bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Weissella*. Adicionalmente foi realizada também uma análise da comunidade de bactérias do mosto nas dornas, revelando a predominância do gênero *Lactobacillus*, mostrando que bactérias presentes nos ternos de moenda podem ser fonte de contaminação para o mosto de fermentação. Os resultados parciais foram importantes para nos guiar em qual grupo bacteriano focar na construção do protótipo. Neste momento estão sendo realizadas pesquisas na literatura sobre quais os principais agentes já descritos no controle do gênero *Lactobacillus*.

Palavras-chave: microrganismos, contaminação, álcool, *lactobacillus*.

INTRODUÇÃO

A deposição de biofilmes tem gerado transtornos a indústria sucro-alcooleira devido ao acúmulo bactérias metabolizadoras de sacarose, glicose e frutose que consomem parte significativa dos carboidratos disponíveis e alteram as condições do meio, diminuindo a eficiência de fermentação etílica por meio das leveduras (LIMA et al., 1974). A maioria dos trabalhos que visam à detecção e controle de microrganismos nas usinas sucroalcooleiras foi realizada fora do Brasil e focam no controle da qualidade bacteriológica do produto final e não no processo de formação de biofilmes (SKINNER e LEATHERS, 2004; SKINNER-NEMEC et al., 2007; MILINTAWISAMAI et al.,

VIII Semana de Ciência e Tecnologia IFMG - campus Bambuí
VIII Jornada Científica

2007).O objetivo geral deste projeto é desenvolver um produto eficiente de combate às bactérias formadoras de biofilmes do sistema de produção industrial de etanol, por meio da combinação de agentes bactericidas específicos para grupos bacterianos identificados.

MATERIAL E MÉTODOS

Serão coletadas amostras de 25 cm² (5x5 cm) biofilme de cada um dos seis ternos de moenda para análise. Adicionalmente, cada amostra será dividida em uma sub-amostra de 1 cm de espessura da porção mais externa do biofilme e outra da porção mais interna, totalizando 12 amostras do biofilme. A caracterização dos grupos bacterianos será realizada pelo método de análise metagenômica, na qual é extraído o DNA total presente em cada amostra.



Figura 1. Esquema das etapas do projeto já executadas.

A partir da relação dos grupos de microrganismos identificados, será realizada uma busca dos agentes bactericidas mais eficazes para cada um dos grupos identificados e quatro protótipos combinando os agentes mais eficazes será preparado para este.

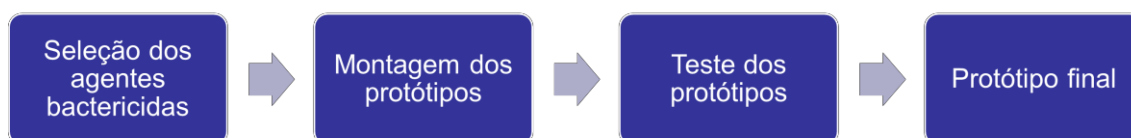


Figura 2. Esquema das etapas a serem executadas

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A etapa de coleta e extração de DNA foi realizada com êxito (figura 3). Como o processo de extração de DNA de material microbiano é um processo muito sensível, foi recomendado a utilização de um kit comercial de extração de DNA de microrganismos de solo, que é capaz de recuperar quantidades mínimas de DNA da amostra.

VIII Semana de Ciência e Tecnologia IFMG - *campus* Bambuí
VIII Jornada Científica



Figura 3. Material coletado nos ternos de moenda da usina para extração do DNA

A etapa de sequenciamento de DNA e identificação dos grupos bacterianos foi realizada utilizando o sequenciamento de nova geração na plataforma MiSeq (Illumina®) (figura 3). Esta plataforma de última geração substituiu a metodologia convencional de sequenciamento dos grupos bacterianos que exigia a construção de bibliotecas de DNA e amplificação dos DNAs alvo em clones por meio de vetores. A substituição da metodologia, além de reduzir o tempo de execução desta etapa em seis meses, ela permitiu a obtenção de 100 vezes mais sequências de DNA de microrganismos presentes na amostra, o que contribuiu para a identificação de grupos bacterianos presentes na amostra em pequenas quantidades.

O sequenciamento do DNA das amostras foi realizado com êxito de forma que foi possível identificar os principais grupos bacterianos presentes até o nível de gênero, e alguns até o nível de espécie. Foi verificada uma diferença na composição dos grupos presentes no primeiro terno de moenda (terno de entrada) em relação ao último terno de moenda (terno de saída), sendo que o gênero bacteriano mais abundante no início do processo de moenda da cana é o *Streptococcus* e o gênero mais abundante no final do processo é *Weissella* (figura 4).

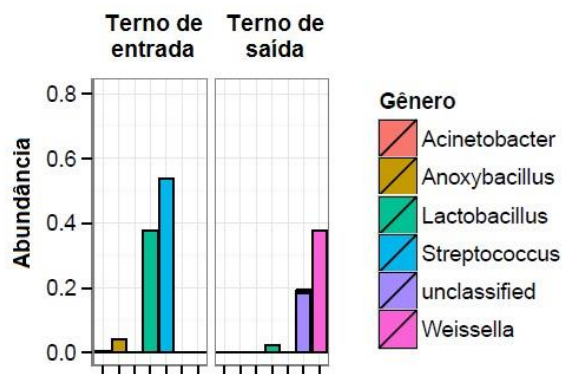


Figura 4. Abundância relativa dos grupos bacterianos encontrados nos ternos de moenda.

VIII Semana de Ciência e Tecnologia IFMG - *campus* Bambuí
VIII Jornada Científica

Como forma de se estimar se estes grupos bacterianos fazem parte da comunidade bacteriana que contamina o mosto de fermentação, causando prejuízos à produção de etanol tanto na forma de competição quanto alterando as condições do meio de crescimento das leveduras, foi realizada também uma análise da comunidade de bactérias do mosto nas dornas. Nesta análise foi claramente perceptível a predominância de bactérias do gênero *Lactobacillus*, gênero este, que estava presente nos ternos de moenda. Estes resultados mostram que bactérias presentes nos ternos de moenda podem ser fonte de contaminação para o mosto de fermentação.

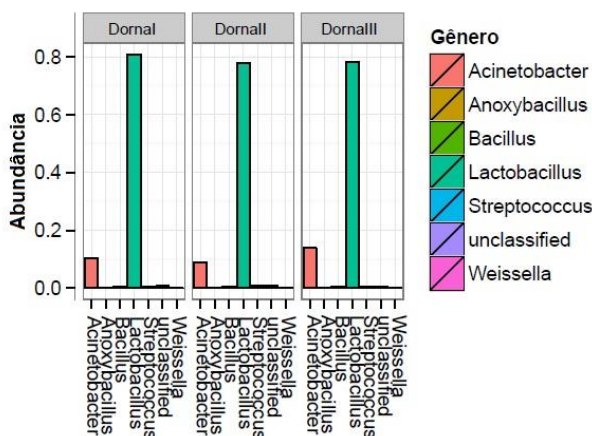


Figura 5. Abundância relativa dos grupos bacterianos encontrados no mosto presente nas dornas de fermentação

Por fim, buscou-se responder estes grupos bacterianos que estão presentes tanto nos ternos de moenda quanto nos tanques (dornas) de fermentação, tem origem na cana-de-açúcar que entra no processo, ou seja, elas já estão presentes desde a entrada da matéria-prima do processo de produção de etanol. Para isto, a mesma análise foi realizada na cana que entra no processo. Nesta análise foi verificada uma abundância muito pequena do gênero *Lactobacillus*, indicando que esta contaminação tem sua origem dentro de seu processamento na usina, e com fortes evidências de ser na etapa de moenda, uma vez que a moenda é o processo que se segue à chegada da cana na usina (figura 6). Os resultados preliminares mostram a importância de se controlar as populações de bactérias do gênero *Lactobacillus* já no processo de moenda como forma de minimizar a contaminação do mosto de fermentação.

VIII Semana de Ciência e Tecnologia IFMG - *campus* Bambuí
VIII Jornada Científica

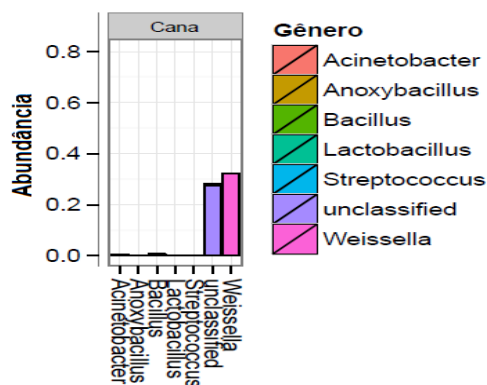


Figura 6. Abundância relativa dos grupos bacterianos encontradas em amostras da cana que chega à usina.

CONCLUSÕES

Os resultados parciais foram importantes para nos guiar em qual grupo bacteriano focar na construção do protótipo. Neste momento estão sendo realizadas pesquisas na literatura sobre quais os principais agentes já descritos no controle do gênero *Lactobacillus*. Espera-se que nos próximos 30 dias o protótipo esteja desenvolvido e finalizaremos este projeto. Esperamos que, utilizando as informações deste projeto, desenvolvamos um novo projeto com objetivo de desenvolver estratégias de controle dos microrganismos contaminantes no mosto de fermentação diretamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LIMA, U.A.; GOLDONI, J.S.; CEREDA, M.P. e SOUZA, L.O. (1974). Ocorrência de microrganismos em caldo bruto, clado misto e água de embebição de uma usina de açúcar de cana. **Brasil Açucareiro**. 83: 337-343.
- SKINNER, K.A. e LEATHERS, T.D. (2004). Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Indian Microbiology Biotechnology**. 31:401-408.
- SKINNER-NEMEC, K.A.; NICHOLS, N.N. e LEATHERS, T.D. (2007) Biofilm formation by bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Biotechnology Letters**. 29: 379-383.
- MILINTAWISAMAI, N.; NIAMSANIT, S.; NGASAN, C.; MAUNGMONTRI, R.; BUTTAPENG, W.; KOTRSRI, R.; PLIANSINCHAI, A. e WEERATHAWORN, P. (2009). Efficacy of dimethyl benzyl ammonium chloride and microbial contamination studies in a modern sugarcane milling unit in Thailand. **Sugar Technology**. 11: 208-212.