



## Resumo Expandido

<b>Título da Pesquisa (Português):</b> Desenvolvimento de um produto de controle de bactérias formadoras de biofilmes do sistema de produção industrial de etanol		
<b>Título da Pesquisa (Inglês):</b> Development of a product of biofilm control on industrial production of sugarcane ethanol		
<b>Palavras-chave:</b> biofilme – etanol – cana de açúcar - bactericida		
<b>Keywords:</b> biofilm – ethanol – sugarcane - antimicrobial		
<b>Campus:</b> Bambuí	<b>Tipo de Bolsa:</b> PIBIC	<b>Financiador:</b> CNPq
<b>Bolsista(s):</b> Juliana Fernandes e Elizandra Faria Viana		
<b>Professor Orientador:</b> Alcilene de Abreu Pereira		
<b>Área de Conhecimento:</b> microbiologia aplicada		<b>Editais:</b> 156/2013

**Resumo:** A deposição de biofilmes tem gerado transtornos a indústria sucro-alcooleira devido ao acúmulo de 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 estão em andamento. Esperamos caracterizar os grupos bacterianos ao longo deste semestre e realizar os testes de eficiência dos protótipos no primeiro semestre do próximo ano.

**Abstract:** Biofilm formation has generated losses to ethanol industry due the accumulation of sucrose, glucose e fructose metabolizing bacteria that consume a significant portion of the available carbohydrates and alter the the conditions of the yeasts environment, reducing the ethyl fermentation efficiency. Most research dedicated to the detection and control microbial on processes of sugarcane ethanol production has been focused on the quality of the final product over the biofilm formation process. Thus, the aim of this project is to develop an effective product to control biofilm formation over industrial ethanol production, through a specific antibacterial agents combination. The initial stages - processing and DNA extraction of the samples were accomplished successfully and the performing of metagenomics analysis of the samples is on progress. We expect to describe the bacterial groups throughout this semester and perform the prototype efficiency tests in the first half of next year.

### INTRODUÇÃO:

O solo abriga uma comunidade muito diversa de microrganismos e a contaminação microbiológica que atinge a cada um dos processos de produção de açúcar e etanol em sua maior parte tem origem no solo. A contaminação chega até à indústria por meio do transporte acidental de matéria orgânica aderida às raízes, caule, folhas, água e partículas carregadas pelo ar que ficam aderidas ao material coletado no campo (chegando a até  $10^8$  unidades formadoras de colônias por peça de cana colhida) (LIMA et al., 1974). Durante a colheita, transporte e

armazenamento, parte destes microrganismos do solo tendem a penetrar os colmos através de lesões e se multiplicam ali. Dessa forma grande parte destas espécies da comunidade microrganismos presentes no solo que chegam às usinas, encontram no caldo da cana obtido no processo de moenda condições ideais para o seu desenvolvimento, incluindo água, pH, temperatura e principalmente abundância de carboidratos disponíveis (SKINNER-NEMEC et al., 2007).

Em condições favoráveis ao crescimento, os microrganismos são atraídos naturalmente para superfícies sólidas onde se acumulam nutrientes disponíveis para sua multiplicação. Considerando o sistema de produção sucro-alcooleira, estes microrganismos tendem a se fixar nas paredes dos ternos de moenda, estabelecendo uma interação fraca com o substrato (adesão reversível). Posteriormente, parte destes organismos pode aderir mais fortemente ao substrato (adesão irreversível) com auxílio de flagelos, fímbrias, pili e secreção de material de natureza polissacarídica extracelular, formando uma colônia de células aderida (ALLISON e SUTHERLAND, 1987). Esta adesão de colônias de células condiciona a superfície para a adesão de novas células devido à produção de polímeros extracelulares (*EPS – extracelular polymeric substances*), aumentando o número e a diversidade de colônias aderidas (CHARACKLIS e MARSHALL, 1990). A contínua adesão de bactérias e o conseqüente aumento de produção de EPS, somado ao acúmulo de outras moléculas forma uma camada de material orgânico e inorgânica comumente conhecida como biofilme (KUMAR e ANAND, 1998).

A deposição de biofilmes tem gerado transtornos para o setor industrial pelo fato destes encrustarem em tubulações nas quais eles se formam diminuindo a vazão, acumularem colônias de bactérias patogênicas em estações de processamento de alimentos líquidos, e no caso mais específico da indústria sucro-alcooleira, acumulam bactérias metabolizadoras de sacarose, glicose e frutose que consomem parte significativa dos carboidratos disponíveis e alteram as condições do meio (produção de ácido láctico e acético), diminuindo a eficiência de fermentação etílica por meio das leveduras (NARENDRANATH et al., 2001).

De uma maneira geral, os métodos de prevenção de acumulação de biofilmes envolvem três tipos de abordagens: (1) físicas; (2) químicas e; (3) biológicas. As abordagens físicas incluem a remoção direta do material e métodos indiretos de exposição à super campos magnéticos, ultrassons e campos elétricos pulsados, sendo métodos de maior custo de implementação. As abordagens químicas envolvem a aplicação de compostos químicos de natureza diversa que visam a quebra da matriz de polissacarídeos. Já as abordagens biológicas envolvem a aplicação de antibióticos e bacteriocinas de amplo espectro que impedem a adesão das bactérias ao substrato (KUMAR e ANAND, 1998). Entretanto já foi observado que estratégias de utilização de agentes bactericidas de maneira genérica aumenta a velocidade na qual as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos aplicados, dificultando o controle da formação de biofilmes (FRANK e KOFFI, 1990; KRYSINKI et al., 1992).

A maioria dos trabalhos que visam à detecção e controle de microrganismos nas usinas sucroalcooleiras foram realizados fora do Brasil e focam no controle da qualidade bacteriológica do produto final e não no processo de formação de biofilmes no processo de moenda, mesmo este sendo um problema bem conhecido (SKINNER e LEATHERS, 2004; SKINNER-NEMEC et al., 2007; MILINTAWISAMAI et al., 2007; AHMED et al., 2010). Dessa forma, é necessária a caracterização das comunidades de bactérias formadoras de biofilmes no processo de moenda e, a partir da identificação de quais grupos bacterianos estão presentes, desenvolver um produto eficaz que combine os melhores agentes bactericidas específicos para os grupos identificados. Neste contexto, 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.

Ao final da execução do projeto espera-se obter um produto, que corresponde à melhor combinação de agentes bactericidas identificado, capaz de controlar de forma eficaz o crescimento de bactérias formadoras de biofilmes no processo de moagem da cana-de-açúcar na produção industrial de etanol. Consideramos ainda que o produto gerado tem potencial para geração de uma patente, caracterizando a Pesquisa Aplicada.

#### **METODOLOGIA:**

Com o intuito de melhor caracterizar a comunidade de bactérias presentes no biofilme, serão coletadas amostras de 25 cm<sup>2</sup> (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 serem analisados separadamente e depois comparados.

A caracterização dos grupos bacterianos será realizada pelo método de análise metagenômica, na qual é extraído o DNA total presente em cada amostra coletada e cada grupo bacteriano presente é identificado por diferenças únicas no seu DNA.

A partir da relação dos grupos bacterianos identificados (como descrito no item 3.2), será realizada uma busca na literatura especializada dos agentes bactericidas mais eficazes para cada um dos grupos bacterianos identificados.

Para a fase de testes, será selecionado pelo menos um agente bactericida para cada grupo bacteriano identificado e os agentes eficazes para mais de um grupo bacteriano identificado terão preferência, a fim de reduzir os custos de produção do produto final. Os agentes selecionados serão combinados para a formação de protótipos a serem testados em ambiente controlado de laboratório. Pelo menos quatro protótipos, resultado de combinações diferentes de agentes bactericidas, serão produzidos para a fase de testes.

Os testes de eficiência dos protótipos constituirão de: (1) de cultivo da comunidade bacteriana do biofilme em meio nutritivo; (2) montagem de um sistema comparativo no qual serão

aplicados o produto em quatro réplicas teste e quatro réplicas testemunha (sem a aplicação do produto); (3) acondicionamento das placas teste e testemunha às mesmas condições de crescimento controlado; e (4) avaliação comparativa do crescimento bacteriano nas placas teste e testemunha. Será considerado o produto mais eficiente, aquele que melhor controlar o crescimento bacteriano nos testes de eficiência.

#### **RESULTADOS E DISCUSSÕES:**

O projeto encontra-se em andamento e até o momento da redação deste resumo, as amostras do material coletado já foram processadas e o DNA total já foi extraído. A caracterização dos grupos bacterianos já está em processamento e tem estimativa de término nos próximos dois meses. Esperamos, a partir dos dados obtidos na etapa de caracterização dos grupos bacterianos, formular os protótipos até o final deste semestre e realizar os testes ao longo do primeiro semestre de 2016. O projeto encontra-se com atraso pois foram necessárias coletas adicionais de material que só foram possíveis de ser realizadas no processamento da safra de cana de 2015 (primeiro semestre de 2015).

#### **CONCLUSÕES:**

As etapas iniciais de processamento e extração do DNA das amostras foram realizadas com sucesso e a realização da análise metagenômica das amostras estão em andamento. Esperamos caracterizar os grupos bacterianos ao longo deste semestre e realizar os testes de eficiência dos protótipos no primeiro semestre do próximo ano.

#### **REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:**

AHMED, A.; DAWAR, S. e TARIQ, M. (2010). Mycoflora associated with sugar cane juice in Karachi City. **Pakistan Journal of Botany**. 42: 2955-2962.

ALLISON, D.G. e SUTHERLAND, I.W. (1987). The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. **Journal of Genetic Microbiology**. 133: 1319–1327.

CHARACKLIS, W.G. e MARSHALL, K.C. (1990). *Biofilms*. John Wiley, New York, USA.

FRANK, J.F. e KOFFI, R.A. (1990). Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfaces. **Applied Environmental Microbiology**. 55: 832–836.

KRYSINSKI, E.P.; BROWN, L.J. e MARCHISELLO, T.J. (1992). Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within product contact surfaces. **J. Food Prot.** 55: 246–251.

KUMAR, C.G. e ANAND, S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**. 42: 9-27.

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.

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.

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.e INGLEDEW, W.M. (2001) Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. **Journal of American Society of Brewing Chemists**. 59:187-194.

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.

**Participação em Congressos, publicações e/ou pedidos de proteção intelectual:**

Não existem dados para apresentação de trabalhos no momento.