

# Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica

## Cellular viability of *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in association with contaminant bacteria of alcoholic fermentation

Thais de Paula NOBRE<sup>1</sup>, Jorge HORII<sup>2</sup>, André Ricardo ALCARDE<sup>2\*</sup>

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a influência de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*, bem como de seus produtos metabólicos, na redução da viabilidade celular de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. As bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum* foram cultivadas em associação com a levedura *S. cerevisiae* (cepa Y-904) por 72 horas a 32 °C, sob agitação. A viabilidade celular, a taxa de brotamento e a população de células de *S. cerevisiae* e a acidez total, a acidez volátil e o pH dos meios de cultivos foram determinados às 0, 24, 48 e 72 horas do cultivo misto. As culturas de bactérias foram tratadas através do calor, de agente antimicrobiano e de irradiação. Os resultados mostraram que apenas os meios de cultivo mais acidificados, contaminados com as bactérias ativas *L. fermentum* e *B. subtilis*, provocaram redução na viabilidade celular de *S. cerevisiae*. Excetuando a bactéria *B. subtilis* tratada com radiação gama, as demais bactérias tratadas pelos diferentes processos (calor, irradiação e antimicrobiano) não causaram diminuição da viabilidade celular e da população de *S. cerevisiae*, indicando que a presença isolada dos metabólitos celulares dessas bactérias não foi suficiente para reduzir a porcentagem de células vivas de *S. cerevisiae*.

**Palavras-chave:** fermentação alcoólica; viabilidade celular; *Saccharomyces cerevisiae*.

### Abstract

The aim of this project was to study the influence of the bacteria *Bacillus* and *Lactobacillus*, as well as their metabolic products to decrease the cellular viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The bacteria *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus plantarum* were cultivated in association with yeast *S. cerevisiae* (strain Y-904) for 72 hours at 32 °C under agitation. The cellular viability, budding rate and population of *S. Cerevisiae* and the total acidity, volatile acidity and pH of culture medium were determined at 0, 24, 48 and 72 hours of incubation of the mixed culture. The bacteria cultures were treated by heat sterilization, antibacterial agent and irradiation. The results showed that only the more acidified culture medium, contaminated with active bacteria *L. fermentum* and *B. subtilis*, caused a reduction in the yeast cellular viability. Except for the bacteria *B. subtilis* treated for radiation, the other bacteria treated by the different procedures (heat, radiation and antibacterial) did not cause a reduction in the cellular viability of *S. cerevisiae*, indicating that the isolated presence of the cellular metabolic of these bacteria was not enough to reduce the percentage of the living yeast cells.

**Keywords:** alcoholic fermentation, cellular viability, *Saccharomyces cerevisiae*.

## 1 Introdução

A agroindústria do álcool representa um considerável gerador econômico. Como toda a produção de álcool ocorre por via fermentativa, é fundamental o conhecimento do processo fermentativo, que tem sido constantemente aprimorado. A infecção bacteriana na fermentação pode causar danos ao processo tais como: consumo de açúcar; formação de goma; floculação do fermento; inibição e queda da viabilidade das leveduras devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio; e, por conseqüência, redução no rendimento e na produtividade da fermentação<sup>4,6,26</sup>.

Pesquisas realizadas na área de fermentação mostram que as bactérias do grupo Gram-positivo são os microrganismos contaminantes que predominam na fermentação alcoólica, sendo os gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus* os de maior ocorrência<sup>14,22,23</sup>. Diversos autores verificaram influência dos ácidos

acético e láctico na inibição do crescimento e na queda da viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae*, quando em cultura mista com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. Esses autores citaram que, quando a contaminação bacteriana atinge níveis superiores a 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup> de mosto, pode ocorrer uma significativa queda no rendimento alcoólico<sup>4,6,13,16-18,20,25,26</sup>.

Existem controvérsias na literatura descrevendo o efeito de bactérias lácticas sobre o rendimento em etanol de fermentações alcoólicas. Apesar de uma significativa soma de pesquisas na área, o efeito de bactérias lácticas em fermentações catalisadas por leveduras permanece confuso. CHIN e INGLEDEW<sup>12</sup> relataram que a contaminação com aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> de bactérias produtoras de ácido láctico não afetou seriamente a produtividade em etanol na fermentação de malte de trigo. BAYROCK e INGLEDEW<sup>7</sup>, introduzindo *L. paracasei* como contaminante em um sistema contínuo de fermentação, observaram que nem a bactéria e nem seus produtos metabólicos (ácido láctico) afetaram a concentração de etanol ou a viabilidade da levedura.

Estudos de CHERUBIN<sup>11</sup> e de BAYROCK e INGLEDEW<sup>9</sup> não mostraram relação entre contaminação bacteriana e viabilidade de levedura, nem entre contaminação bacteriana e ren-

Recebido para publicação em 2/8/2005

Aceito para publicação em 24/1/2007 (001584)

<sup>1</sup> Ciência e Tecnologia de Alimentos,

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ,

Universidade de São Paulo – USP

<sup>2</sup> Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ,

Universidade de São Paulo – USP, CP 9, CEP 13418-900, Piracicaba - SP, Brasil

E-mail: jhorii@carpa.ciagri.usp.br, aralcard@carpa.ciagri.usp.br

\*A quem a correspondência deve ser enviada

dimento fermentativo. No entanto, a contaminação bacteriana é certamente um dos fatores preponderantes dentre aqueles que podem afetar a fermentação alcoólica, pois está sempre presente em processos industriais de produção de etanol por via fermentativa.

Os métodos tradicionais empregados pela indústria sucroalcooleira para o tratamento do mosto com o objetivo de reduzir sua carga microbiana contaminante preconizam o uso de antibióticos e de ácido sulfúrico concentrado. A sensibilidade das bactérias contaminantes frente a novos agentes antimicrobianos tem sido largamente estudada<sup>1,3,21,24</sup>. Considerando o crescente conceito de que as bactérias desenvolvem uma resistência aos antibióticos, a estratégia de inocular uma alta taxa de leveduras é um meio de minimizar os efeitos causados pela contaminação bacteriana<sup>19</sup>. O uso da radiação pode ser uma alternativa de descontaminação do mosto de cana-de-açúcar. ALCARDE et al.<sup>2</sup> demonstraram a eficiência da redução microbiológica contaminante do mosto de cana-de-açúcar por radiação gama.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Lactobacillus*, bem como de seus produtos metabólicos, na redução da viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, quando em cultura mista de levedura e bactérias. A influência dos produtos metabólicos das bactérias sobre a viabilidade celular da levedura foi estudada através de cultivo misto de levedura ativa e bactérias tratadas por calor, antimicrobiano e irradiação. Os parâmetros analisados foram: pH, acidez total e volátil do meio, viabilidade celular, taxa de brotamento e população de células de *S. cerevisiae*.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Microrganismos

Foram utilizadas culturas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cepa Y-904 (AB Brasil) e isolados das bactérias *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum*, que fazem parte da coleção de culturas do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

### 2.2 Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

A cultura de *S. cerevisiae* foi mantida em meio de cultura "yeast extract peptone dextrose-agar" (YEPD-agar), submersa em óleo mineral, sob temperatura de 4 °C. Para sua reativação foi transferida uma alça da cultura de manutenção para tubo de ensaio com 9,0 mL de caldo YEPD, com posterior incubação a 32 °C por 48 horas. Em seguida, nova transferência foi efetuada nas mesmas condições anteriores. Após a incubação, o conteúdo de dois tubos de ensaio (18 mL) foi transferido para erlenmeyer contendo 1000 mL do meio MCC (meio à base de caldo de cana, preparado a partir de caldo de cana-de-açúcar fervido por 20 minutos, resfriado e filtrado em algodão, diluído com água destilada para 5,0 ± 0,1 °Brix e suplementado com 1,0% de extrato de levedura e 1,0% de peptona) e incubado a 32 °C por 48 horas.

### 2.3 Cultivo das bactérias

As culturas das bactérias dos gêneros *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. coagulans*, e *B. stearothermophilus*) e *Lactobacillus* (*L. fermentum* e *L. plantarum*) foram mantidas em meio *Litmus Milk*, sob temperatura de -18 °C. Na reativação, a cultura de manutenção, contendo a suspensão bacteriana congelada, foi colocada em incubadora a 32 °C por 48 horas. Após o desenvolvimento da cultura, transferiu-se uma alíquota de 1,0 mL para tubo de ensaio com 9,0 mL de caldo GLT (glicose – 0,1%, extrato de levedura – 0,25%, triptona – 0,5%) para os *Bacillus* ou MRS (*Lactobacilli* "Man, Rogosa, Sharpe") para os *Lactobacillus*, com posterior incubação a 32 °C por 48 horas. Em seguida, nova transferência foi efetuada nas mesmas condições anteriores. Após a incubação, o conteúdo do tubo de ensaio (10 mL) foi transferido para erlenmeyer contendo 500 mL do meio MCC, com posterior incubação a 32 °C por 48 horas.

### 2.4 Procedimento para obtenção de culturas mistas de bactérias e *Saccharomyces cerevisiae*

O procedimento de obtenção das culturas mistas com bactérias ativas ocorreu a partir de 500 mL de meio MCC inoculado com a cultura de bactéria e deste foram transferidas alíquotas de 50 mL em 8 frascos erlenmeyer, adicionados de alíquotas de 50 mL do meio MCC inoculado com a cultura de *S. cerevisiae*. Como controle foram utilizadas alíquotas de 50 mL do meio MCC inoculado com a cultura da levedura, adicionados de 50 mL do meio MCC estéril. Todos os frascos (amostras e controles) foram mantidos a 32 °C por 72 horas, em incubador com agitação circular de 50 rpm.

As culturas mistas de *S. cerevisiae* com bactérias tratadas receberam os mesmos procedimentos de obtenção da cultura mista de *S. cerevisiae* com bactérias ativas, porém 24 horas antes da mistura, os meios MCC inoculados com as culturas de bactérias receberam um dos tratamentos especificados a seguir: tratamento pelo calor, por agente antimicrobiano ou por irradiação.

O tratamento por calor foi realizado por meio de autoclavagem a 121 °C (1 atm) por 20 minutos. O tratamento por antimicrobiano foi realizado pela aplicação do produto comercial Kamoran HJ, na concentração de 3,0 ppm e incubação por 24 horas a 32 °C<sup>1,3,21</sup>. O tratamento por irradiação foi realizado por radiação gama, com doses de 5,0 kGy para os *Lactobacillus* e 15,0 kGy para os *Bacillus*. Estas doses foram escolhidas segundo resultados obtidos por ALCARDE<sup>1</sup>, que estudou a inativação de bactérias *Bacillus* e *Lactobacillus* em mosto de caldo de cana. A irradiação foi efetuada em irradiador Gammacell 220 Escel MDS Nordion, emissor de radiação gama provenientes do Cobalto-60, instalado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, em Piracicaba - SP.

### 2.5 Determinações físico-químicas e microbiológicas

As análises físico-químicas de acidez total, acidez volátil e o pH do meio e as microbiológicas de viabilidade celular, taxa

de brotamento e população de células de *S. cerevisiae* foram realizadas às 0, 24, 48 e 72 horas do cultivo misto de bactérias (ativas ou tratadas) e *S. cerevisiae*.

#### Acidez total e volátil

A determinação da acidez total e da acidez volátil do meio foi realizada por metodologia proposta por AMERINE e OUGH<sup>5</sup>.

#### pH

A determinação do pH foi efetuada através do potenciômetro modelo DMPH-1, marca Digimed, seguindo a metodologia proposta pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ<sup>15</sup>.

#### Viabilidade celular, brotamento e população de células da levedura

A viabilidade celular, o brotamento e a população de células da levedura *S. cerevisiae* foram determinados pela coloração diferencial das células pela solução de eritrosina de acordo com a metodologia descrita por OLIVEIRA et al.<sup>21</sup>.

#### Plaqueamentos dos microrganismos

As contagens bacteriológicas foram realizadas às 0 e 72 horas de cultivo. A semeadura em placas para contagem das unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL<sup>-1</sup>) foi realizada pela técnica de plaqueamento em profundidade ("Pour Plate"), utilizando os meios de cultivo convencionais (PCA - "Plate Counter Agar" para os *Bacillus* e MRS-agar para os *Lactobacillus*). As placas foram incubadas a 32 °C por 24-48 horas para crescimento e posterior contagem das colônias. O crescimento da levedura nos plaqueamentos bacteriológicos foi inibido pela adição de Actidiona na concentração de 10 ppm.

### 3 Resultados e discussão

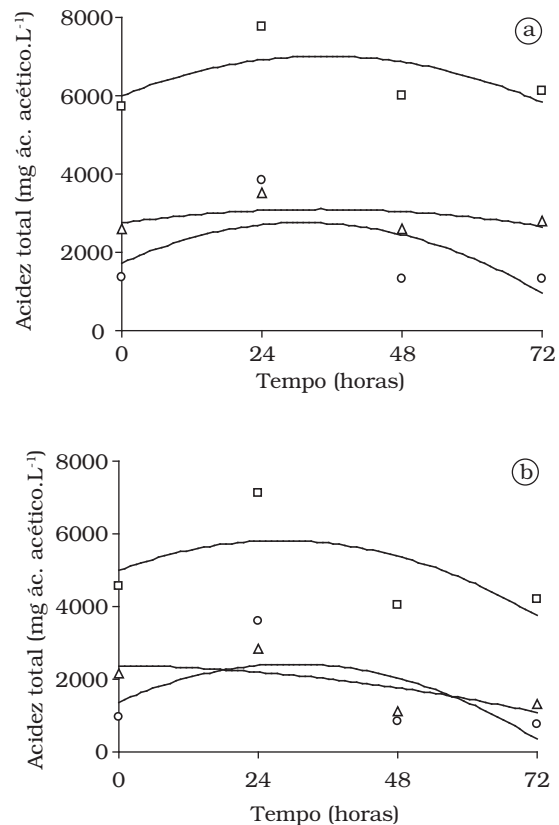
As contagens bacteriológicas realizadas às 0 e 72 horas de cultivo apresentaram níveis de 10<sup>6</sup>-10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Estes níveis de contaminação são considerados prejudiciais ao rendimento da fermentação e à viabilidade celular de leveduras<sup>4,6,16,18</sup> e confirmam a sobrevivência das bactérias ativas durante o ensaio envolvendo a levedura *S. cerevisiae*.

As culturas de bactérias, com níveis de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, foram tratadas pelo calor, de agente antimicrobiano e de irradiação, 24 horas antes das misturas com *S. cerevisiae*. O processo de inativação pelo calor proporcionou esterilização das culturas bacterianas. O antimicrobiano Kamoran HJ, na dose de 3,0 mg.L<sup>-1</sup>, não foi suficiente para a completa inativação das bactérias estudadas, porém foi capaz de causar uma redução superior a 99,9%. A radiação gama, nas doses utilizadas para os diferentes gêneros de bactérias (5,0 kGy para *Lactobacillus* e 15,0 kGy para *Bacillus*) inativou completamente os *Lactobacillus*, mas não foi suficiente para inativar totalmente os *Bacillus*, contudo também foi capaz de causar uma redução superior a 99,9% para essas bactérias.

De modo geral, a acidez total e a acidez volátil dos meios de cultivos inoculados ou não com as diferentes bactérias ativas ou tratadas aumentaram nas 24 horas iniciais do cultivo, vindo posteriormente a diminuir até as 72 horas, que foi o término do cultivo. Conseqüentemente, o pH desses meios apresentou tendência inversa, isto é, diminuiu até 24 horas e, em seguida, aumentou até 72 horas dos cultivos mistos de bactérias ativas ou tratadas e *S. cerevisiae*.

Os valores de acidez total, volátil e pH dos cultivos mistos de *S. cerevisiae* com *B. stearotherophilus* ou *B. coagulans* ou *L. plantarum* ativas ou tratadas por qualquer tratamento não diferiram estatisticamente do tratamento controle. Nestes casos, onde os valores de acidez total e volátil desde o início foram semelhantes ao controle, pressupõe-se que os ácidos foram produzidos quase que exclusivamente por *S. cerevisiae*.

Ao contrário dos outros cultivos mistos, *L. fermentum*, ativo ou tratado por qualquer um dos tratamentos, apresentou valores superiores de acidez total (Figuras 1a e 1b) e de acidez volátil. Conseqüentemente, apresentou valores inferiores de pH durante todos os ensaios, diferindo estatisticamente do tratamento controle. Assim, dentre os microrganismos estudados, essa bactéria foi a mais eficiente produtora de ácidos orgânicos. A bactéria *B. subtilis* ativa ou tratada por irradiação também se destacou na produção de ácidos (Figuras 1a e 1b), apresentando concentrações de acidez total e volátil intermedi-



**Figura 1.** Variações da acidez total durante os cultivos mistos de *S. cerevisiae* com as bactérias ativas (a) e irradiadas (b). *B. subtilis* (Δ), *L. fermentum* (□). Controle (○) refere-se a *S. cerevisiae* cultivada sem a presença de bactérias.

árias às concentrações observadas para *L. fermentum* e para o tratamento controle.

A viabilidade celular de *S. cerevisiae* foi afetada apenas no cultivo misto com *L. fermentum* ou *B. subtilis* ativos (Figura 2a), os quais diminuíram significativamente as porcentagens de células vivas de *S. cerevisiae* ao longo do período de cultivo. O cultivo misto de *S. cerevisiae* e *B. subtilis* reduziu em 59,2% a viabilidade da levedura, enquanto o cultivo misto com *L. fermentum* reduziu em 73,5% a viabilidade da levedura *S. cerevisiae*.

As demais bactérias ativas não influenciaram a viabilidade celular de *S. cerevisiae*, pois nos cultivos associados da levedura com as bactérias *B. stearothermophilus*, *B. coagulans* ou *L. plantarum* a porcentagem de células vivas de *S. cerevisiae* ao longo do período de incubação foi semelhante e não apresentou diferença estatística em relação ao controle. Este fato também foi observado nos cultivos mistos de *S. cerevisiae* e todas as bactérias tratadas com calor ou Kamoran HJ, onde a viabilidade manteve-se estável e constante em todos os ensaios.

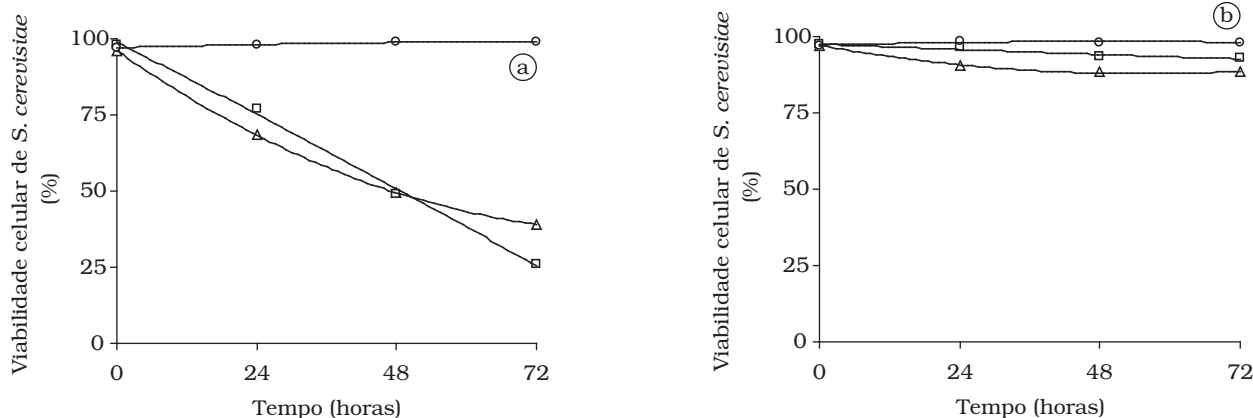
A única bactéria tratada por radiação gama que realmente interferiu na viabilidade celular de *S. cerevisiae* foi *B. subtilis*, reduzindo a viabilidade das leveduras para 88,50% (Figura 2b). Isto sugere que a população remanescente da bactéria, após a irradiação, trouxe consigo no meio de cultura substâncias capazes de reduzir ou inibir, de alguma maneira, o desenvolvimento de *S. cerevisiae*.

A maioria das bactérias ativas afetou o brotamento de *S. cerevisiae*, pois ao longo dos cultivos mistos as porcentagens de brotos foram menores que no tratamento controle. Quando em cultivo misto com bactérias tratadas, a taxa de brotamento de *S. cerevisiae* apresentou o mesmo comportamento em todos os tratamentos, como apresentado na Tabela 1. Nestes casos a taxa de brotamento diminuiu ao longo do período de incubação para a maioria dos cultivos mistos, com exceção do cultivo misto de *S. cerevisiae* com *L. fermentum*, o qual apresentou as maiores taxas de brotamento durante todos os ensaios com os diferentes tratamentos.

Pela Tabela 1, observa-se que a taxa de brotamento não apresentou tendência definida e não guarda necessariamente relação com o crescimento do fermento e nem com a viabilidade, pois, segundo CARVALHO<sup>10</sup>, esta é uma medida pontual e pode sofrer a crítica de que o broto demora mais ou não se desprende da célula mãe se a condição nutricional assim induzir.

A população de células de *S. cerevisiae* quando em cultivo misto com bactérias ativas ou tratadas, apesar de mostrar-se diferente do controle em quase todos os períodos, apresentou valores próximos em UFC.mL<sup>-1</sup> nos diferentes tratamentos. Observou-se uma relação direta entre a porcentagem de viabilidade e a população de células de *S. cerevisiae*.

Portanto, os resultados da presente pesquisa mostraram que apenas os meios de cultivo mais acidificados (Figura 1a), aqueles inoculados com as bactérias ativas *L. fermentum* ou



**Figura 2.** Variações da viabilidade celular de *S. cerevisiae* durante os cultivos mistos com as bactérias ativas (a) e irradiadas (b). *B. subtilis* (Δ), *L. fermentum* (◻). Controle (○) refere-se a *S. cerevisiae* cultivada sem a presença de bactérias.

**Tabela 1.** Teste de Tukey para as médias de "Taxa de brotamento de *S. cerevisiae*", comparando os microrganismos e os períodos, em cultura mista de *S. cerevisiae* e bactérias tratadas com Kamoran HJ.

Períodos (horas)	Cultivo misto de <i>S. cerevisiae</i> com					<i>S. cerevisiae</i> (controle)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Lactobac. plantarum</i>	<i>Lactobac. fermentum</i>	
Taxa de brotamento de <i>S. cerevisiae</i> (%)						
0	15,75 <sup>Aa</sup>	15,60 <sup>ABa</sup>	12,75 <sup>ABa</sup>	27,15 <sup>Ab</sup>	33,55 <sup>Ab</sup>	22,25 <sup>Aa</sup>
24	20,10 <sup>Aab</sup>	22,20 <sup>Aab</sup>	20,20 <sup>Aa</sup>	15,05 <sup>Ba</sup>	25,30 <sup>ABb</sup>	22,05 <sup>Aab</sup>
48	14,80 <sup>Aab</sup>	14,05 <sup>ABa</sup>	11,85 <sup>ABa</sup>	8,75 <sup>Ba</sup>	24,30 <sup>ABb</sup>	16,05 <sup>Aab</sup>
72	15,85 <sup>Aab</sup>	10,60 <sup>Ba</sup>	10,00 <sup>Ba</sup>	8,90 <sup>Ba</sup>	21,75 <sup>Bb</sup>	14,10 <sup>Aab</sup>

Obs.: Médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si de acordo com o teste de Tukey ao nível de 1% de significância.



*B. subtilis*, provocaram diminuição da viabilidade celular de *S. cerevisiae* (Figura 2a). Os maiores valores de acidez total corresponderam às menores porcentagens de viabilidade de *S. cerevisiae*, pois nos cultivos mistos de *S. cerevisiae* com *L. fermentum* ou *B. subtilis* os valores de acidez total durante as 72 horas do ensaio atingiram, respectivamente, médias de 6,4 e 2,9 g.L<sup>-1</sup>, expressos em ácido acético, enquanto que a viabilidade da levedura reduziu-se em 73,5 e 59,2%, respectivamente.

Estes resultados concordam com os obtidos por diversos autores<sup>4,12,13,18,20,26</sup>, os quais também observaram correlação entre o aumento da acidez do meio e a diminuição da viabilidade celular da levedura em cultivo associado com bactérias.

THOMAS et al.<sup>25</sup> pesquisaram o efeito de *Lactobacillus* (*L. collinoides*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. paracasei*) em cultura mista com *S. cerevisiae* e relataram que a inoculação das bactérias na fermentação anteriormente à da levedura ocasionou aumento do desvio de carboidratos para a produção de ácido láctico, queda na viabilidade e redução na formação de massa celular da levedura. Entretanto, os mesmos autores observaram que quando as bactérias foram inoculadas ao mesmo tempo e com o mesmo nível que as leveduras, 10<sup>7</sup> células.mL<sup>-1</sup>, o crescimento das bactérias foi inibido e a viabilidade da levedura não foi significativamente afetada.

BAYROCK e INGLEDEW<sup>7,9</sup> e CHERUBIN<sup>11</sup> também observaram que a viabilidade celular da levedura não foi afetada pela presença de bactérias em diferentes mostos de fermentação. Alguns resultados do presente trabalho conferem com os autores anteriormente citados, pois as bactérias ativas *B. stearothersophilus*, *B. coagulans* e *L. plantarum* em cultivos mistos com *S. cerevisiae* não influenciaram a viabilidade celular da levedura e seguiram a mesma tendência do tratamento controle, apresentado na Figura 2a.

O objetivo dos diferentes tratamentos empregados neste trabalho foi avaliar a influência dos produtos metabólicos das culturas isoladas de bactérias sobre a viabilidade celular de *S. cerevisiae*. O único tratamento capaz de inativar 100% das bactérias em estudo foi o calor úmido e, para este tratamento, observou-se que a viabilidade de *S. cerevisiae* não foi afetada durante o ensaio. Estes resultados indicaram que, na ausência de células vivas, a presença isolada dos metabólitos celulares dessas bactérias não foi suficiente para reduzir a porcentagem de células vivas de *S. cerevisiae*.

Vale ressaltar o comportamento da bactéria *B. subtilis* tratada pela radiação gama. Observa-se que a viabilidade celular (Figura 2b) e a população de células de *S. cerevisiae* cultivada nesse tratamento diminuíram durante o período de incubação. Isto aconteceu provavelmente porque o tratamento utilizado, de 15 kGy de radiação gama, não foi suficiente para inativar completamente a cultura dessa bactéria. Assim, as células remanescentes da bactéria *B. subtilis* reduziram a porcentagem de células vivas de *S. cerevisiae*, conforme observado no tratamento com a bactéria ativa (Figura 2a), porém em menor intensidade, provavelmente devido à menor densidade populacional da bactéria no meio irradiado.

Estes resultados, mais uma vez, indicam que a presença isolada dos metabólitos celulares dessas bactérias não foi

suficiente para reduzir a porcentagem de células vivas de *S. cerevisiae*. Este ponto de vista também é discutido por BAYROCK e INGLEDEW<sup>8</sup>, que atribuíram a redução de 83% da viabilidade de *S. cerevisiae* à competição por nutrientes do substrato pelas células vivas e não ao ácido láctico formado por *L. paracasei*.

#### 4 Conclusões

- Das bactérias ativas testadas, somente *L. fermentum* e *B. subtilis* reduziram a viabilidade celular de *S. cerevisiae* em cultivo misto;
- Nas condições do cultivo, as bactérias *L. plantarum*, *B. coagulans* e *B. stearothersophilus* e/ou seus produtos metabólicos não influenciaram a viabilidade celular da levedura;
- A presença isolada dos metabólitos celulares de todas as bactérias não foi suficiente para reduzir as porcentagens de células vivas de *S. cerevisiae*; e
- A acidez do meio juntamente com a presença das bactérias ativas foram os principais fatores relacionados à redução da viabilidade celular de *S. cerevisiae*.

#### Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

#### Referências bibliográficas

1. ALCARDE, A. R. **Efeito da radiação gama em alguns parâmetros microbiológicos e bioquímicos da fermentação alcoólica**. Piracicaba, 2000, 111 p. Tese (Doutor em Ciências), Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo (USP), 2000.
2. ALCARDE, A. R.; WALDER, J. M. M.; HORII, J. Fermentation of irradiated sugarcane must. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 4, p. 677-681, 2003.
3. ALCARDE, V. E. **Avaliação de antimicrobianos em germinação de esporos e na multiplicação de bactérias isoladas de processos de fermentação alcoólica**. Piracicaba, 1995, 114p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (USP), 1995.
4. ALTERTHUM, F. et al. Efeito dos microrganismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 3, n. 1, p. 42-49, 1984.
5. AMERINE, M. A.; OUGH, C. S. **Wine and must analysis**. London: John Wiley & Sons, 1974.
6. AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Álcool e Açúcar**, v. 2, n. 5, p. 12-18, 1982.
7. BAYROCK D.; INGLEDEW, W. M. Changes In steady state on introduction of a *Lactobacillus* contaminat to a continuous culture ethanol fermentation. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 39-45, 2001.
8. \_\_\_\_\_. Inhibition of yeast lactic acid bacteria in continuous culture: nutrient depletion and/or acid toxicity?. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 362-368, 2004.

9. \_\_\_\_\_. Ethanol production in multistage continuous, single stage continuous, *Lactobacillus*-contaminated continuous, and batch fermentations. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 83-88, 2005.
10. CARVALHO, R. S. **Interação entre leveduras e bactérias durante a fermentação alcoólica**. Piracicaba, 2001, 74 p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (USP), 2001.
11. CHERUBIN, R. A. **Efeito da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. Piracicaba, 2003, 124 p. Tese (Doutor em Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (USP), 2003.
12. CHIN, P. M.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactic acid bacteria on wheat mash fermentation prepared with laboratory backset. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 16, n. 4, p. 311-317, 1994.
13. FREGUGLIA, R. M. O. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura mista com *Lactobacillus fermentum***. Piracicaba, 1997, 104 p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (USP), 1997.
14. GALLO, C. R.; CANHOS, V. P. Contaminantes bacterianos na fermentação alcoólica – revisão. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 9, n. 1, p. 35-40, 1991.
15. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para a análise de alimentos**. 3ª. Edição, v. 1. São Paulo: INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985.
16. KHAN, A. R.; HOQ, M. M. Lactic acid bacteria as contaminant in alcohol fermentation. **Bangladesh Journal of Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 119-121, 1990.
17. MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. H. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 3, p. 103-121, 1983.
18. MAKANJUOLA, D. B.; TYMON, A.; SPRINGHAM, D. G. Some effects of lactic acid bacteria on laboratory-scale yeast fermentation. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 14, n. 4, p. 350-357, 1992.
19. NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactocilli during fermentation of corn mash. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 581-584, 2004.
20. OLIVA-NETO, P. **Influência da contaminação por bactérias lácticas na fermentação alcoólica por batelada-alimentada**. Campinas, 1990, 199 p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 1990.
21. OLIVEIRA, A. J. et al. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ-USP, 1996.
22. ROSALES, S. Y. R. **Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes**. Rio Claro, 1989, 200 p. Tese (Doutor em Microbiologia Aplicada), Faculdade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), 1989.
23. SKINNER, K. A.; LEATHERS, T. D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 401-408, 2004.
24. STUPIELLO, M. G. **Avaliação de metodologia para estudo de alguns antimicrobianos frente às bactérias gram (+) isoladas da fermentação alcoólica**. Piracicaba, 1993, 96 p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (USP), 1993.
25. 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**, v. 90, n. 3, p. 819-828, 2001.
26. YOKOYA, F. Problemas com contaminantes na fermentação alcoólica. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 9, n. 6, p. 38-39, 1991.