

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

*NÚCLEO DE APOIO À PESQUISA EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
(NAPMA)*

MICROBIOLOGIA EM AÇÚCARES DE CANA

PROF. MS. Octavio Antonio Valsechi,

NAPMA - Publicação n°10

**PIRACICABA, SP
Agosto - 2000**

ÍNDICE

	página
1. - INTRODUÇÃO.....	1
2. - MICROORGANISMOS.....	1
2.1. - Crescimento dos microorganismos.....	2
2.2. - Bactérias.....	3
2.2.1. - Fatores de crescimento das bactérias.....	3
2.2.1.1. - Meio.....	3
2.2.1.2. - Umidade.....	4
2.2.1.3. - Temperatura.....	4
2.2.1.4. - pH.....	4
2.2.1.5. - Substâncias inibidoras.....	4
2.2.2. - Bactérias importantes.....	4
2.3. - Fungos.....	4
2.3.1. - Fatores de crescimento dos fungos.....	5
2.3.1.1. - Meio.....	5
2.3.1.2. - Umidade.....	5
2.3.1.3. - Temperatura.....	5
2.3.1.4. - pH.....	6
2.3.1.5. - Substâncias inibidoras.....	6
2.3.2. - Fungos importantes.....	6
2.4. - Leveduras.....	6
2.4.1. - Fatores de crescimento das leveduras.....	7
2.4.1.1. - Meio.....	7
2.4.1.2. - Umidade.....	7
2.4.1.3. - Temperatura.....	7
2.4.1.4. - Ph.....	7
2.4.1.5. - Substâncias Inibidoras.....	7
2.4.2. - Leveduras importantes.....	8
3. - EFEITOS DOS MICROORGANISMOS NA AGROINDÚSTRIA	
AÇUCAREIRA.....	8

3.1. - Lavoura.....	8
3.2. – Indústria.....	9
3.2.1. – Lavagem de cana-de-açúcar.....	9
3.2.2. - Extração.....	10
3.2.3. - Purificação.....	10
3.2.4. – Evaporação, Cozimento e Cristalização.....	12
3.2.5. - Centrifugação.....	13
3.2.6. - Estocagem.....	13
4. - TIPOS DE AÇÚCARES DE CANA.....	10
5. - PROTOCOLO PARA AMOSTRAGEM E PREPARO DAS AMOSTRAS.....	20
5.1. - Amostragem.....	20
5.2. - Preparo da amostra a ser utilizada para as análises...	20
5.3. - Protocolos.....	20
5.3.1. - Protocolo 1. Contagem de mesófilas totais (aeróbias).....	20
5.3.2. - Protocolo 2. Contagem de leveduras e bolores.	20
5.3.3. - Protocolo 3. Contagem de esporos termófilos aeróbios totais e "flat-sour".....	21
5.3.4. - Protocolo 4. Contagem de esporos termófilos anaeróbios não produtores de H ₂ S (<i>Clostridium</i> <i>thermosaccharolyticum</i>).....	22
5.3.5. - Protocolo 5. Contagem de esporos termófilos anaeróbios produtores de H ₂ S (<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>)...	23
5.3.6. - Protocolo 6. Contagem de <i>Bacillus cereus</i>	23
5.3.6.1. - Teste de utilização anaeróbia da glicose (caldo vermelho de fenol 1% glicose).....	24
5.3.6.2. - Teste de decomposição da tirosina (Ágar Tirosina).....	25
5.3.6.3. - Teste de Voges-Proskauer (caldo VP	

5.4.17. - Caldo Nutriente Lisozima 0,001%.....	36
5.4.18. – Ágar Motilidade.....	36
5.4.19. - Caldo Lactosado (concentração normal).....	37
5.4.20. - Caldo Verde Brilhante Bile 2%.....	37
5.4.21. - Caldo E.C.....	38
6. – Bibliografia.....	39

1. - INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar, como material vegetal, está sujeita a ação de microorganismos, atividade esta, que pode ser iniciada no campo, dependendo das condições fitossanitárias da cultura, desenvolvendo-se acentuadamente após o corte, durante o armazenamento e na moagem. Durante o processamento, ocorre um controle dessa atividade.

As principais fontes de microorganismos para a usina são: a própria flora epífita da cana-de-açúcar, o solo carregado com os colmos, a poeira e os equipamentos infeccionados ou mesmo os materiais contaminados utilizados no corte e no processo. A carga microbiana normal pode ser aumentada sensivelmente quando a cana-de-açúcar for atacada por pragas e doenças, um exemplo clássico é o complexo broca-podridão, causando maiores prejuízos para o processamento.

Os efeitos dessa atividade microbiana na fabricação do açúcar são muito bem conhecidos, tanto pela perda de sacarose como também pelos problemas operacionais causados pelos produtos resultantes, sem somar sua interferência no próprio controle da fabricação de açúcar.

Entretanto, os efeitos econômicos da biodeterioração da cana-de-açúcar e de seus produtos intermediários durante a fabricação são difíceis de serem dimensionados, tendo em vista os efeitos diretos e indiretos na recuperação de sacarose.

2. - MICROORGANISMOS

Os microorganismos atuantes na agroindústria açucareira são: bactérias, fungos e leveduras.

Destes, as bactérias são os que maiores problemas causam, tendo em vista a facilidade com que se adaptam às condições existentes em cada fase particular da fabricação do açúcar, e também pelo seu rápido tempo em duplicar suas colônias.

Estes grupos de microorganismos podem ser subdivididos em função de algumas características próprias. Assim, com relação à temperatura de crescimento são classificados em: psicrófilos que atuam em temperaturas menores do que 10⁰C; mesófilos em temperaturas entre 20 a 45⁰C, e termófilos - com atividades a temperaturas maiores do que 45⁰C. Deve-se

ressaltar que estes microorganismos atuam em faixas de temperaturas muito amplas, existindo para cada tipo, temperaturas mínimas, ótimas e máximas de atividade.

Dentre os tipos de microorganismos pode-se ainda identificar os anaeróbios e os aeróbios, sendo que as condições anaeróbias e aeróbias favorecem uns em detrimento de outros.

Alguns microorganismos são osmofílicos, crescendo em meios de alta concentração osmótica, isto é, em altas concentrações de açúcares, causando a deterioração de xaropes, méis e do próprio açúcar.

2.1. - Crescimento dos microorganismos

O crescimento dos microorganismos pode ser representado graficamente pela Figura 1, onde se identificam as seguintes fases: adaptação ou inicial, exponencial, estacionária e de declínio.



Figura 1. – Curva de crescimento de microorganismos.

Na fase de adaptação ou inicial ou lag-fase, não ocorre crescimento, havendo adaptação dos microorganismos ao meio. Na fase exponencial aparece um crescimento muito rápido e praticamente constante do número de microorganismos, mostrando um aumento logarítmico. A fase seguinte, estacionária, é assinalada por um equilíbrio de microorganismos, de modo que o número de células que morrem é o mesmo que nasce. É uma fase de acúmulo de produtos. A última das fases, a de declínio, é caracterizada como uma fase em que o número de microorganismos decresce em uma proporção constante. Evidentemente que entre estas fases, ocorrem

interfases que apresentam características intermediárias de transição.

O crescimento dos microorganismos é regulado por muitos fatores, dentre os mais importantes tem-se os seguintes: meio, umidade, temperatura, pH e substâncias inibidoras. Assim, por exemplo, o caldo de cana-de-açúcar é um meio favorável, contendo cerca de 15% de sacarose, 0,5% de açúcares redutores e adequadas quantidades de nitrogênio e de sais minerais além dos fatores acessórios para o crescimento de microorganismos.

2.2. - Bactérias

As bactérias são organismos unicelulares, destituídos de clorofila e que se reproduzem por fissão binária.

As bactérias variam de 2 a 5 μ , apresentando formas esféricas (cocos), espiraladas (espirilos) e de bastonetes (bacilos).

As características morfológicas mais importantes das bactérias são:

- formação de capsulas: que aumenta a resistência às condições de calor e de preservativos, formando uma capsula de material viscoso (dextrana).
- formação de esporos; que aumentam a resistência às condições de calor, dessecação e de preservativos.
- formação de agregados: formados sob determinadas condições desfavoráveis estes agregados de células são de difícil destruição.

2.2.1. - Fatores de crescimento das bactérias

2.2.1.1. - Meio:

O caldo de cana é um meio favorável ao desenvolvimento, considerando-se a sua composição que apresenta elementos que satisfazem as bactérias. Algumas bactérias podem usar formas de carboidratos simples ou mesmo complexas, ou podem hidrolisar carboidratos mais complexos, além de poder utilizar ácidos orgânicos e de seus sais, álcool e ésteres. As formas de nitrogênio existentes podem satisfazer prontamente, como a amoniacal e a nítrica além de outras mais complexas, como aminoácidos ou mesmo as proteínas, como o fazem as bactérias do ácido láctico. O meio pode conter as vitaminas ou as bactérias

terem condições de sintetizá-las

2.2.1.2. - Umidade:

As bactérias necessitam de maior quantidade de umidade disponível do que os fungos e as leveduras, sendo limitante para o crescimento.

2.2.1.3. - Temperatura:

As bactérias cobrem ampla faixa de temperatura de 0 à 85°C existindo uma temperatura mínima, ótima e máxima de crescimento, sendo que pequenas diferenças de temperatura podem resultar em diferentes crescimentos. Alguns gêneros de bactérias podem se desenvolver em diferentes faixas de temperaturas.

2.2.1.4. - pH

As bactérias geralmente trabalham em pH próximo a neutralidade, porém, muitas espécies se desenvolvem a pH ácido, chegando mesmo a ser tolerantes a acidez elevada.

2.2.1.5. - Substancias inibidoras:

São os preservativos (bactericidas), ou mesmo substâncias produzidas pelas próprias bactérias que limitam o crescimento.

2.2.2. - Bactérias importantes

As bactérias mais importantes para agroindústria açucareira pertencem aos gêneros *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Clostridium* e *Bacillus*.

Os *Streptococcus* como homofermentativos formam além do ácido láctico, o ácido acético e o anidrido carbônico.

Os *Leuconostoc* sendo heterofermentativos formam além da dextrana, os ácidos láctico e acético e o anidrido carbônico.

Os *Lactobacillus* formam ácidos lácticos a partir dos açúcares.

2.3. - Fungos

Poucos fungos são unicelulares, sendo a maioria multicelulares

formando longos filamentos delgados denominados de hifas. Estas, geralmente a ramificam livremente e se entrelaçam, dando origem a uma massa floculenta denominada micélio, com estruturas próprias de cada gênero.

A morfologia dos fungos, portanto, a sua forma e estrutura é julgada pela aparência macroscópica e microscópica.

As unidades mais comuns de propagação de fungos são os esporos (sexuado e assexuadamente), sendo geralmente pequenas células (aéreas) ou mesmo freqüentemente duas ou mais.

Algumas espécies de fungos produzem esclerócios, que se constituem em uma massa compacta de hifas modificadas, dotadas de paredes externas espessas, espalhadas entre os micélios. Estes esclerócios são muito mais resistentes ao calor e às condições adversas do que o resto do micélio, sendo, portanto, capazes de resistir a períodos desfavoráveis, após o que germinam formando um novo crescimento micelial.

2.3.1. - Fatores de crescimento dos fungos

2.3.1.1. - Meio:

De maneira geral, podem utilizar-se de diversos tipos de nutrientes variando dos carboidratos mais simples aos mais complexos, isto porque a maioria possui enzimas hidrolíticas, crescendo assim, em função das suas amilases, proteinases, etc. Os fungos sendo aeróbios necessitam de oxigênio para o seu crescimento, o que depende da transferência da massa de oxigênio no meio.

2.3.1.2. - Umidade:

Os fungos são, menos exigentes em água disponível do que as bactérias e as leveduras.

2.3.1.3. - Temperatura:

Os fungos, em sua maioria, são considerados mesófilos, estando a temperatura ótima ao redor de 25 - 30⁰C e para algumas poucas espécies

de 35 - 37⁰C.

2.3.1.4. - pH:

A faixa de pH em que os fungos podem crescer é muito ampla, indo de 2 a 8,5 contudo a maioria tem o crescimento favorecido em pH ácido.

2.3.1.5. - Substâncias inibidoras:

Alguns compostos químicos são micostáticos, inibindo o crescimento dos fungos, como acetatos e propianatos que são fungicidas. Alguns fungos produzem compostos inibidores de outros microorganismos, como a penicilina.

2.3.2. - Fungos importantes

Alguns gêneros de fungos são importantes como *Neurospora*, *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Aspergillus*.

Os *Neurospora* spp são espécies que se desenvolvem na cana-de-açúcar, palhiço e no bagaço e sendo também muito comum o seu aparecimento em áreas de aplicação de vinhaça.

O *Colletotrichum falcatum went* é a espécie responsável pela "podridão vermelha" que juntamente com a broca da cana (*Diatraea saccharalis*) podem causar prejuízos sensíveis.

Os *Fusarium* spp desempenham atividade paralela, porém inferior a dos *Colletotrichum*, contribuindo para maior perda de sacarose no campo e indiretamente no rendimento industrial.

2.4. - Leveduras

As leveduras são microorganismos de difícil definição, sendo caracterizadas como "fungos verdadeiros", cujo crescimento dominante é na forma unicelular. A reprodução é assexuada por brotamento multilateral e polar ou por fissão, e sexuada por meio de ascoporos. As características morfológicas das leveduras determinadas por microscópio mostram formas de esféricas e ovóide, pêra, cilíndrica e mesmo alongada em pseudomicélio.

O tamanho é variável. Apresenta partes visíveis como a parede

celular, citoplasma, vacúolos, glóbulos de gordura e grânulos, e através de colorações especiais pode-se verificar os núcleos.

2.4.1. - Fatores de crescimento das leveduras

2.4.1.1. - Meio:

Os açúcares são os melhores nutrientes para energia das leveduras, que também podem oxidar ácidos orgânicos e álcool. Como fonte de nitrogênio utilizam desde compostos simples como amônia e uréia até aminoácidos, entretanto necessitam de fatores acessórios de crescimento. As leveduras crescem em meio aeróbio, apresentando os tipos fermentativos, crescimento lento em condições aeróbias.

2.4.1.2. - Umidade:

O melhor crescimento das leveduras dá-se em meio contendo alto teor de umidade disponível, e como muitas espécies de leveduras crescem em concentrações mais elevadas de açúcares do que as bactérias, conclui-se que exigem menos umidade do que as bactérias, porém mais do que os fungos.

2.4.1.3. - Temperatura:

Da mesma forma que os fungos, as leveduras são mesófilos, com um ótimo de crescimento a 25 - 30⁰C e no máximo a 35 - 47⁰C.

2.4.1.4. - pH:

Na faixa de pH de 4,0 - 4,5 o crescimento das leveduras é favorecido, isto é, em reação ácida, e só se desenvolvem em pH alcalino quando são adaptadas.

2.4.1.5. - Substâncias Inibidoras:

Muitos compostos químicos podem dificultar o crescimento das leveduras, porém, muitas espécies podem ser adaptadas a estas substâncias em doses convenientes.

2.4.2. - Leveduras importantes

Os gêneros mais importantes são os *Saccharomyces* e *Cândida*.

Dentre os *Saccharomyces*, os *Saccharomyces cerevisiae* e *uvarum* apresentam especial importância como produtores de álcool, sempre estão presentes no caldo de cana-de-açúcar.

3. - EFEITOS DOS MICROORGANISMOS NA AGROINDÚSTRIA AÇUCAREIRA

Os efeitos da atividade microbiana na fabricação do açúcar podem ser caracterizados como: perdas de sacarose por inversão e oxidação, influência na polarização e conseqüentemente no controle químico, aumento da viscosidade dos produtos intermediários e problemas operacionais causados por entupimento de bombas, tubulações e filtros.

As causas e efeitos dessa atividade são manifestadas em diferentes fases da agroindústria, como: lavoura, industrial e armazenagem do açúcar.

3.1. - Lavoura

Esta etapa envolve a rigor o ciclo da planta e a armazenagem no campo e no depósito da usina.

Durante o ciclo da cultura, a planta está sujeita a variações na condição fitossanitária. O principal efeito é causado pela perda de sacarose conseqüente do ataque do complexo broca-podridão. A perda inicial é causada pela broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*) no colmo, que resulta no consumo do parênquima, dando condições de entrada de fungos, especialmente do *Colletotrichum falcatum* que causa inversão da sacarose, e do *Fusarium spp.*

A atividade desses microorganismos no interior do colmo provoca a formação de gomas e de uma substância avermelhada, esta conseqüente da reação de defesa natural da planta contra os microorganismos.

Logo após o corte, começa ocorrer a biodeterioração da cana-de-açúcar, com o crescimento de microorganismos dentro do colmo, especialmente bactérias do ácido láctico, causando a fermentação e queda do pH do caldo, perda da sacarose e formação de dextrana, esta

provocando problemas nas etapas de fabricação do açúcar.

Durante a estocagem da cana, o número de microorganismos cresce rapidamente. A flora microbiana da cana-de-açúcar é muito diversa, porém com predominância de bactérias.

Dentre os microorganismos que causam esta biodeterioração da cana cortada, o que maiores prejuízos causa é o *Leuconostoc mesenteroides*, e com menor significado o *Leuconostoc dextranicum*; sendo estimada a perda diária de sacarose recuperável da ordem de 4,75%. A atividade destes microorganismos resulta na formação de dextrana com o aumento da viscosidade do caldo, provocando significativos problemas no processamento.

A infecção dos *Leuconostoc spp* ocorre principalmente através das extremidades do colmo cortado onde coloniza em seus tecidos, porém o mecanismo de como isto ocorre não está bem definido. Assim, o uso de colheita mecânica, principalmente nas colheitadeiras que provocam o seccionamento do colmo em toletes curtos, aumenta o grau de infecção da cana e conseqüentemente a velocidade da deterioração.

As condições climáticas controlam a atividade microbiana e conseqüentemente a biodeterioração, podendo aumentar ou reduzir a perda de açúcares e os problemas dos seus efeitos.

Outro fator que tende a diminuir o número de microorganismo é a prática da despalha a fogo. Entretanto, observações feitas mostraram que a queima da cana parece não eliminar os microorganismos, contribuindo para carrear microorganismos no solo aderente à exsudação do colmo conseqüente da prática da despalha a fogo, além de aumentar a susceptibilidade da cana à entrada de microorganismo através das rachaduras da casca provocadas.

3.2. - Indústria

A fase industrial compreende a lavagem de cana, extração e demais operações de processo.

3.2.1. - Lavagem de cana-de-açúcar

Trabalhos realizados envolvendo água de lavagem de cana

mostraram uma correlação entre o nível de contaminação da água de lavagem com o do caldo misto

O número de microorganismo encontrado na água de lavagem é da ordem de 25.000/grama, sendo constituído de uma microflora mista. Os estudos também indicaram que a recirculação da água parece conduzir a eleva, das contaminações com *Bacillus spp* e *Clostridium*.

De onde se pode concluir que a lavagem de cana elimina parte dos microorganismos com terra, mas também pode inocular um numero significativo.

3.2.2. - Extração

A microflora do caldo misto é muito variada, sendo constituída de bactérias, fungos e leveduras, com origem no próprio caldo extraído (flora epífita da cana-de-açúcar), no solo aderente e na própria moenda. O número de microorganismos alcança cerca de 300.000/grama e considerando-se as condições do meio (composição do caldo, pH e temperatura) este número Pode crescer rapidamente, sendo predominantemente constituído de *Leuconostoc mesenteroides*.

Como resultado da atividade desses microorganismos ocorre uma perda de sacarose por inversão e como um efeito secundário da infecção microbiana ocorre à formação de uma secreção viscosa de dextrana e de gomas, com subseqüente efeito prejudicial na fábrica.

Outros efeitos decorrentes da atividade dos microorganismos são o aumento de acidez do caldo e a conseqüente queda do pH, a queda de pontos de pureza, além do aumento da viscosidade dos caldos. .O aumento normal da acidez % Brix é da ordem de 50 a 100%, enquanto que em moendas infeccionadas é de 200 a 400%, provocando uma perda que pode chegar até 1% de sacarose.

A queda natural de pureza que ocorre entre o caldo do esmagador e o caldo misto pode sofrer um adicional de mais de 1,5 pontos.

3.2.3. - Purificação

A despeito do curto intervalo de tempo entre os processos de moagem e clarificação, há um significativo crescimento do numero de

microorganismos nos dois estágios de retenção de impurezas grosseiras do caldo, peneiragem e separador de areia, que antecedem a clarificação, e que causam uma significativa perda de sacarose.

As peneiras de caldo, estáticas ou vibratórias, pela própria constituição e dificuldade de limpeza se constituem em pontos de infecção, que continuamente inoculam uma carga adicional de microorganismo no caldo e no bagacilho que retorna a moagem.

No separador de areia a tendência é aumentar o número de microorganismos, agravada em equipamentos superdimensionados.

Na clarificação, o comportamento dos microorganismos pode ser diferenciado em função do processo. Na defecação simples, a temperatura dos tanques de calcinação é favorável ao desenvolvimento especialmente de *Leuconostoc*. Neste estágio do processo de fabricação do açúcar bruto (Demerara), os caldos provenientes de cana deteriorada contendo um excesso de ácidos, requerem uma adição extra de cal para neutralizar esta acidez.

Na sulfo-defecação, a aplicação do anidrido sulfuroso que, sendo um poderoso anti-séptico, concorre para eliminar grande parte de microorganismos, reduzindo-se o número para cerca de 30.000/grama, o que representa uma carga microbiana muito baixa quando comparada com a do caldo misto. Entretanto, esta pode aumentar não significativamente nos tanques de calcinação.

Na etapa de aquecimento (102 - 105⁰C), o número de microorganismos decresce acentuadamente, estando presente apenas os termófilos através das suas formas de resistência. Por outro lado, o excesso de cal usado na neutralização de caldos deteriorados, especialmente quando o cal é de baixo teor de CaO disponível, pela formação de mais incrustações, pode concorrer para decrescer a eficiência de transmissão de calor.

Na operação subsequente, a decantação, o número de microorganismos não sofre alteração, mas é acentuado o efeito da cana deteriorada, e conseqüentemente do seu caldo. A presença de maior teor de gomas provoca um aumento da viscosidade do caldo, a qual aumenta o tempo de decantação e evita uma remoção satisfatória do material em

suspensão. Desse modo, o caldo clarificado pode ser turvo, resultando também um maior volume de lodo.

Na filtração do lodo, o número de microorganismos cresce de maneira altamente significativa, com perda de sacarose, devido às condições favoráveis do lodo em nutrientes (nitrogênio e fósforo), temperatura, pH e o teor de sacarose e da própria inoculação de microorganismos através do bagacinho. A filtração do lodo é dificultada pela viscosidade, agravada com canas deterioradas, e pela obstrução parcial dos crivos da tela. Um desempenho pouco satisfatório da filtração, muitas vezes pode ser atribuído a ação de microorganismos de alta temperatura (termófilos).

3.2.4. - Evaporação, Cozimento e Cristalização.

Durante as etapas de concentração, evaporação e cozimento, o número de microorganismos presentes é relativamente baixo, em virtude da destruição pelo calor e parte das bactérias termófilas, sofre uma eliminação durante a decantação, quando se concentram no lodo. A população microbiana do xarope e da massa cozida é constituída especialmente de bactérias que apresentam formas de resistência, sendo da ordem de 400 - 500/grama, não ocorrendo assim crescimento.

Os efeitos que se constataem nestas etapas são conseqüentes da atividade dos microorganismos nas fases anteriores, sendo caracterizadas especialmente pelo aumento da viscosidade dos xaropes e massas cozidas ocasionado pela dextrana.

O principal efeito devido a dextrana nos evaporadores resulta em incrustação excessiva, que conduz a uma menor transferência de calor, sendo agravada pela sua combinação com o aumento da viscosidade.

Os prejuízos mais sensíveis decorrentes da biodeterioração são verificados na cristalização da sacarose. A viscosidade provoca decréscimo na faixa de cristalização, que pode chegar até 50%, com alto teor de dextrana. Além da redução da cristalização, pode ocasionar. A formação de cristais anormais.

Os cristais normais de sacarose são monoclinicos e levemente alongados ao longo do eixo b.

A dextrana retarda o crescimento ao longo dos eixos a e b e provoca um alongamento do eixo c ocasionando cristais em forma de agulha. Estes cristais são indesejáveis por dificultar a separação das massas cozidas nas turbinas e por comprometer a qualidade do açúcar refinado obtido do açúcar bruto.

A esgotabilidade dos méis é dificultada nos cristalizadores, devido à redução da cristalização pelo aumento da viscosidade ocasionada pela dextrana, provocando um aumento da pureza do mel final e do volume de melaço/TC.

Durante a cristalização da sacarose, as bactérias termófilas dos méis, são excluídas dos cristais normais, mas os cristais imperfeitos, tais como germinados e conglomerados, contém em sua estrutura mel e, portanto, entre as impurezas, existe significativa quantidade do tipo biológico (microorganismos).

Finalmente, como conseqüência do aumento da viscosidade proveniente da biodeterioração ocorre um aumento do tempo de cozimento que conduz a uma maior perda de sacarose por inversão e consumo de vapor.

3.2.5. - Centrifugação

A separação de cristais e méis das massas cozidas de alta viscosidade é difícil e ineficiente, especialmente em centrifugas intermitentes, devido à ação do conjunto de viscosidade e "cristais agulhas".

3.2.6. - Estocagem

Durante a estocagem do açúcar, o principal fator que pode proporcionar contaminação microbiana é a umidade, uma vez que para ser estocado, o mesmo passa por um tubo secador com corrente de ar quente em sentido contrário ao produto, isto no caso dos açúcares granulados.

Para os açúcares líquidos, especial atenção deve ser dada ao reconstituído com água, pois caso esta não seja de boa qualidade e desprovida de microorganismos, certamente irá contaminar o açúcar ali diluído, o que não ocorre com os açúcares líquidos obtidos pelo processo

de inversão.

4. – TIPOS DE AÇÚCARES DE CANA

Vários são os tipos de açúcares que podem ser obtidos a partir da cana-de-açúcar.

A Tabela 1 apresenta os tipos de açúcares que podem ser obtidos a partir do processamento da cana-de-açúcar de forma artesanal ou industrial.

Tabela 1. – Tipos de açúcares obtidos a partir da cana-de-açúcar.

Artesanais	Mascavo e rapadura
Açúcar orgânico	Produção e processamento por métodos específicos
Açúcar Bruto	Demerara, VHP, Standard.
Cristais	Superior, standard.
Refinados	Granulado, amorfo.
Líquidos	Diluídos ou invertido

Açúcares como o demerara, e o VHP (very high polarization) são denominados também de açúcares crus e são destinados à fabricação de novos açúcares como o cristal e o refinado. Em sua grande maioria são exportados.

No tocante à utilização de açúcares para as mais diversas indústrias alimentícia, tem-se basicamente três tipos de açúcares, sendo eles o cristal, o refinado e o líquido.

Na Tabela 2 a seguir, verifica-se cada tipo de açúcar, suas características físicas e sua utilização na indústria alimentícia.

Tabela 2. – Tipos de açúcar para utilização industrial.

AÇÚCAR PARA UTILIZAÇÃO INDUSTRIAL		
TIPOS	CARACTERÍSTICAS	UTILIZAÇÃO
Refinado Granulado	<ul style="list-style-type: none"> • Ausência de corantes • Pureza elevada • Baixo Teor de Umidade • Ausência de empedramento assegurando fluidez • Cristais bem definidos e granulometria homogênea (fina, média ou grossa). • Brancura excepcional 	<ul style="list-style-type: none"> • Produtos Farmacêuticos • Confeitos onde aparecem os cristais • Xarope de excepcional transparência • Mistura seca onde o aspecto visual, escoamento e solubilidade rápida são importantes.
Refinado Amorfo	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa cor • Dissolução rápida • Granulometria fina • Brancura excelente 	<ul style="list-style-type: none"> • Consumo Doméstico • Misturas sólidas de dissolução instantânea • Bolos e Confeitos • Caldas Transparentes e Incolores
Glaçúcar	<ul style="list-style-type: none"> • Granulometria muito fina (açúcar de confeitiro) 	<ul style="list-style-type: none"> • Preparo de glacês, suspiros, bolos, chantilly.
Cristal	<ul style="list-style-type: none"> • Açúcar em forma cristalina, produzido diretamente em usina, sem refino. 	Destinado ao uso geral da indústria alimentícia: <ul style="list-style-type: none"> • Bebidas • Massas • Biscoitos • Confeitos
Xarope Simples	<ul style="list-style-type: none"> • Solução aquosa de açúcar • Alta transparência • Alta limpidez 	<ul style="list-style-type: none"> • Produtos farmacêuticos • Aplicado onde a ausência de cor é essencial, como bebidas claras, balas e doces
Xarope De Açúcar Invertido	<ul style="list-style-type: none"> • Solução aquosa contendo aproximadamente 1/3 de glicose, 1/3 de frutose e 1/3 de sacarose. • Poder anticristalizante • Poder umectante • Sabor característico • Resistência à contaminação microbiológica 	<ul style="list-style-type: none"> • Frutas em calda • Sorvetes • Balas e caramelos • Licores • Geléias • Biscoitos • Bebidas carbonatadas

Cada tipo destes açúcares possui características próprias como descrito a seguir nas Tabelas 3, 4 e 5.

Tabela 3. – Características do açúcar cristal destinado ao mercado interno.

Especificação de Açúcar – CRISTAL – Mercado Interno		Especial 30	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
Polarização	°S mín.	99,8	99,8	99,8	99,7
Umidade	% máx.	0,04	0,04	0,04	0,04
Cinzas Condutimétricas	% máx.	0,04	0,04	0,05	0,07
Cor ICUMSA ⁽¹⁾	UI máx.	100	100	150	200
Açúcares Redutores	% máx.	-	-	-	-
Sulfito	mg/kg máx.	20	20	20	20
Pontos Pretos	Nº máx.	7/100g	7/100g	10/100g	15/100g
Reflectância	% mín.	68	68	66	64
Resíduo Insolúvel	1-10 máx.	5	5	6	8
Partículas Magnetizáveis	mg/kg máx.	3	3	5	10
Granulometria	AM mm	-	-	-	-
	CV % máx.	-	-	-	-
	% passante mín.	95 #30	-	-	-
Mesófilas Aeróbias	UFC/g máx.	-	-	-	-
Bolores	UFC/g máx.	1000	1000	1000	1000
Leveduras	UFC/g máx.				
Salmonellas	em 25g	ausente	ausente	ausente	ausente
Totais UFC/10g Máx.	por amostra	-	-	-	-
	Méd. 5 amostras	-	-	-	-
"Flat Sour" UFC/10g Máx.	por amostra	-	-	-	-
	Média 5 amostras	-	-	-	-
Produtoras de H ₂ S Máx.	UFC/10g máx. p/amt.	-	-	-	-
	+ em 5 amt. máx.	-	-	-	-
Não Produtoras de H ₂ S Máx.	+ em 6 tubos máx.	-	-	-	-
	+ em 5 amt. máx.	-	-	-	-
Arsênio	ppm máx.	1	1	1	1
Cobre	ppm máx.	2	2	2	2
Chumbo	ppm máx.	2	2	2	2
Ferro	ppm máx.	-	-	-	-

(1) - Método ICUMSA GS 2/3-9

Tabela 4. – Características do açúcar líquido destinado ao mercado interno.

Especificação de Açúcar LÍQUIDO – Mercado Interno					
		Xarope Simples			Xarope Invertido
		Padrão	Tipo A	Tipo B	
Cinzas Condutimétricas	% máx.	0,2	0,2	0,2	0,3
Cor ICUMSA ⁽¹⁾ , 420nm	UI máx.	60	60	60	100
pH (solução a 50° Brix)		6,5 - 7,5	6,5 - 7,5	6,5 - 7,5	4,5 - 5,5
Massa Específica	kg/l - 20° C	1,3	1,3	1,3	1,4
Brix a 20° C	° Brix	65 - 68	65 - 68	65 - 68	-
Açúcares Redutores	% máx.	0,4	0,4	0,4	-
Polarização	°S mín.	99,0	99,0	99,0	-
Sólidos totais	%	-	-	-	72,0 - 77,0
Inversão (sobre Sol. Total)	%	-	-	-	60,0 - 70,0
Dextrana	mg/kg máx.	-	-	200	-
Mesófilas Anaeróbias	UFC/g máx.	-	100	-	-
Bolores	UFC/g máx.	1000	10	1000	1000
Leveduras	UFC/g máx.		10		
Salmonellas	Em 25g	ausente	ausente	ausente	ausente
Totais UFC/10g Máx.	por amostra	-	150	-	-
	Média de 5 amostras	-	125	-	-
"Flat Sour" UFC/10g máx	por amostra	-	75	-	-
	Média de 5 amostras	-	50	-	-
Produtoras de H ₂ S máx.	UFC/10g p/amt. máx	-	5	-	-
	+ em 5 amt. máx.	-	2	-	-
Não Produtoras de H ₂ S máx.	+ em 6 tubos máx.	-	4	-	-
	+ em 5 amt. máx.	-	3	-	-
Arsênio	ppm máx.	1	1	1	1
Cobre	ppm máx.	2	2	2	2
Chumbo	ppm máx.	0,5	0,5	0,5	0,5

(1) - Método ICUMSA GS 2/3-9

Tabela 5. – Características do açúcar refinado destinado ao mercado interno.

Especificação de Açúcar - REFINADO- Mercado Interno												
		GRANULADO								Amorfo	<i>Glaçúcar</i>	
		K Certif.	K	E	B	D	45/K	45/E	45/EX			
Polarização	°S mín.	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,0	99,0
Umidade	% máx.	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,3	0,3
Cinzas Condutimétricas	% máx.	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,2	-
Cor ICUMSA ⁽¹⁾	UI máx.	45	20	20	20	20	45(1)	45(1)	45(1)	50	-	-
Açúcares Redutores	% máx.	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,4	-
Sulfito	mg/kg máx.	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Pontos Pretos	Nº máx.	10/kg	10/kg	10/kg	10/kg	10/kg	20/kg	20/kg	20/kg	20/kg	20/kg	-
Reflectância	% mín.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	85	90
Resíduo Insolúvel	1-10 máx.	3	3	3	3	3	4	4	4	5	5	5
Partículas Magnetizáveis	mg/kg máx.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Granulometria	AM mm	0,35-0,45	0,35-0,45	0,45-0,60	0,6-1,0	1,0-1,4	0,35-0,45	0,45-0,60	0,55-0,70	-	-	-
	CV % máx.	35	35	35	35	35	35	35	35	-	-	-
	% passante mín.	-	-	-	-	-	-	-	-	90 #20	90 #60	90 #60
Mesófilas Aeróbias	UFC/g máx.	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bolores	UFC/g máx.	10	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Leveduras	UFC/g máx.	10										
Salmonellas	em 25g	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Totais UFC/10g máx.	por amostra	150	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Média de 5 amostras	125	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
"Flat Sour" UFC/10g máx.	por amostra	75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Média de 5 amostras	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Produtoras de H ₂ S máx	UFC/10g máx. p/amt.	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+ em 5 amt. máx.	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Não Produtoras de H ₂ S máx.	+ em 6 tubos máx.	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+ em 5 amt. máx.	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arsênio	Ppm máx.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cobre	Ppm máx.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Chumbo	Ppm máx.	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ferro	Ppm máx.	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

(1) - Método ICUMSA GS 2/3-9

A caracterização física e química dos açúcares obedecem à normas estabelecidas por entidade internacional que trata deste assunto especificamente, bem como dos métodos de análises que devem ser utilizados para a obtenção dos resultados que servirão para a equiparação aos padrões

O mesmo, já não ocorre quando se trata de valores referentes à caracterização microbiológica destes açúcares, e uma vez inexistindo padrões, muitas empresas ditam as especificações conforme suas necessidades de produção alimentícia de sua necessidade, como consta na Tabela 6.

Tabela 6. - Padrões nacionais para o controle microbiológico do açúcar

Exigido Por:	Mesófilas	Fungos/Bolores	TERMÓFILAS			Salmonella
			Flat-Sour	H ₂ S (+)	H ₂ S (-)	
Nestlé	1000 UFC/g	100 UFC/g	50 esporos/g	100 esporos/g	100 esporos/g	1 UFC/5g
Lacta	-	100 UFC/g	-	-	-	Ausente/ 25g
RMB	1000 UFC/g	500 UFC/g	-	-	-	Ausente/ 25g
LPC (Danone)	10 UFC/g	10 UFC/g	50 esporos/g	-	-	Ausente/ 25g
Copersucar	-	100 UFC/g	-	-	-	-
ABIA	-	1000 UFC/g	-	-	-	Ausente/ 25g
Q-Refresko	100 UFC/g	100 UFC/g	-	-	-	-
Parmalat	-	1000 UFC/g	-	-	-	Ausente/25 g
Fieischman	-	1000 UFC/g	-	-	-	Ausente
Bols	-	1000 UFC/g	-	-	-	Ausente/ 25g
Vonpar	-	1000 UFC/g	-	-	-	Ausente/ 25g

Coliformes totais e fecais: Ausentes para todos

Fonte FERMENTEC S/C LTDA.

Diante do anteriormente exposto, propõe-se estabelecer um protocolo com o propósito de se padronizar os métodos analíticos referentes às características microbiológicas aos quais os açúcares serão submetidos, facilitando assim comparações entre resultados.

5. - PROTOCOLO PARA AMOSTRAGEM E PREPARO DAS AMOSTRAS

5.1. - Amostragem

Coletar 50 g de açúcar de cada 5 sacos do lote em questão, e acondicionar em frascos esterilizados, sendo que a amostragem deve ser a mais representativa possível do lote.

5.2. - Preparo da amostra a ser utilizada para as análises

Pesar 20 g de açúcar e passar para erlenmeyer esterilizado de 250 ml. Completar com água destilada esterilizada até 100 ml. Agitar até completa dissolução do açúcar.

5.3. - Protocolos

5.3.1. - Protocolo 1 Contagem de mesófilas totais (aeróbias)

Remover 5 ml da amostra preparada e distribuir 1 ml em cada 5 placas de Petri. Adicionar o meio de cultivo Glicose-Triptona Ágar, homogeneizar, esperar solidificar e incubar por 72 horas a 30⁰C. Fazer também 5 placas com diluição 10⁻¹

Fazer a contagem das colônias totais e também das colônias produtoras de ácido (colônias com halo amarelado) e expressar o resultado total de mesófilas/grama de açúcar.

5.3.2. - Protocolo 2. Contagem de leveduras e bolores

Remover 5 ml da amostra preparada e distribuir 1 ml em cada 5 placas de Petri. Adicionar o meio de cultivo Potato Dextrose Ágar (PDA) acidificado com pH 3,5 e homogeneizar, esperar solidificar o meio e incubar por 4 - 5 dias

a 30⁰C.

Contar o número de leveduras e fungos que desenvolveram nas 5 placas e expressar como total de leveduras e bolores/grama de açúcar.

5.3.3. - Protocolo 3. Contagem de esporos de termófilos aeróbios totais e "flat-sour"

Utilizando a amostra preparada (20g açúcar/100 ml água estéril), submeter à um choque térmico (ebulição por 5 minutos em banho-maria), e após, resfriar em água imediatamente. Repor o volume evaporado com água destilada estéril.

Pipetar 2 ml desta amostra que sofreu choque térmico e distribuir em cada 5 placas de Petri. Adicionar o meio de cultivo Glicose-Tryptona Ágar, homogeneizar, esperar solidificar e incubar por 48 horas a 55⁰C. Após, contar as colônias com halo amarelo presentes nas 5 placas e multiplicar o total por 5 para se obter o resultado expresso em número de esporos termófilos de "flat-sour"/10 g de açúcar.

Obs.: As colônias de "Flat-sour" são características. Elas são arredondadas, variando de 2 a 5 mm de diâmetro, e apresentam um "ponto" central típico, opaco e, pela reação da produção de ácido na presença do indicador (púrpura de Bromocresol) é usualmente circundado por um halo amarelo. Este halo pode ser significativo ou não; se certos tipos de ácidos existirem em pequenas quantidades, ou também se na placa houver um crescimento excessivo destas colônias, todo o meio se torna amarelo. O halo também pode desaparecer após a retirada da placa da estufa de incubação; em função disto, as placas devem ser retiradas da estufa no momento exato da contagem.

Quando a produção de ácido for duvidosa após 48 horas, continuar a incubação até 72 h. Se houver um crescimento excessivo de colônias na placa, o tamanho e as características das mesmas podem ser atípicos, e se a contagem se tornar impraticável, uma segunda amostra do açúcar deve ser plaqueada, usando diluições da solução original. Porém, nas análises de rotina do açúcar, essa segunda diluição não é necessária, na maioria dos

casos.

Para a enumeração dos esporos de termófilos aeróbios totais, contar as colônias presentes em todas as placas, multiplicar por 5 e apresentar o resultado como o número de esporos /10 g de amostra.

5.3.4. - Protocolo 4. Contagem de esporos de termófilos anaeróbios não produtores de H₂S (*Clostridium thermosaccharolyticum*)

Utilizando a amostra preparada (20g açúcar/100 ml água estéril), submeter à choque térmico (ebulição por 5 minutos em banho-maria), e após, resfriar em água imediatamente. Repor o volume evaporado com água destilada estéril.

Dividir 20 ml da amostra que sofreu tratamento térmico para 6 tubos (ou seja ±3,3 ml/tubo) contendo Liver Broth exaustados (aquecidos a 55^oC). Colocar 3 ml de Ágar selo (ágar 2%) sobre a superfície do meio de cultura. Solidificar o Ágar rapidamente, mergulhando os tubos em água. Incubar a 55^oC, por 72 h. e proceder a contagem. Nos tubos em que houver crescimento dos termófilos anaeróbios, o Ágar vai ser "empurrado" para cima. Anotar os resultados destes tubos como positivos.

Este é um teste considerado qualitativo, já que não permite expressar os resultados em termos de números de esporos por peso de açúcar.

5.3.5. - Protocolo 5. Contagem de esporos de termófilos anaeróbios produtores de H₂S (*Desulfotomaculum nigrificans*)

Utilizando a amostra preparada (20g açúcar/100 ml água estéril), submeter à choque térmico (ebulição por 5 minutos em banho-maria), e após, resfriar em água imediatamente. Repor o volume evaporado com água destilada estéril.

Dividir 20 ml da amostra que sofreu tratamento térmico para 6 tubos (±3,3 ml/tubo) contendo Ágar Sulfito, aquecidos a 55^oC. Depositar o inóculo abaixo da superfície do meio e agitar delicadamente para misturar, sem introduzir ar. Resfriar rapidamente em banho de gelo e incubar a 55^oC/48h, fazendo uma leitura preliminar com 24 h de incubação, pois algumas cepas

não produzem H₂S mas podem crescer e escurecer completamente o meio.

OBS: No Ágar Sulfito, a deterioração sulfídrica pelas bactérias é detectada através da formação de áreas esféricas negras, escuras. Devido a solubilidade do hidrogênio sulfito e a sua fixação pelo ferro contido no meio, não é observada a formação de gás. As áreas enegrecidas devem ser contadas para se obter resultados quantitativos.

Considerando que, em 6 tubos tem-se 4 g de açúcar, o total de colônias multiplicado por 2,5 nos dá a contagem de bactérias de deterioração sulfídrica/10 g de açúcar.

5.3.6. - Protocolo 6. Contagem de *Bacillus cereus*

Dissolver 20 g de açúcar em 180 ml de água destilada esterilizada. Desta amostra, retirar 1 ml e distribuir por espalhamento em 3 placas de Petri com meio Manitol Yolc Polymyxim (MYP - Ágar), da seguinte maneira:

1^a placa - 0,3 ml

2^a placa - 0,3 ml

3^a placa - 0,4 ml

O espalhamento deve ser feito com o auxílio da Alça de Drigalsk.

Incubar as placas a 30-32^oC/24 horas.

Observar as colônias típicas de *B. cereus* no Ágar Manitol Yolc Polymyxin: são esféricas, com bordas perfeitas, planas, secas e cerosas, rodeadas por um grande halo de precipitação, devido à reação com gema do ovo. Toda a região do meio ao redor das colônias apresenta uma coloração rósea (típica da não fermentação do manitol) que, combinada com o material precipitado na reação com a gema de ovo, adquire uma coloração rósea leitosa. Caso a coloração rósea e/ou o halo de precipitação não sejam evidentes com 24 horas de incubação, recomenda-se reincubar as placas por 24 horas adicionais.

Contar as colônias e expressar o total das colônias contadas nas placas/gramas de açúcar. A somatória total das colônias desenvolvidas multiplicada por 10 expressa o n^o de UFC/gramas de açúcar.

Confirmação das colônias

Selecionar pelo menos 5 colônias típicas bem isoladas, inocular em tubos de Ágar Nutriente NA inclinado e incubar a 30⁰C/24h, para obtenção do inóculo a ser utilizado nos testes de confirmação. Não havendo colônias isoladas, purificar as colônias suspeitas antes da realização dos testes bioquímicos. Para a purificação, inocular uma alçada da cultura, tomada bem no centro da colônia, em placas de MYP, sem estriar. O inóculo deve ser simplesmente depositado em um pouco da superfície do meio, sendo possível transferir até seis colônias para uma mesma placa de MYP, inoculadas em pontos bem separados. Incubar as placas à 30⁰C/24-48h.

O Ágar MYP pode permitir crescimento de *B. anthracis*, patogênico, com colônias indistinguíveis das colônias de *B. cereus*. Por esse motivo, o manuseio dessas culturas deve ser feito com cuidado para prevenir riscos de contaminação do analista e do laboratório.

Utilizar as culturas obtidas em NA ou purificadas em MYP para inocular os meios-testes relacionados abaixo:

5.3.6.1. - Teste de utilização anaeróbia da glicose (caldo vermelho de fenol 1% glicose).

Inocular uma alçada da cultura no meio previamente desaerado (fervura por 15 minutos em banho, com as tampas afrouxadas, seguida de imediato resfriamento em banho de gelo). Cobrir a superfície do caldo com óleo mineral ou vaselina líquida estéril e incubar a 35⁰C/24h. Observar se há ocorrência de viragem ácida do indicador, alterando a cor do meio de vermelho para amarelo (teste positivo) ou se o meio permanece com a cor inalterada (teste negativo). As cepas de *B. cereus* utilizam a glicose anaerobiamente.

5.3.6.2. - Teste de decomposição da tirosina (Ágar Tirosina).

Estriar uma alçada da cultura na rampa dos tubos de Ágar Tirosina inclinado e incubar a 35⁰C por até 10 dias. Observar periodicamente se há desenvolvimento de uma zona clara e transparente de decomposição e dissolução dos cristais de tirosina, na região abaixo da rampa (teste positivo),

ou não formação dessa zona mantendo o meio opaco inalterado (teste negativo). As cepas de *B. cereus* decompõem a tirosina rapidamente, formando uma zona de 3 a 4 mm de profundidade em 48-72h.

Observação: É comum o escurecimento do meio ao longo da região de crescimento, com desenvolvimento de uma coloração castanha.

5.3.6.3. - Teste de Voges-Proskauer (caldo VP modificado).

Inocular uma alçada com inóculo leve da cultura nos tubos de Caldo VP modificado e incubar a 35⁰C/48h. Adicionar, para cada 1 ml de cultura, 0,6 ml de solução de alfa-naftol 5%, 0,2 ml de solução de KOH 40% e uma pitada de cristais de creatina, na ordem indicada. Agitar vigorosamente, deixar descansar e observar periodicamente, por até 1 hora, o desenvolvimento de uma cor vermelha no meio de cultura (teste positivo). A permanência do meio na cor amarelada dos reagentes indica teste negativo. As cepas de *B. cereus* são VP positivas.

5.3.6.4. - Teste de redução do nitrato (Caldo Nitrato).

Inocular uma alçada com inóculo pesado da cultura nos tubos de Caldo Nitrato e incubar a 35⁰C/24h. Após a incubação, adicionar aos tubos de cultura 0,25 ml de cada um dos reagentes para teste de nitrato (Solução A - 0,8% de ácido sulfanílico; Solução B - 0,5% de alfa-naftol). Observar o desenvolvimento de uma cor rósea avermelhada em no máximo dez minutos (teste positivo) e, em caso negativo, adicionar uma pitada de pó de zinco, deixar em repouso por dez minutos e observar se o meio permanece com a cor inalterada (teste positivo) ou adquire uma coloração rósea avermelhada (teste negativo). A maioria das cepas de *B. cereus* reduz o nitrato, sendo poucas as cepas negativas para essa característica.

5.3.6.5. - Teste de hidrólise da gelatina (Ágar Gelatina) (opcional).

Transferir uma alçada de cultura para as placas de Ágar Gelatina, fazendo uma única estria na superfície do meio. Incubar a 30⁰C/24h e, após a incubação, cobrir a superfície com o reagente de Frazier, observando o

desenvolvimento de um halo transparente em redor da estria da cultura (teste positivo) ou a ausência deste halo (teste negativo). As cepas de *B. cereus* hidrolisam a gelatina.

5.3.6.6. - Teste de resistência à lisozima (Caldo Nutriente 0,001% Lisozima).

Inocular uma alçada da cultura em um tubo de Caldo Nutriente suplementado com 0,001% de lisozima, inoculando também um tubo de Caldo Nutriente não suplementado (controle). Inocular à 35^oC/24-48h e observar se ocorre crescimento nos dois tubos (teste positivo) ou apenas no tubo controle (teste negativo).

Considerar como pertencentes ao grupo do *B. cereus* as culturas com as seguintes características: utilização anaeróbia da glicose positiva, decomposição da tirosina positiva, teste de VP positivo, redução do nitrato positiva ou negativa, hidrólise da gelatina positiva (opcional) e resistência à lisozima positiva (opcional).

Para confirmação definitiva dos isolados, é recomendada a inoculação dos seguintes meios de cultura, para realização dos teste adicionais:

5.3.6.6.1. - Coloração de cristais de toxinas intracelulares (Ágar Nutriente inclinado).

Inocular uma alçada da cultura na rampa de um tubo de NA inclinado e incubar a 30^oC/24h. Manter o tubo à temperatura ambiente por três dias, para envelhecer a cultura, permitir a formação de esporos e a lise dos esporângios. Preparar um esfregaço da cultura, fixando levemente pelo calor. Cobrir o esfregaço com metanol por 30 segundos, descartar o excesso de álcool e flambar, para fixação definitiva.

Cuidado: O metanol é tóxico e deve ser manuseado cuidadosamente evitando-se inalação ou contato com a pele.

Cobrir em seguida o esfregaço com uma solução aquosa 0,5% de fucsina básica, aquecer delicadamente à chama, até a emissão de vapores, aguardar 2 minutos e aquecer novamente até nova emissão de vapores.

Aguardar 30 segundos, lavar a lâmina em água corrente, secar e observar ao microscópio sob imersão. As cepas de *B. thuringiensis* apresentam esporos livres e uma grande quantidade de cristais tetragonais corados de vermelho. As cepas de *B. cereus* não produzem cristais.

5.3.6.6.2. - Teste de motilidade (Ágar Motilidade para *B. cereus*).

Inocular os tubos de Ágar Motilidade por picada, no centro do meio e até a profundidade de 1cm do fundo do tubo. Incubar a 30^oC/24 horas e observar se ocorreu migração das células para as regiões fora da linha de inoculação (motilidade positiva) ou se o crescimento restringiu-se à linha da picada (motilidade negativa) Opcionalmente, a característica de motilidade pode ser observada ao microscópio. Adicionar 0,2 ml de água destilada estéril à rampa de um tubo de NA inclinado e estriar uma alçada da cultura na rampa umidificada. Incubar a 30^oC/6-8h e transferir uma alçada da cultura, coletada do líquido na base da rampa para uma gota de água destilada estéril depositada numa lâmina de vidro. Emulsionar o material, cobrir com uma lamínula e observar ao microscópio de contraste de fase. As cepas de *B. cereus* e *B. thuringiensis* geralmente são ativamente móveis, enquanto as cepas de *B. anthracis* e *B. cereus* var. *mycoides* são imóveis.

5.3.6.7. - Cálculo dos resultados.

Calcular o número de UFC/grama ou ml em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e porcentagem de colônias confirmadas.

Exemplo:

Diluição 10⁻¹, plaqueamento em superfície, 6 colônias típicas, 6 submetidas à confirmação, 3 confirmadas (50%).

$$\text{UFC/g ou ml} = 6 \times 10 \times 10 \times 0,5 = 3,0 \times 10^2$$

5.3.7. - Protocolo 7 - Contagem de coliformes totais e fecais.

Preparo da amostra: dissolver 10 g de açúcar em 90 ml água.

Teste presuntivo:

- Colocar em 3 tubos (20 x 200 mm) de ensaio, 10 ml de caldo

lactosado (concentração dupla) em cada tubo, com tubo de Durhan. Autoclavar por 15 minutos/121⁰C. Após autoclavado, adicionar 10 ml da amostra preparada.

- Colocar, em 3 tubos (16 x 150 mm) de ensaio, 10 ml de caldo lactosado (concentração normal) em cada tubo, com tubo de Durhan. Autoclavar por 15 minutos/121⁰C. Após autoclavado, adicionar 1 ml da amostra preparada.

- Colocar em 3 tubos (16 x 150 mm) de ensaio, 10 ml de caldo lactosado (concentração normal) em cada tubo, com Durhan. Autoclavar por 15 minutos/121⁰C. Após autoclavado, adicionar 0,1 ml da amostra preparada.

- Incubar estes tubos à 37⁰C/48h. Fazer a leitura. Se houver produção de gás (formação de gás se dá no interior dos tubos de Durhan), fazer o teste confirmativo.

Teste confirmativo:

- Passar 1 alça (alça de platina) para tubos contendo 5 ml de caldo Verde Brilhante, com tubos à 37⁰C/24h. Se fermentar, fazer o teste para coliformes fecais.

Teste para coliformes fecais (*Escherichia coli*):

- Passar 1 alça (alça de platina) para tubos contendo 5 ml de Meio E.C., com tubos de Durhan.

- Incubar em banho-maria à 45⁰C/24h.

Resultados:

Se ocorrer fermentação (produção de gás) indica a presença de coliformes fecais.

Obs.: Os tubos devem ser retirados da autoclave quando já estiverem frios, para que os tubos de Durhan fiquem completamente cheios.

5.4. - PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA E DE SOLUÇÕES

5.4.1. - Meio Glicose - Tryptona Ágar:

púrpura de bromocresol (4 ml da Solução 1%) - 0,04 g

triptona – 10 g

glicose – 5 g

ágar – 15 g

água destilada - 1000 ml

Acertar o pH 6,7 (\pm 0,2) com NaOH 50% e esterilizar em autoclave por 15 minutos/121⁰C. Solução 1% de púrpura de bromocresol: dissolver 0,1 g em 1,9 ml de NaOH 0,1 N e completar o volume para 10 ml com água destilada.

Equivalentes comerciais:

Dextrose Tryptona Ágar (DIFCO 0080)

Dextrose Tryptona Ágar (BBL 11175)

Dextrose Tryptona Ágar (OXOID CM 75)

Dextrose Casein Peptone Ágar (MERCK 10860).

5.4.2. - Meio Potato -Dextrose Ágar (PDA)

Dissolver 39 g de potato dextrose ágar em 1000 ml de água destilada. Autoclavar por 15 minutos/121⁰C.

No momento do plaqueamento, resfriar o meio de cultivo (evitando-se a solidificação) e acertar o pH 3,5 com ácido tartárico 10%.

Para preservar as características de solidificação do ágar, não aquecer o meio após a adição do ácido tartárico.

Equivalentes comerciais:

PDA (DIFCO 0013)

PDA (MERCK 10130)

PDA (OXOID CM 139)

PDA (BBL 11550)

5.4.3. - Meio Liver Broth (Meio de fígado)

fígado em pó - 35 g

água destilada - 500 ml

triptona - 5 g

K₂HPO₄ - 0,5 g

amido solúvel - 0,5 g

Adicionar 35 g de fígado em 500 ml de água destilada. Aquecer até

50^oC e manter a temperatura por 1 hora, com freqüente agitação. Após isso, ferver este material por 3 a 4 minutos, para coagular as proteínas.

Filtrar em algodão. Adicionar os outros nutrientes, ajustar para pH 7,5 com NaOH e voltar a ferver por 3 minutos. Filtrar novamente. Esterilizar em autoclave por 15 minutos/121^oC.

Equivalentes Comerciais:

Liver Broth (MERCK 5464)

Liver Broth (OXOID CM 77)

5.4.4. - Meio Ágar Sulfito

triptona - 10 g

Na₂SO₃ (anidro) - 1 g

citrato férrico - 0,5 g

ágar - 20 g

água destilada – 1000 ml

É necessário fazer uma solução de citrato férrico + 50 ml de água destilada e aquecer para que se dissolva completamente. Misturar os ingredientes e distribuir 20 ml por tubo. Autoclavar por 15 minutos/121^oC.

Equivalente comercial:

Iron Sulfite Ágar (OXOID CM 79)

5.4.5. - Ágar Manitol gema de ovo Polimixina (MYP)

extrato de carne -1 g

peptona -10 g

d-manitol – 10 g

cloreto de sódio – 10 g

vermelho de fenol (12,5 ml da sol. 0,2%) - 0,025 g

ágar - 15 g

água destilada completar – 900 ml

pH - 7,1

121^oC/20 minutos

Suplemento:

solução 0,1% sulfato de polimixina B - 2 ml /900 ml base
emulsão gema de ovo salina (1:1) - 100 ml /900 ml base

Esterilizar a base a 121⁰C/20 minutos, resfriar a 45-50⁰C, adicionar assepticamente os suplementos previamente preparados e plaquear imediatamente, pois o meio completo não pode ser reaquecido.

Solução 0,2% de vermelho de fenol:

Dissolver 0,1 g em 4 ml de NaOH 0,1N e completar o volume para 50 ml com água destilada.

Solução 0,1% de sulfato de polimixina B:

Dissolver 500.000 unidades do sulfato de polimixina em 50 ml de água destilada, esterilizar por filtração e estocar sob refrigeração.

Emulsão de gema de ovo:

Mergulhar os ovos em etanol 70% por 10 minutos, flambar, abrir assepticamente e transferir as gemas para um frasco estéril tarado. Adicionar às gemas uma quantidade de solução salina 0,85% estéril, suficiente para diluição 1:1. Misturar o conteúdo por agitação ou com o auxílio de baquetas estéreis, até obter uma suspensão homogênea.

Equivalentes comerciais:

Bacillus cereus selective supplement (OXOID SR 99)

Antimicrobial Vial P (Polymyxin B) (DIFCO 3268)

Egg Yolk Emulsion (OXOID SR 47)

Egg Yolk Enrichment 50% (DIFCO 3347)

Egg Yolk Emulsion (MERCK 3784)

5.4.6. - Ágar Nutriente

extrato de carne – 3 g

peptona – 5 g

água destilada 1000 ml

ágar - 15 g

pH - 6,8

121⁰C/15 minutos

Dissolver os ingredientes, ajustar o pH e esterilizar à 121⁰C/15 minutos.

Equivalentes comerciais:

Nutrient Ágar (DIFCO 0001)

Lab-Lemco Ágar (OXOID CM 17)

Nutrient Ágar (MERCK 5450)

Nutrient Ágar (BBL11472)

5.4.7. - Caldo Vermelho de Fenol 1% Glicose.

proteose peptona - 10 g

extrato de carne - 1 g

NaCl - 5 g

vermelho de fenol (9 ml solução 0,2 %) - 0,018g

água destilada - 1000 ml

pH - 7,4

121⁰C/15 minutos

Dissolver os ingredientes da base, acertar o pH em 8,4 e distribuir em tubos de 10 x 10 mm (4 ml/tubo) com tubo de Durham e esterilizar a 121⁰C/15 minutos. Preparar e esterilizar por filtração uma solução aquosa a 10% de glicose e adicionar asepticamente aos tubos de meio base, na quantidade necessária para atingir a concentração final de 1% no meio completo (0,4 ml solução de carboidrato/4 ml de base).

Solução 0,2 % de vermelho de fenol:

Dissolver 0,1 g em 4 ml de NaOH 0,1 N e completar o volume para 50 ml com água destilada.

Equivalentes comerciais (base):

Phenol Red Broth Base (MERCK 10987)

Phenol Red Broth Base (13BL- 11506)

Phenol Red Broth Base (DIFCO 0092)

Phenol Red Peptone Water (OXOID Cm 63)

5.4.8. - Ágar Tirosina

ágar nutrient 100 ml

suspensão aquosa 5% L - tirosina 10 ml

Esterilizar separadamente o Ágar nutriente e a suspensão de tirosina, a 121^oC/15 minutos, juntar assepticamente, distribuir em tubos estéreis de 1 X 100 mm (4,0 ml/tubo) e inclinar.

5.4.9. - Caldo VP modificado

proteose peptona - 7 g

glicose - 5g

NaCl - 5 g

água destilada - 1000 ml

pH - 6,9

121^oC/15 minutos

Dissolver os ingredientes, ajustar o pH, distribuir em tubos de 10 x 10 mm (3-4 ml/tubo) e esterilizar à 121^oC/15 minutos.

5.4.10. - Solução alfa-naftol 5%

alfa-naftol - 5 g

etanol absoluto - completar para 100 ml

Dissolver o alfa-naftol em menos de 100 ml de etanol, transferir para um balão volumétrico e adicionar o etanol restante, completando o volume para 100 ml.

Estocar em geladeira. O reagente não deve ser pipetado com a boca.

5.4.11. - Solução 40 % de KOH

KOH – 40 g

água destilada - completar para 100 ml

Pesar o KOH rapidamente (é altamente higroscópio) e dissolver em menos de 100 ml de água destilada, em um béquer colocado em banho de água fria, para controlar a elevação da temperatura durante a dissolução. Aguardar esfriar e completar o volume para 100 ml com água destilada. Estocar sob refrigeração, em frasco de polietileno ou em frasco de vidro com a boca e a tampa parafinadas.

5.4.12. - Caldo Nitrato

peptona - 5 g

extrato de carne – 3 g

KNO₃ - 1 g

água destilada – 1000 ml

pH - 7,0

121⁰C/15 minutos

Dissolver os ingredientes, ajustar o pH, distribuir em tubos de 10 x 100 mm (3-4 ml/tubo) e esterilizar a 121⁰C/15 minutos.

Equivalente comercial:

Nitrate Broth (DIFCO 0268)

5.4.13. - Solução 0,8% de Ácido Sulfanílico (reagente A)

ácido sulfanílico – 1 g

ácido acético (5 N) 30% - 125 ml

Dissolver o ácido sulfanílico no ácido acético 5 N, aquecendo até completa dissolução. Filtrar em papel de filtro e estocar em frasco escuro, à temperatura ambiente, por até 3 meses.

Acido acético 5 N:

Em uma capela de exaustão adicionar cuidadosamente 286 ml (300g) de ácido acético glacial em menos de 1000 ml de água destilada, dissolver e completar o volume para 1000 ml com água destilada.

5.4.14. - Solução 0,5% de alfa-naftol (reagente B)

alfa-naftol – 1 g

ácido acético (5 N) 30% - completar para 200 ml

Dissolver o alfa-naftol em menos de 200 ml de ácido acético 5 N e completar o volume para 200 ml com ácido acético 5 N. Estocar em frasco escuro.

5.4.15. - Ágar Gelatina

triptona – 5 g

extrato de levedura – 3 g
gelatina – 5 g
ágar – 15 g
água destilada – 1000 ml
pH - 7,4
121⁰C/15minutos

Suspender os ingredientes, na água destilada, ajustar o pH em 7,4 e aquecer até a completa fusão do ágar e esterilizar a 121⁰C/15 minutos. Plaquear imediatamente, o meio não deve ser aquecido.

5.4.16. - Reagente de Frazier

cloreto de mercúrio – 15 g
ácido clorídrico concentrado - 20 ml
água destilada completar para - 100 ml
pH - 7,4
121⁰C/15 minutos

Dissolver os ingredientes, ajustar o PH, aquecer até a completa fusão do ágar, distribuir em tubos de 10 x 100 mm (5 ml/tubo) e esterilizar à 121⁰C/15 minutos. Não inclinar, o meio deve solidificar na posição vertical. Recomenda-se estocar por 2 - 3 dias à temperatura ambiente antes de usar, pois esse cuidado melhora o desempenho do teste.

5.4.17. - Caldo Nutriente Lisozima 0,001%

Preparar o caldo nutriente (Ágar Nutriente sem o ágar) e esterilizar a 121⁰C/15 minutos. Resfriar e adicionar asepticamente, para cada 99 ml de caldo, 1 ml de solução de lisozima 0,1%, distribuindo em tubos estéreis.

Solução 0,1% de lisozima:

Dissolver 0,1g de lisozima em 65 ml de HCl 0,01N, ferver por 20 minutos e completar asepticamente o volume para 100 ml, com HCl 0,01N estéril. Alternativamente, preparar uma solução aquosa 0,1% de cloreto de lisozima e esterilizar por filtração.

Equivalentes comerciais:

Nutrient Broth (DIFCO 003)

Lab-Lemco Broth (OXOID CM 15)

Nutrient Broth (MERCK 5440)

5.4.18. - Ágar Motilidade

tripticase – 10 g

extrato de levedura - 2,5 g

glicose – 5 g

fosfato dissódico (Na_2HPO_4) - 2,5 g

ágar - 3 g

água destilada - 1000 ml

pH - 7,4

121⁰C/15 minutos

Dissolver os ingredientes, ajustar o pH, aquecer até a completa fusão do ágar, distribuir em tubos de 10 X 100 mm (5 ml/tubo) e esterilizar a 121⁰C/15 minutos. Não inclinar, o meio deve solidificar na posição vertical. Recomenda-se estocar por 2-3 dias à temperatura ambiente antes de usar, pois esse cuidado melhora o desempenho do teste.

5.4.19. - Caldo Lactosado (concentração normal)

lactose – 5 g

extrato de carne – 3 g

peptona – 5 g

água destilada - 1000 ml

pH - 6,9

121⁰C/15 minutos

Dissolver os ingredientes, acertar o pH, distribuir em tubos com tubo de Durhan e esterilizar a 121⁰C/15 minutos.

Equivalentes comerciais:

Lactose Broth (CO 0004)

Lactose Broth (MERCK 7661)

Lactose Broth (BBL 11333)

Lactose Broth (OXOID CM 137)

5.4.20. - Caldo Verde Brilhante Bile 2%

bile de boi ("oxgall") - 20 g

peptona – 10 g

lactose - 10 g

verde brilhante (13,3 ml sol. aquosa 0,1%) - 0,0133 g

água destilada – 1000 ml

pH - 7,2

121⁰C/15 minutos

Dissolver os ingredientes, acertar o pH, distribuir em tubos com tubo de Durhan (aproximadamente 6 ml/tubo) e esterilizar a 121⁰C/15 minutos.

Equivalentes comerciais:

Brilhante Green Bile Broth (DIFCO 0007)

Brilhante Green Bile Broth (BBL 11080)

Brilhante Green Bile Broth (OXOID CM 31)

Brilhante Green Bile Broth (MERCK 5454)

5.4.21. - Caldo E.C.

triptose - 20 g

Lactose - 5 g

sais biliares n^o3 - 1,5 g

fosfato dipotássico (H₂PO₄) - 4 g

fosfato monopotássico (KH₂PO₄) - 1,5 g

cloreto de sódio - 5 g

água destilada - 5 g

pH - 6,9

121⁰C/15 minutos

Dissolver os ingredientes, acertar o pH, distribuir em tubos com tubo de Durhan (aproximadamente 6 ml/tubo) e esterilizar a 121⁰C/15 minutos.

Equivalentes comerciais:

EC Médium (DIFCO 0314)

EC Broth(BBL 11187)

EC Broth (MERCK 10765)

6. - BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AMORIM, H.V. - Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar. Piracicaba: Fermentec/Fealq/ESALQ-USP, 1996.89 p.

BREED, R.S.; MURRAY, E.G.D.; SMITH, N.R. - **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 7.ed. Baltimore: The Willians & Wilkins, 1957. p.541-554.

BRYAN-JONES, O. - **Lactic acid bacteria in distillery fermentations**. In: CARR, J.G.; CUTTING, C.V.; WHITING, G.C. Lactic acid bacteria in beverages and foods. London: Academic Press, 1973. cap.5, p.165-175.

BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; ADAMS D.M.; JOHNSON M.G. - **Colony count methods**. In: SPECK, M.L. **Compendium of methods for the microbiological examinafion of foods**. 2.ed. Washington: American Public Health Association, 1984. cap.4, p.62-83

COLLINS, C.H.; LYNE, P.M. - **MICROBIOLOGICAL METHODS**. Butterworth & Co. Ltd, London 1970. 454p.

COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA, ACÚCAR E ALCOOL DO ESTADO DE SAO PAULO. Centro de Tecnologia. Divisão Industrial. - **Açúcar**. São Paulo: Copersucar, 1987.434 p.

GALLO, C.R - Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de domas de fermentação alcoólica. Campinas. 1989, 388p. (Doutorado-Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP).

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz:**

LIMA U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI W. **Tecnologia de Fermentações**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. v. 1, 286 p. (Biotecnologia, 2).

- MERCK. - **Reativos, diagnóstico, produtos químicos**. Frankfurter: Ed. Merck. 1992/93. 1584p.
- NEISH, A.C. - Determination of reducing sugars. In: NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA. **Analytical methods for bacterial fermentations**. 2.ed. Saskatoon, 1952. p.34.
- OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A; AMORIM, H.V. - **Métodos para o controle microbiológico na produção de açúcar e álcool**. Piracicaba: FERMENTEC/ FEALQ/ESALQ, 1996.89 p.
- ROSALES, S.Y.R. - Contaminantes bacterianos da fermentação etanólica: isolamento em meios diferenciais, identificação e avaliação de desinfetantes. Rio Claro, 1989. 200p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Júlio de Mesquita Filho.
- SERRA, G.E.; CEREDA, M.P.; FERES, R.J.F.; BERTOZO, M.T.; VICENTE, A.L. - Contaminação da fermentação alcoólica "floculação do fermento". **Brasil Açucareiro**, v.93, n.6, p. 26-31, jun. 1979.
- SHARPE, A.N.; KILSBY, D.C. - A rapid inexpensive bacterial count technique using agar droplets. **Journal of Applied Bacteriology**, v.34, n.2, p. 435-441, 1971.
- SILVA, N., JUNQUEIRA, V.C.A., SILVEIRA, N.F.A. - Manual de métodos e análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 1997.295p.
- THATCHER, F.S.; CLARK, D.S. - Microorganisms in foods: their significance and methods of enumerations. 1st ed . Toronto: University Toronto Press, 1968.321 p. **volume 1- Métodos químicos e físicos para a análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo, 1985. 533 p.