



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ANÁLISE GLOBAL DA DIVERSIDADE DE MICROORGANISMO IMPORTANTES
PARA A FERMENTAÇÃO NAS USINAS DE ÁLCOOL: UMA ABORDAGEM
UTILIZANDO METAGENÔMICA**

Larissa Barbosa de Lima

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU - SP

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**ANÁLISE GLOBAL DA DIVERSIDADE DE MICROORGANISMO IMPORTANTES
PARA A FERMENTAÇÃO NAS USINAS DE ÁLCOOL: UMA ABORDAGEM
UTILIZANDO METAGENÔMICA**

Larissa Barbosa de Lima

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Débora Colombi

Supervisora: Prof^a. Dr^a. Maria José Queiroz de Freitas Alves

Monografia apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biomédicas.

BOTUCATU - SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Lima, Larissa Barbosa de.

Análise global da diversidade de microorganismos importantes para a fermentação nas usinas de álcool : uma abordagem metagenômica / Larissa Barbosa de Lima. - Botucatu, 2013

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Débora Colombi

Capes: 20202008

1. Alcool - Combustível - Indústria. 2. Alcool como combustível. 3. Lactobacilo. 4. Metagenômica. 5. Fermentação.

Palavras-chave: Alcool; Bactérias; Contaminação bacteriana; Fermentação alcoólica; Metagenômica.

Aos meus pais, José Ricardo e Luciane, por se constituírem ímpares enquanto pessoas, admiráveis em essência, estímulos que me impulsionaram a buscar vida nova a cada dia. Meus eternos agradecimentos por todo amor que me foi dado e por acreditarem em meu potencial, concedendo a mim a oportunidade de inúmeras realizações.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida.

A minha mãe Luciane, que com sua doçura me ensinou a não temer a vida.

Ao meu pai José Ricardo, por ser meu exemplo de força e fé, meu eterno porto-seguro.

Ao meu querido Fabio, pelo carinho e companheirismo de sempre.

Ao meu falecido avô, José Lúcio, por sua contagiante alegria de viver. Seus olhos azuis, hoje colorem o meu céu!

A toda minha família, pelo imenso amor, apoio e aconchego, principalmente quando a saudade de casa se fazia grande.

A família Oyan Sotto, que com afeição me recebeu como uma filha.

A Profa. Dra. Débora Colombi pela dedicação profissional aplicada na idealização e desenvolvimento deste trabalho.

Ao corpo docente do Instituto de Biociências de Botucatu - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” que muito contribuiu para minha formação e aprendizado.

Aos proprietários da empresa Genotyping Biotecnologia Ltda., pela oportunidade de como estagiária vivenciar diversas tecnologias e por permitir o acesso aos dados e equipamentos necessários para a composição deste trabalho.

Aos meus colegas da Genotyping Biotecnologia: Caio Daíse, Meline, Pedro, Tânia e Teresa, que me receberam como nova colaboradora e prestaram grande auxílio para meu desenvolvimento profissional durante o período do estágio.

Aos colegas do Laboratório Pangene, docentes e funcionários do Departamento de Parasitologia, pelos ensinamentos e boa convivência.

A toda “Biomed XLVI”, em especial minhas amigas Bárbara, Camila, Marina e Thais, por se tornarem minha família em Botucatu, irmãs de coração, deixando a jornada mais leve e divertida.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro e institucional.

Agradeço ainda a todos aqueles de alguma forma ajudaram a semear, cultivar e colher os frutos desses quatro anos de curso.

“As grandes ideias surgem da observação dos pequenos detalhes”.

(Augusto Cury)

RESUMO

O Brasil é segundo maior produtor mundial de etanol e para manter seu rendimento há uma grande preocupação por parte das usinas quanto à contaminação bacteriana.

Bactérias presentes na matéria-prima que alimenta a produção de etanol são frequentes contaminantes, por conta das condições não estéreis do processo. Para combatê-las as usinas utilizam antimicrobianos aleatoriamente, prática esta que encarece o preço do álcool além de gerar bactérias resistentes e deixar resíduos no ambiente.

Deste modo, a identificação dos contaminantes em ambientes industriais distintos, se faz necessária, bem como a busca de novas tecnologias para o controle de contaminantes da fermentação alcoólica.

Aqui, nós mostramos que a técnica molecular de metagenômica utilizando a região 16S, aplicada a amostras do conteúdo de dornas da safra de 2013, corrobora estudos anteriores e se mostra rápida e eficiente para a identificação de micro-organismos contaminantes.

Nossos resultados obtidos através de sequenciamento de segunda geração em plataforma de alto rendimento confirmam a predominância de *Lactobacillus* spp na fermentação, além da presença de outros contaminantes não descritos anteriormente como: *Rubrobacter xylanophilus*, *Cloacibacterium normanense* e *Diaphorobacter nitroreducens*, o que permite a elaboração de um tratamento personalizado.

Palavras-chave: fermentação alcoólica; contaminação bacteriana; metagenômica.

ABSTRACT

Brazil is the second world's largest producer of ethanol and, to keep this production, there is a huge concern by this industry regarding bacterial contamination.

Due to the non-sterile process conditions, bacteria present in the raw material that fuels the production of ethanol are common contaminants. To combat them, factories use randomly antimicrobial, a practice that increases the price of alcohol in addition to generating resistant bacteria and leave waste on the environment.

This said, the identification of contaminants in different industrial environments is necessary, as well as the search for new technologies for the control of contaminants from alcoholic fermentation.

In this project, it will be shown that the molecular technique of using metagenomic 16S, applied to samples of content of the tanks of the 2013 harvest, corroborates earlier studies and shows it as a rapid and efficient method for identifying contaminating microorganisms.

Our results obtained using next generation sequencing in high-throughput platform confirm the predominance of *Lactobacillus* spp in fermentation, and the presence of other contaminants not previously described as *Rubrobacter xylanophilus*, *Cloacibacterium normanense* and *Diaphorobacter nitroreducens*, which enables the development of personalized treatment.

Key-words: alcoholic fermentation, bacterial contamination; metagenomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição das áreas de plantações e usinas produtoras de etanol, açúcar e bioeletricidade.	14
Figura 2 – Representação das amostras da Usina A	19
Figura 3 – Curva-padrão para elaboração de biblioteca em nM.	22
Figura 1 – Representação do cartucho de reagentes e <i>flowcell</i> (lâmina de fluxo) presentes Miseq Reagent NanoKit Illumina®	23
Gráfico 1 – Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em dornas das Usinas A, B e C durante os meses de maio a agosto de 2013.	26
Gráfico 2 – Distribuição geral das bactérias mais prevalentes de cada mês em dornas da Usina A, durante os meses de maio a agosto de 2013.	27
Gráfico 3 – Distribuição das características quanto à coloração de Gram das bactérias mais prevalentes em dornas da Usina A.	28
Gráfico 4 – Distribuição das características fermentativas (metabolismo do açúcar) das bactérias mais prevalentes em dornas da Usina A.	29
Gráfico 5 – Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em cada mês em dornas da Usina B, durante os meses de maio, junho e agosto de 2013.	30
Gráfico 6 – Distribuição das características quanto à coloração de Gram das bactérias mais prevalentes em dornas da Usina B.	31
Gráfico 7 – Distribuição das características fermentativas (metabolismo do açúcar) das bactérias mais prevalentes em dornas da Usina B.	32
Gráfico 8 – Distribuição geral das bactérias mais prevalentes de cada mês em dornas da Usina C, durante os meses de maio a agosto de 2013	33
Gráfico 9 – Distribuição das características quanto à coloração de Gram das bactérias mais prevalentes em dornas da Usina C.	34
Gráfico 10 – Distribuição das características fermentativas (metabolismo do açúcar) das bactérias mais prevalentes em dornas da Usina C.	35
Gráfico 11 – Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em acompanhamento dorna a dorna da Usina B, durante os meses de maio, junho e agosto de 2013.	37
Gráfico 12 – Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em acompanhamento dorna a dorna da Usina B, durante o mês de maio de 2013.	39

Gráfico 13 – Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em acompanhamento	40
dorna a dorna da Usina B, durante o mês de junho de 2013.	
Gráfico 14 – Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em acompanhamento	41
dorna a dorna da Usina B, durante o mês de agosto de 2013.	
Gráfico 15 – Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em rastreamento	42
realizado na Usina A durante o mês de julho de 2013.	
Gráfico 16 – Distribuição das características quanto à coloração de Gram das bactérias	43
mais prevalentes em rastreamento realizado na Usina A durante o mês de julho de 2013.	
Gráfico 17 – Distribuição das características fermentativas (metabolismo do açúcar) das	44
bactérias mais prevalentes em rastreamento realizado na Usina A durante o mês de julho	
de 2013	

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus centígrados

μL – microlitro

μM – micromolar

ddNTP - didesoxinucleotídeo

DNA – ácido desoxirribonucleico

LED – diodo emissor de luz

mL - mililitro

MRS – Man, Rogosa e Sharpe

N - normal

NGS – Next Generation Sequencing

nM - nanomolar

pb – pares de bases

PCA – Plate Count Agar

PCR – reação em cadeia da polimerase

PROÁLCOOL – Programa Nacional do Álcool

rDNA – DNA ribossomal

rpm – rotações por minuto

THM – trihalomentanos

UFC – unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. GERAL.....	18
2.2. ESPECIFICOS.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. SUJEITO DO ESTUDO.....	19
3.2. METAGENÔMICA.....	20
3.2.1. Extração/Acesso ao DNA.....	20
3.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	20
3.2.3. Purificação.....	21
3.2.4. Quantificação Kapa – StepOne Real Time.....	21
3.2.5. Denaturação do DNA.....	22
3.2.6. Preparação para sequenciamento.....	22
3.3. BIOINFORMÁTICA.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5. CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXO.....	52

1. INTRODUÇÃO

Uma das mais remotas atividades agrárias, a cultura de cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil pelos portugueses no período colonial e no decorrer dos anos proporcionou amplos ganhos ao país. O clima, solo e topografia favoráveis, levaram ao alto rendimento na produtividade desta cultura, podendo ser colhida cinco ou seis vezes antes do replantio. Além disso, estudos demonstram que sua produtividade por hectare para o etanol é maior em relação a outras matérias-primas renováveis, como o milho, por exemplo (Instituto CNA, 2013).

Tais fatores, aliados a investimentos no setor, proporcionaram ao Brasil vantagens competitivas no mercado e permitiram que o país alcançasse o patamar de segundo produtor mundial de etanol, visto como responsável por 20% da produção mundial e por 20% das exportações mundiais (UNICA, 2013).

O principal incentivo para o desenvolvimento da indústria sucroalcooleira no Brasil foi a criação, em 1975, por decreto presidencial, do Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL), visando diminuir a dependência do petróleo por meio de fontes alternativas de energia. A partir da década de 70 foi possível então observar o êxito do programa, uma vez que a produção brasileira de etanol cresceu de 555 milhões de litros em 1975-76 para além de 20 bilhões na safra 2011-12 (UNICA, 2013). As regiões contribuidoras para estes números se concentram nas regiões Centro-Sul e Nordeste do Brasil, conforme as áreas destacadas em vermelho no mapa abaixo (Figura 1) (dados oficiais IBGE, UNICAMP e CTC).

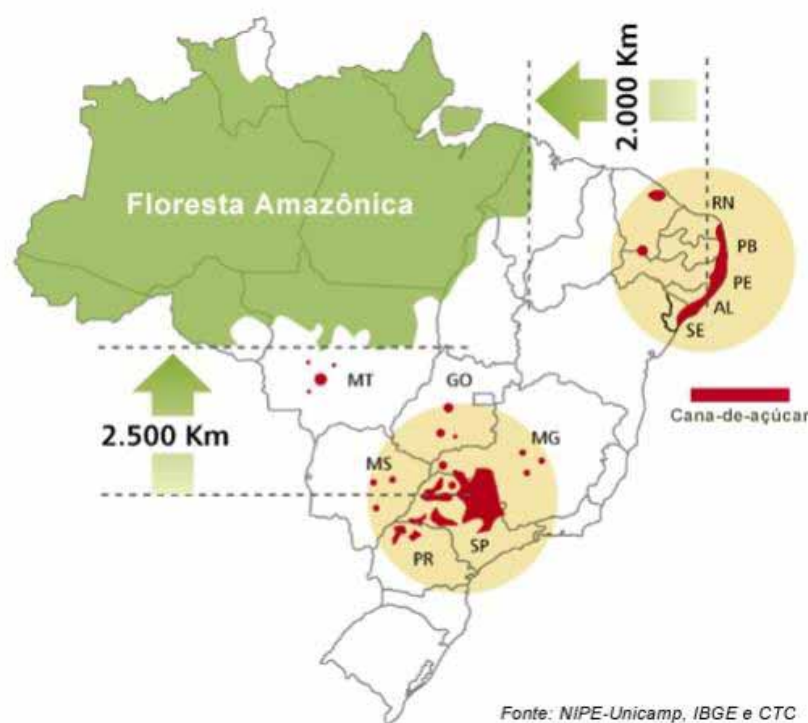


Figura 1 – Distribuição das áreas de plantações e usinas produtoras de etanol, açúcar e bioeletricidade.

Mapa das áreas de concentração de plantações e usinas produtoras de etanol, açúcar e bioeletricidade no país, segundo dados oficiais do IBGE, UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas - SP) e do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira).

A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar advém da fermentação alcoólica, a qual tem o metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* como principal responsável pela transformação de açúcares em etanol e gás carbônico (AMORIM, 2005). Segundo Amorim *et al.* citado por Moraes (2013), os processos fermentativos predominantes nas destilarias brasileiras, são sistema de batelada alimentada (Melle Boinot), com 85%, que se baseia na adição de nutrientes ao reator durante o cultivo, permanecendo o produto no meio até o final da fermentação; e o sistema de fermentação contínua, com 15%, o qual consiste na retirada contínua do produto a uma vazão igual à da alimentação, mantendo o volume de reação constante no interior do reator (MORAIS, 2013).

Com a evolução do PROÁLCOOL e para a manutenção dos resultados positivos, houve maior preocupação com os contaminantes da fermentação alcoólica e consequentes perdas no processo, visto que o mesmo não apresenta condições estéreis. A maioria dos micro-organismos encontrados é oriunda do campo, adentrando nos colmos da cana-de-açúcar durante os procedimentos de corte, carregamento e transporte, e acaba sendo levada para o ambiente industrial (ANGELIS, 2010).

A microbiota ali presente caminha desde o caldo bruto obtido através da moagem, e entra diretamente em contato com moendas, filtros, bombas e tubulações; podendo haver a remoção parcial dos contaminantes durante a lavagem da cana, se a qualidade de água e demais cuidados operacionais forem adequados. Ainda assim, o número total de bactérias presentes no caldo bruto de cana-de-açúcar pode ser aumentado sensivelmente tanto por períodos prolongados entre o corte e a moagem da planta, como pela falta de assepsia nas diversas etapas componentes do processo (MUTTON, 2008).

De acordo com estudos de Cherubin (2003), contaminações bacterianas acima de 10^7 UFC/mL geram prejuízos econômicos significativos e acima de 10^8 UFC/mL podem provocar quedas nos rendimentos fermentativos e industriais. Os principais problemas decorrentes desse descontrole são: consumo de açúcar e outros nutrientes do mosto por competição com a levedura, consumo do álcool produzido, uso excessivo de produtos de combate à infecção como ácidos e antibióticos que podem prejudicar o processo e queda da viabilidade das leveduras devido à produção de toxinas e ácidos orgânicos (MARQUES, 2011).

Como dito acima, as bactérias podem metabolizar o açúcar e de acordo com os substratos gerados, é possível classificá-las em heterofermentativas e homofermentativas. As bactérias homofermentativas têm como principal substância produzida o ácido láctico (70 a 90%), enquanto que bactérias heterofermentativas produzem em conjunto com ácido láctico (50%) outros compostos como etanol, gás carbônico e ácido acético (MASSAGUER, [s.d.]).

As etapas do processo de produção possuem condições de temperatura, pH, e concentração de açúcar as quais favorecem o desenvolvimento de micro-organismos contaminantes e, dentre estes prevalecem as bactérias gram-positivas, as quais possuem uma espessa camada de peptidoglicanos compondo sua parede celular e se coram em violeta quando submetidas à coloração de Gram; sendo os gêneros mais frequentes *Lactobacillus*, *Bacillus* e *Leuconostoc* (FERNANDES JR, 2011; NAVES *et al.*, 2010). Contudo, estudos também revelaram a presença de bactérias gram-negativas, em especial dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Acetobacter*, os quais possuem parede celular composta por uma camada de peptidoglicanos mais fina, envolta por uma segunda membrana lipoproteica e que se cora em vermelho quando aplicada coloração de Gram (FERNANDES JR, 2011; NAVES *et al.*, 2010).

Normalmente, para controlar a contaminação e reduzir os danos causados pelas bactérias, as usinas fazem uso de diversos agentes antimicrobianos como ácido sulfúrico,

compostos fenólicos, compostos clorados, quaternário de amônio, aldeídos, biocidas, além de antibióticos como: tetraciclina, clindamicina, monensina sódica cristalina, penicilina e virginiamicina (EGUCHI, 2007; SILVA, 2010). O uso de antibióticos é bastante comum no processo de desinfecção, porém o controle eficiente só é obtido com o seu uso em dosagens adequadas, pois visam atingir apenas a população bacteriana e não de leveduras. Foi também observado que o uso indiscriminado desses agentes pode levar a prejuízos, pois além de custoso, podem desenvolver bactérias resistentes e impossibilitar a venda de levedura seca para ração animal (SILVA, 2010).

Um dos tratamentos que as usinas sucroalcooleiras vêm utilizando como alternativa é o dióxido de cloro que se apresenta como um desinfetante mais forte, mais estável e que seria capaz de eliminar biofilmes nos sistemas de tubulação. Contudo, ainda não está comprovada sua eficiência na redução da formação de trihalometanos (THM), que são substâncias potencialmente cancerígenas. O dióxido de cloro pode interagir com algumas estruturas organizacionais que produzem ácido hipocloroso e este último pode formar THM. Além disso, a aplicação deste químico requer investimentos elevados e pode deixar resíduos ao longo do sistema distribuidor, dos quais se desconhece a toxicidade e a possibilidade de formação de subprodutos (MACEDO, [s.d.]).

Dessa forma, para se que haja um controle rigoroso da contaminação bacteriana é de extrema importância utilizar um tratamento adequado, não agressivo e menos custoso através de um tratamento personalizado. A avaliação dos tipos bacterianos presentes nas instalações industriais, bem como o cálculo estimado de sua frequência são parâmetros importantes para este controle (ANTONINI, 2004).

Para a identificação de tais bactérias, são propostas técnicas de microscopia para avaliação de características morfológicas e para análise de características bioquímicas são utilizadas técnicas de plaqueamento e isolamento em meios diferenciais. Os meios de cultura mais recomendados são PCA (Plate Count Agar) no qual cresce um largo espectro de bactérias e MRS (Man, Rogosa e Sharpe), ideal para bactérias lácticas (ANTONINI, 2004). Embora a identificação por plaqueamento seja bem difundida, trata-se de um método mais demorado e que pode apresentar problemas na exatidão de resultados, pois no plaqueamento corre-se o risco de negligenciar ou superestimar a presença de algum micro-organismo.

Pensando nisso, métodos moleculares estão gradativamente sendo utilizados na identificação de micro-organismos. A metagenômica, por exemplo, é um método molecular que vem revolucionando a microbiologia, pois independe do isolamento e cultivo dos micro-

organismos para o estudo do perfil de comunidades microbianas. Usado pela primeira vez por Jo Handelsman (1998) o termo metagenômica compreende a análise do genoma coletivo da microbiota total encontrada em um determinado habitat, proporcionando informações sobre a capacidade metabólica e funcional da comunidade microbiana (JURKOWSKI & HANDELSMAN, 2007).

Segundo Garcia (2007), na técnica de metagenômica é avaliado todo o ambiente, extraído o DNA de todos os micro-organismos ali presentes, bem como seu posterior sequenciamento. A aplicação de abordagens baseadas em sequências envolve a criação de sondas ou oligonucleotídeos (*primers*) derivados de regiões conservadas de genes já conhecidos, como por exemplo, a região 16S rDNA (STACKEBRANDT, 2002). O uso de sequenciamento de segunda geração (NGS, *Next Generation Sequence*), realizado em plataformas de sequenciamento de alto rendimento, resulta em um robusto conjunto de dados que nos encaminha para a enorme diversidade taxonômica e funcional das comunidades microbianas (SIMON & DANIEL, 2011).

A técnica de metagenômica pode ser aplicada a diversos segmentos de pesquisa, como: bioenergia, metabolismo animal, biorremediação, saúde humana e agricultura (JURKOWSKI & HANDELSMAN, 2007). Exemplos encontrados na literatura que validam a aplicação da técnica voltada para a fermentação alcoólica são os trabalhos de Escalante *et al.* (2004) para identificação de bactérias contaminantes do pulque, tradicional bebida mexicana, e também de Carvalho-Netto (2008), na indústria de aguardente no Brasil.

Tendo em vista a grande importância do etanol para a economia e desenvolvimento do Brasil e sabendo da influência de micro-organismos (bactérias) na produção desta importante fonte de energia, torna-se necessário o estudo e entendimento de quais bactérias e em que proporção elas se encontram no sistema fermentativo das usinas sucroalcooleiras. Desta forma, espera-se obter um controle mais eficiente da contaminação projetando tratamentos personalizados e menos prejudiciais ao processo. Para tanto, se faz necessário à utilização de equipamentos de última geração capaz de realizar a detecção rápida e eficiente da microbiota presente.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Determinar as bactérias presentes nos ambientes industriais de diferentes usinas sucroalcooleiras utilizando a técnica de metagenômica.

2.2. ESPECÍFICOS

- a) Realizar metagenômica em plataforma de sequenciamento de alto rendimento de amostras coletadas em diferentes usinas sucroalcooleiras;
- b) Determinar a prevalência e as características do metabolismo do açúcar e coloração de Gram das principais bactérias presentes nas usinas sucroalcooleiras.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. SUJEITO DO ESTUDO

Neste trabalho foram estudadas amostras do conteúdo de dornas (vinho), obtidas em parceria com a empresa Genotyping – Laboratório de Biotecnologia Ltda., através de coletas mensais durante a safra de 2013, nas usinas A, B e C, localizadas na região centro-sul do país.

Totalizando 38 amostras, foram coletadas nos meses de maio a agosto 16 amostras da Usina A e 4 amostras da Usina C, enquanto que na Usina B foram coletadas 18 amostras; porém nesta última não foi possível a realização de coleta durante o mês de julho. Também na usina A, foram coletadas outras cinco amostras de pontos distintos para rastreamento, sendo classificadas como mosto, mel pobre, mel final, melaço e água clorada, de acordo com fluxograma da produção de etanol (Anexo 1).



Figura 2 – Representação das amostras da Usina A. Amostras da Usina A, localizada no interior do estado de São Paulo, coletadas a partir do conteúdo de dornas (vinho) e de outros cinco pontos para rastreamento (mel pobre, mel final, melaço, água clorada e mosto) durante os meses de maio a agosto para análise metagenômica.

3.2. METAGENÔMICA

3.2.1. Extração/Acesso ao DNA

As amostras foram diluídas na proporção de 1:50 para posterior processamento. Feito isso, as amostras foram aquecidas a 94°C durante 10 minutos e em seguida centrifugadas a 14000rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi passado para um tubo limpo de 1,5ml e o restante foi desprezado.

Para amostras de difícil acesso ao DNA pelo método de simples aquecimento, foi utilizado o kit de extração ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research®), conforme recomendações do fabricante para bactérias.

A seguir as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% a fim de verificar a qualidade do DNA. A amostra foi então armazenada em freezer a -20°C.

3.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para amplificação de fragmento do gene ribossomal 16S foi realizada PCR (MULLIS, 1987), em reação com volume final de 20µl, contendo 10µl de GoTaq®Colorless Master Mix 2X (Promega), 0,6 µl dos oligonucleotídeos universais indexados em concentração de 10µM (oligonucleotídeo *Foward*: 5' AACGCGAAGAACCTTAC 3' e oligonucleotídeo *Reverse*: 5' CGGTGTGTACAAGACCC 3'), 1 µl de DNA e 7,8 µl de água para injeção para completar 20 µl de reação.

As reações de PCR foram realizadas em triplicata a fim de se obter do volume final necessário para o processamento, também foram feitas reações para um controle positivo e um negativo.

No termociclador *Eppendorf™ Mastercycler Personal Thermal Cyclers*, o programa de amplificação utilizado foi o seguinte: 3 minutos de desnaturação inicial do DNA molde a 94°C, seguido de 35 ciclos compostos de 45 segundos a 94°C de desnaturação, 1 minuto a 50°C para anelamento dos oligonucleotídeos à fita desnaturada, 1 minuto e 30 segundos a 72°C de extensão; e extensão final de 10 minutos a 72°C, a qual habilita toda amplificação a se completar.

Para observar o resultado da amplificação, foi feita uma nova corrida de eletroforese em gel de agarose 2% com o produto de PCR para validar o funcionamento da

amplificação. Foi aplicado no primeiro poço do gel o marcador de peso molecular (*Ladder* 100 pb, Ludwig Biotec), seguido das amostras, um controle positivo e controle negativo.

3.2.3. Purificação

A amostra obtida a partir da junção do volume das triplicatas foi purificada utilizando o kit comercial Agencourt® AMPure® XP, composto por *beads* magnéticas, de acordo com as normas do fabricante.

3.2.4. Quantificação Kapa - StepOne Real Time

Após terem sido purificadas, as amostras foram diluídas 1:1000 em solução Tris-HCl + 0,05% Tween 20 e preparadas para quantificação em StepOne Real Time por meio do kit Kapa Library Quantification Kit – Illumina/Universal.

Usando o kit, foi feita uma reação de PCR com volume final de 20µl, contendo 12µl de MasterMix (preparado previamente com 1ml de Primer Premix em 5ml de tampão), 0,4µl de ROX high, 4µl de DNA diluído ou dos 6 padrões e 3,6µl de água para injeção para completar 20 µl de reação.

Na placa de 96 poços seguiu-se a seguinte ordem de aplicação: 6 padrões em triplicata, seguido das amostras diluídas em triplicata e ao final um branco.

Com os valores encontrados na quantificação Kapa, foi construída uma curva padrão a partir dos 6 (seis) padrões com valores conhecidos (Figura 3), a qual fornece uma equação da reta e a partir dessa equação, os valores encontrados para as amostras na quantificação Kapa (*Ct mean*) foram substituídos e calculados através de fórmulas, gerando uma biblioteca mãe em nM.

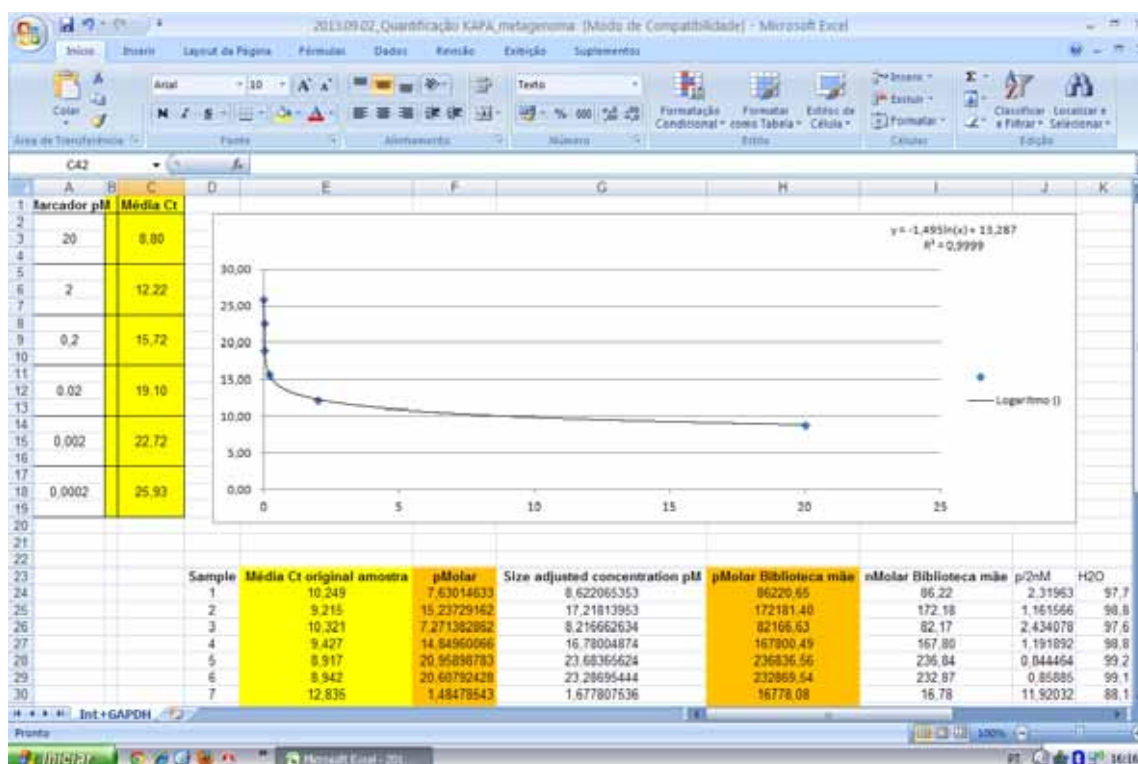


Figura 3 - Curva padrão para elaboração de biblioteca em nM. Curva-padrão obtida através de seis padrões com valores conhecidos, fornecedora de uma equação da reta onde os valores encontrados para as amostras na quantificação Kapa (*Ct mean*) são substituídos e calculados através de fórmulas em software Microsoft® Excel, gerando uma biblioteca mãe em nM.

3.2.5. Denaturação do DNA

A partir da biblioteca mãe em nM, as amostras foram deixadas numa concentração de 2nM e foi feito um “pool” contendo 5µl de cada amostra, acrescido de 5µl de uma amostra controle.

Num tubo limpo de 1,5ml foi adicionado 5µl deste “pool”, o qual foi denaturado com 5µl de NaOH 0,2N recém-preparado, incubando em temperatura ambiente por 5 minutos.

3.2.6. Preparação para sequenciamento

Após os 5 minutos de incubação foram adicionados ao tubo de DNA denaturado, 990µl da solução HT1 contida no Box 1 do kit Miseq Reagent NanoKit Illumina®.

Destes 1000µl obtidos, 600µl foram inseridos na posição 17 (*Load Sample*) do cartucho de reagentes.

O sequenciamento realizado pelo equipamento Miseq Illumina é do tipo paired-end, ou seja, sequencia a fita de DNA nos sentidos *foward* e *reverse*, por isso é necessário adicionar *primers forward* (FowardMeta) e *reverse* (RevMeta), além de um primer *índex* (IndexMeta) que irá diferenciar as amostras. Sendo assim, além da amostra, foi adicionado 3,4µl de *primer* FowardMeta na posição 12; 3,4µl de IndexMeta na posição 13 e 3,4µl de RevMeta na posição 14 do cartucho de reagentes conforme proposto por Caporaso *et al.* (2012).



Figura 4 – Representação do cartucho de reagentes e *flowcell* (lâmina de fluxo) presentes no MiSeq Reagent NanoKit Illumina®. A figura sinaliza em vermelho as posições onde devem ser inseridos os primers *foward* (FowardMeta), *reverse* (RevMeta) e *índex* (IndexMeta) no cartucho de reagentes presente no kit MiSeq Reagent NanoKit Illumina®, conforme proposto por Caporaso *et al.* (2012). Ao lado, uma representação da *flowcell*, (lâmina de fluxo utilizada para adicionar as amostras que serão sequenciadas) que será inserida no equipamento MiSeq Illumina para que o sequenciamento aconteça.

Feito isso, o cartucho de reagentes foi levado, juntamente com a *flowcell* Nano contida no Box 2 do kit MiSeq Reagent NanoKit Illumina® para sequenciamento no equipamento MiSeq Illumina, de acordo com o protocolo do fabricante.

O sequenciamento no equipamento MiSeq Illumina® é composto pelas seguintes etapas (de acordo com o protocolo Illumina):

a) Clusterização (formação dos clusters)

Durante a clusterização, moléculas de DNA em fitas simples são ligadas à superfície da *flowcell* (lâmina de fluxo utilizada para adicionar as amostras que serão

sequeenciadas) e, em seguida, amplificadas para formar clusters (aglomerados de sequências iguais).

b) Sequenciamento

Após a “clusterização”, são geradas imagens (fotos) com o uso de combinações de filtro e LED específicas para cada um dos quatro didesoxinucleotídeos (ddNTPs de A, T, C e G). O processo é repetido para cada ciclo de sequenciamento. Posteriormente, o programa realiza a análise primária, que inclui chamada de base, filtragem e pontuação de qualidade. A partir desse procedimento, é possível determinar as sequências utilizando as fotos que apresentaram luminescência para cada cluster formado na lâmina de fluxo.

3.3. BIOINFORMÁTICA

Os resultados foram submetidos à análise por meio de software interno do sequenciador MiSeq Illumina®, comparados com o banco de dados do software CLC – Genomics Workbench para identificação de bactérias. Também foi utilizado o software Microsoft® Excel XP para cálculos e gráficos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao longo da safra de 2013, foram coletadas amostras mensais de diferentes usinas, estando as Usinas A e C localizadas no estado de São Paulo e Usina B em Goiás.

O DNA foi extraído, em seguida foi realizado a PCR da região 16S do DNA ribossomal, bem como a purificação e quantificação do produto de PCR. O sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina®. Após a corrida, os dados obtidos foram analisados segundo Caporaso *et. al.* (2012).

Através da análise bioinformática, foram obtidos os *hits* (quantidades de vezes que uma sequência apareceu). Essas sequências foram comparadas ao banco de bactérias Greengenes, no qual cada sequência corresponde a uma bactéria. Desse modo foram encontradas as bactérias presentes em cada amostra e a quantidade de vezes que apareceu através do número de *hits*. Para eliminar bactérias que apareceram em quantidades muito reduzidas em cada amostra, foi considerado um número de *hits* igual ou maior a 100 como número de *hits* de corte. A partir desses dados foi calculada a média das porcentagens das bactérias mais prevalentes nas dornas de fermentação e demais ambientes de rastreamento. Com base na literatura, as bactérias encontradas também foram classificadas de acordo com suas características fermentativas e de coloração Gram.

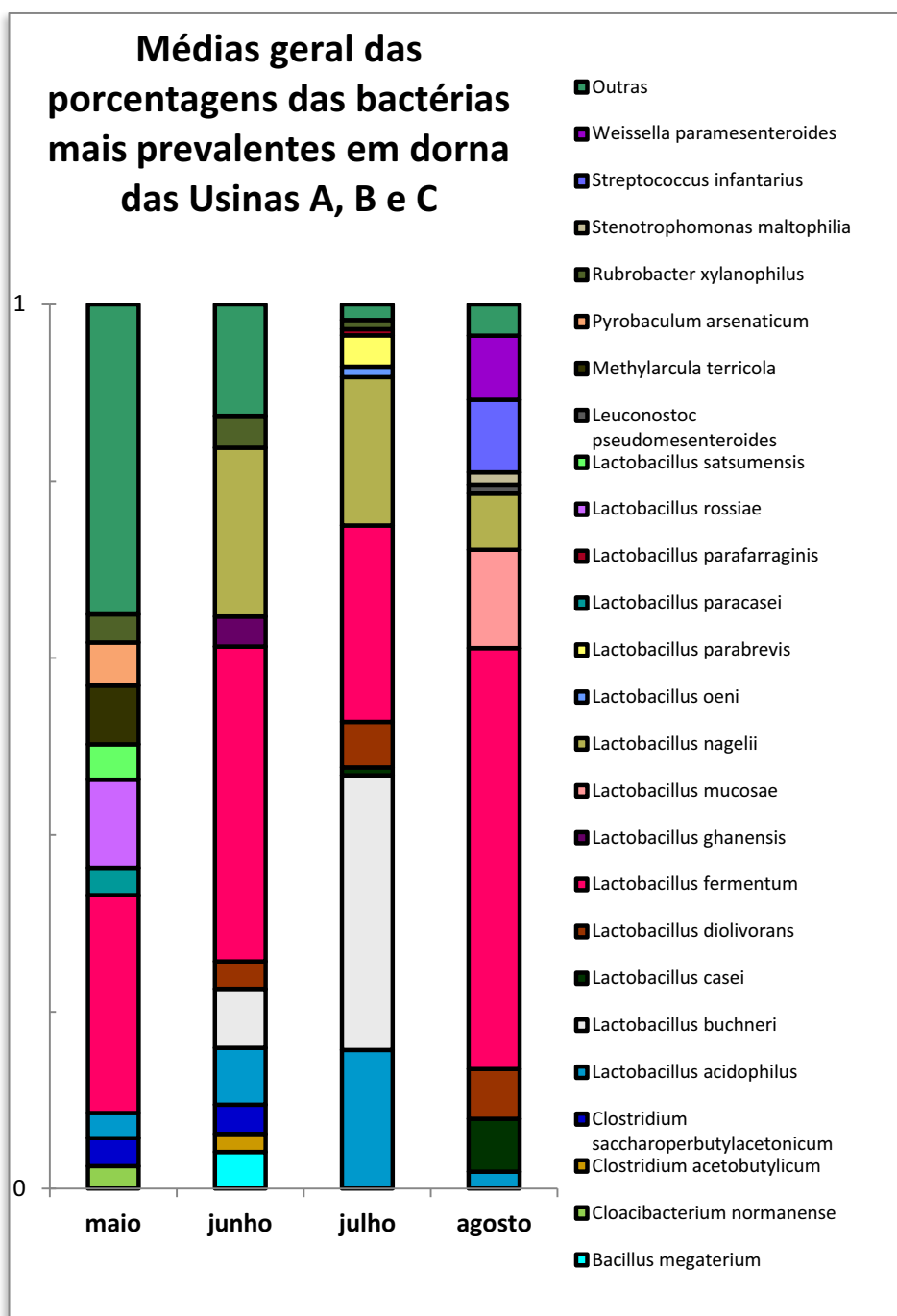


Gráfico 1 - Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em dornas das Usinas A, B e C durante os meses de maio a agosto de 2013. As amostras das Usinas A, B e C coletadas durante os meses de maio a agosto tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados segundo Caporaso *et al.* (2012), resultando numa distribuição mês a mês das porcentagens médias das bactérias mais prevalentes nas três usinas, onde cada espécie encontrada está representada por uma cor diferente.

Durante os meses de maio a agosto, foi possível observar numa visão geral das três usinas (Gráfico 1) o predomínio do gênero *Lactobacillus*, sendo *Lactobacillus fermentum* a

espécie mais prevalente, seguido por: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus buchneri* e *Lactobacillus nagelii*.

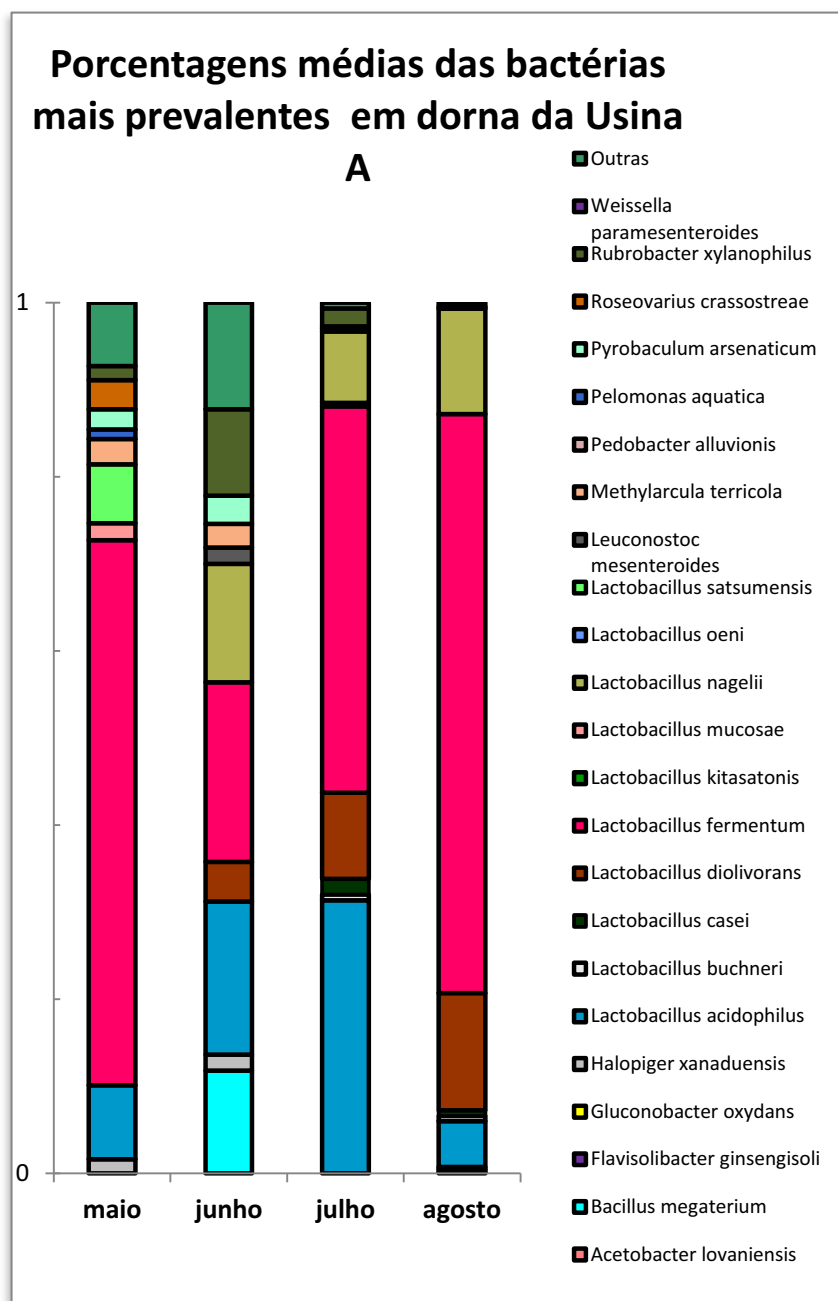


Gráfico 2 - Distribuição geral das bactérias mais prevalentes de cada mês em dornas da Usina A, durante os meses de maio a agosto de 2013. As amostras da Usina A coletadas durante os meses de maio a agosto tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados segundo Caporaso *et al.* (2012), resultando numa distribuição mês a mês das porcentagens médias das bactérias mais prevalentes em dorna da Usina A, onde cada espécie encontrada está representada por uma cor diferente.

Durante os meses de maio a agosto, foi possível observar na Usina A (Gráfico 2) o predomínio de *Lactobacillus fermentum*, seguido pelas espécies do mesmo gênero: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus nagelii* e *Lactobacillus diolivorans*.

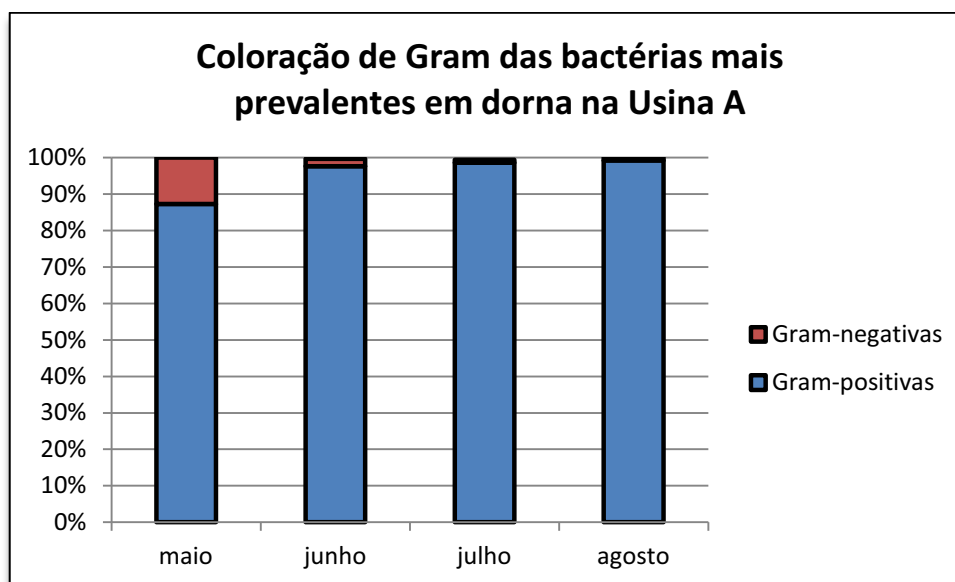


Gráfico 3 - Distribuição das características quanto à coloração de Gram das bactérias mais prevalentes em dornas da Usina A. As amostras da Usina A coletadas durante os meses de maio a agosto, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados segundo Caporaso *et al.* (2012). Com base na literatura, as bactérias foram classificadas quanto sua coloração Gram, resultando numa distribuição mês a mês das porcentagens médias de bactérias gram-positivas e gram-negativas mais prevalentes em dorna da Usina A.

Quanto à coloração de Gram para Usina A observou-se durante os meses de maio a agosto o predomínio de bactérias gram-positivas (Gráfico 3).

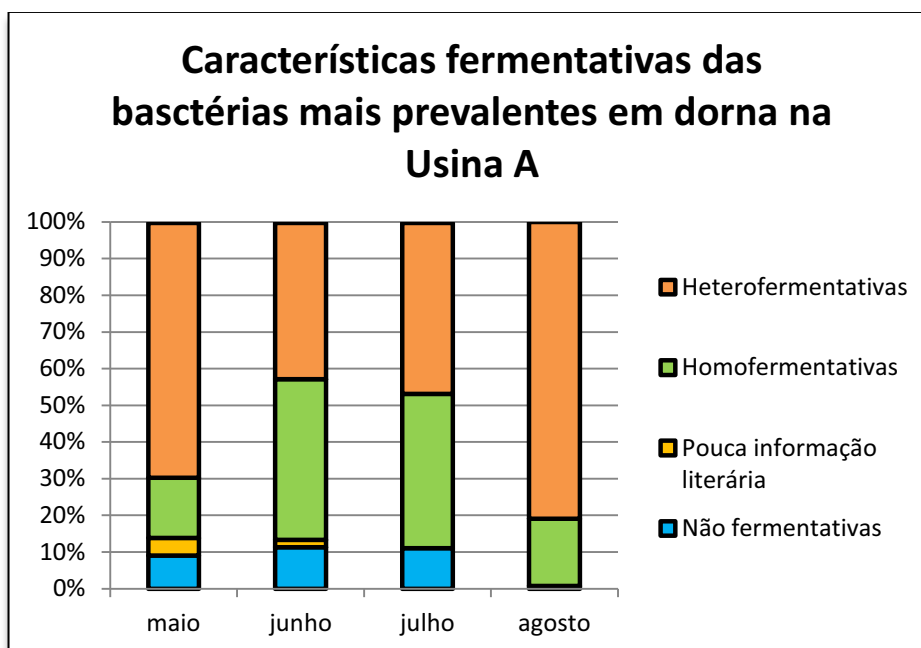


Gráfico 4 - Distribuição das características fermentativas (metabolismo do açúcar) das bactérias mais prevalentes em dornas da Usina A. As amostras da Usina A coletadas durante os meses de maio a agosto, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados segundo Caporaso *et al.* (2012). Com base na literatura, as bactérias foram classificadas de acordo com suas características fermentativas (metabolismo do açúcar), resultando numa distribuição das porcentagens médias de bactérias heterofermentativas, homofermentativas, com pouca informação literária e não fermentativas mais prevalentes em dorna da Usina A.

Com relação às características fermentativas para Usina A observou-se durante os meses de maio a agosto o predomínio de bactérias heterofermentativas (Gráfico 4).

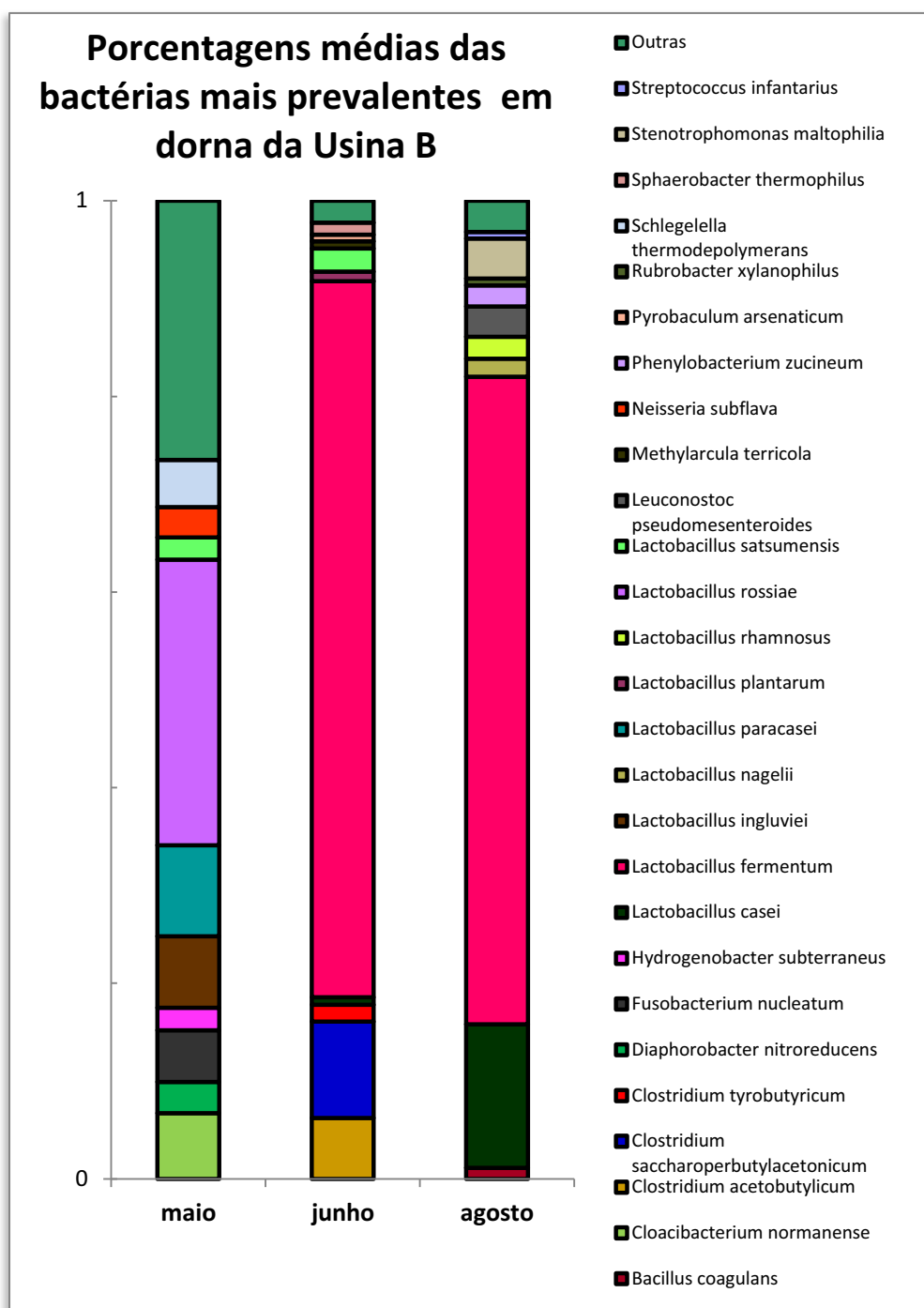


Gráfico 5 - Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em cada mês em dornas da Usina B, durante os meses de maio, junho e agosto de 2013. As amostras da Usina B coletadas durante os meses de maio, junho e agosto, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados segundo Caporaso *et al.* (2012), resultando numa distribuição mês a mês das porcentagens médias das bactérias mais prevalentes em dorna da Usina B, onde cada espécie encontrada está representada por uma cor diferente.

Para a Usina B o acompanhamento foi feito apenas durante os meses de maio, junho e agosto, uma vez que não foi possível a realização da coleta no mês de julho (Gráfico

5). Sendo assim, observou-se o predomínio de *Lactobacillus rossiae* em maio e *Lactobacillus fermentum* para os meses de junho e agosto.

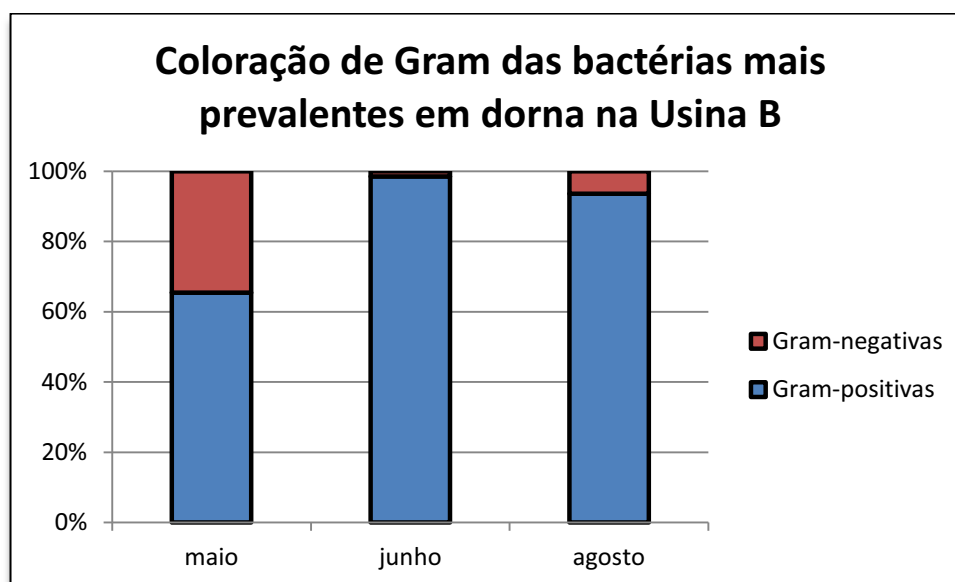


Gráfico 6 - Distribuição das características quanto à coloração de Gram das bactérias mais prevalentes em dornas da Usina B. As amostras da Usina B coletadas durante os meses de maio, junho e agosto, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados segundo Caporaso *et al.* (2012). Com base na literatura, as bactérias foram classificadas quanto sua coloração Gram, resultando numa distribuição mês a mês das porcentagens médias de bactérias gram-positivas e gram-negativas mais prevalentes em dorna da Usina B.

Para a Usina B foi observada numa média geral dos meses de maio, junho e agosto, a prevalência de bactérias gram-positivas (Gráfico 6).

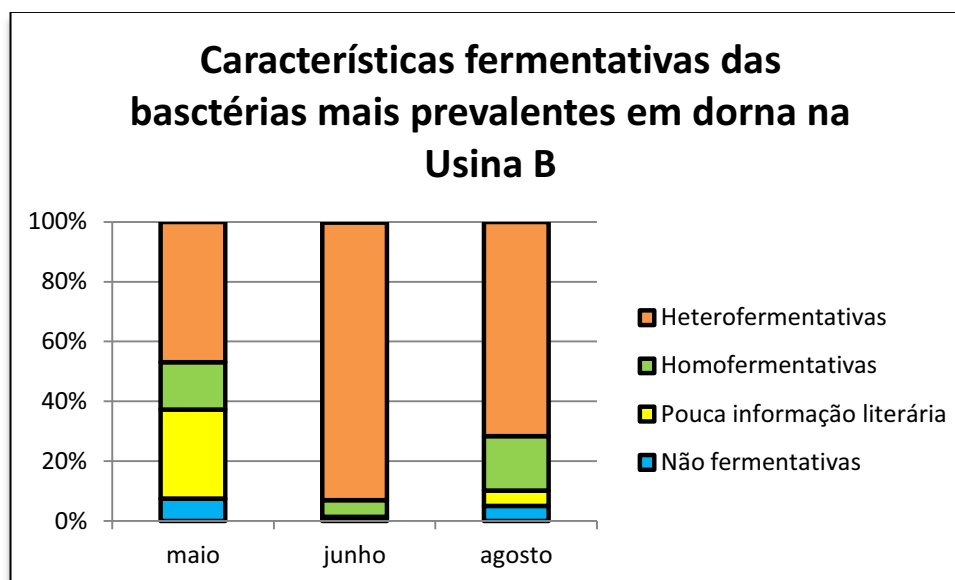


Gráfico 7 - Distribuição das características fermentativas (metabolismo do açúcar) das bactérias mais prevalentes em dornas da Usina B. As amostras da Usina B coletadas durante os meses de maio, junho e agosto, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados segundo Caporaso *et al.* (2012). Com base na literatura, as bactérias foram classificadas de acordo com suas características fermentativas (metabolismo do açúcar), resultando numa distribuição das porcentagens médias de bactérias heterofermentativas, homofermentativas, com pouca informação literária e não fermentativas mais prevalentes em dorna da Usina B.

Com relação às características fermentativas da Usina B, observou-se durante os meses de maio, junho e agosto o predomínio de bactérias heterofermentativas (Gráfico 7).

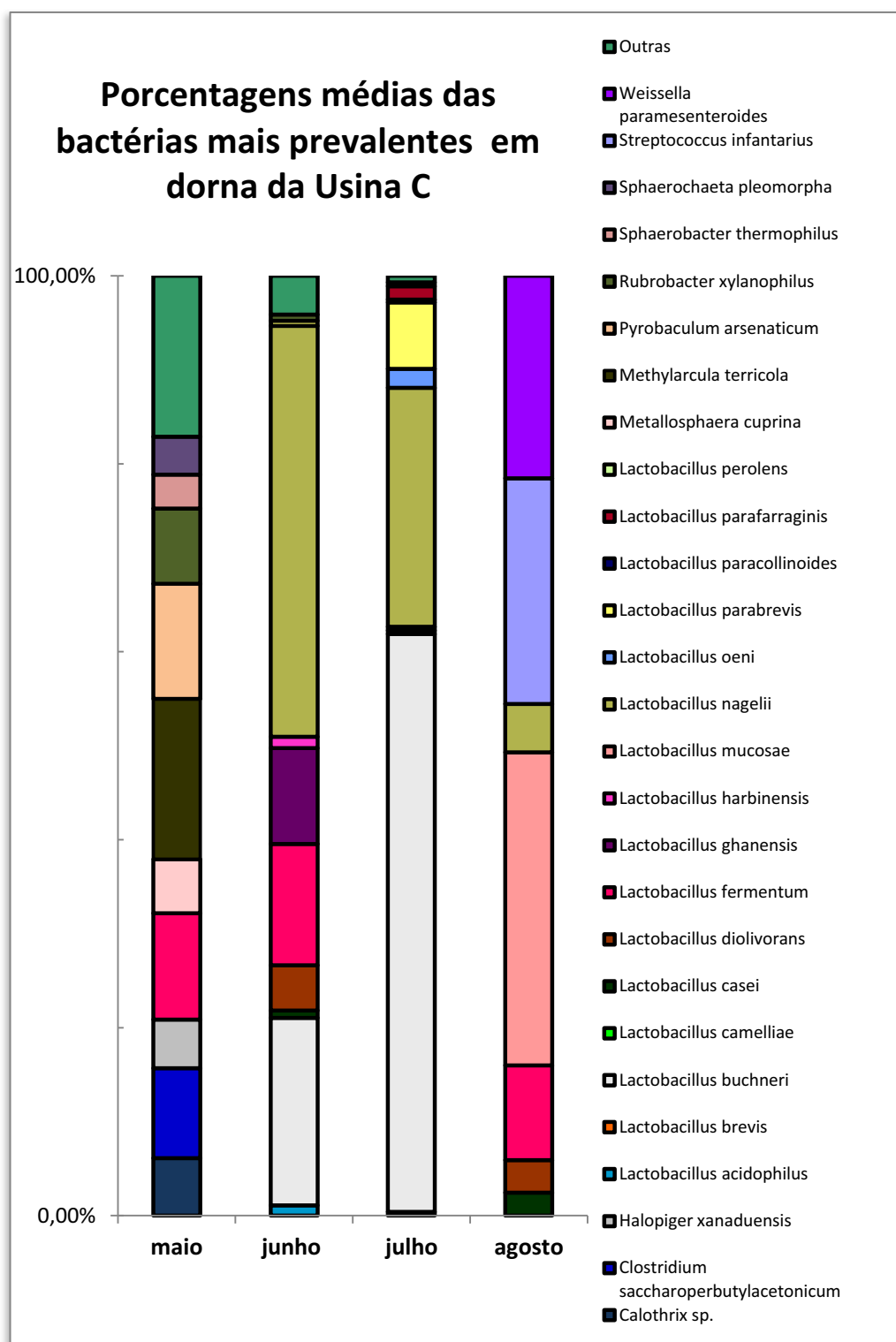


Gráfico 8 - Distribuição geral das bactérias mais prevalentes de cada mês em dornas da Usina C, durante os meses de maio a agosto de 2013. As amostras da Usina C coletadas durante os meses de maio a agosto tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados segundo Caporaso *et al.* (2012), resultando numa distribuição mês a mês das porcentagens médias das bactérias mais prevalentes em dorna da Usina C, onde cada espécie encontrada está representada por uma cor diferente.

No acompanhamento da Usina C durante os meses de maio a agosto houve o predomínio as espécies *Lactobacillus nagelii* e *Lactobacillus buchneri*. Em menor porcentagem (média 11,44%) temos *Lactobacillus fermentum* aparecendo em três dos meses observados. Além disso, as bactérias *Weissella paramesenteroides* e *Streptococcus infantarius* também apresentaram forte expressão no mês de agosto.

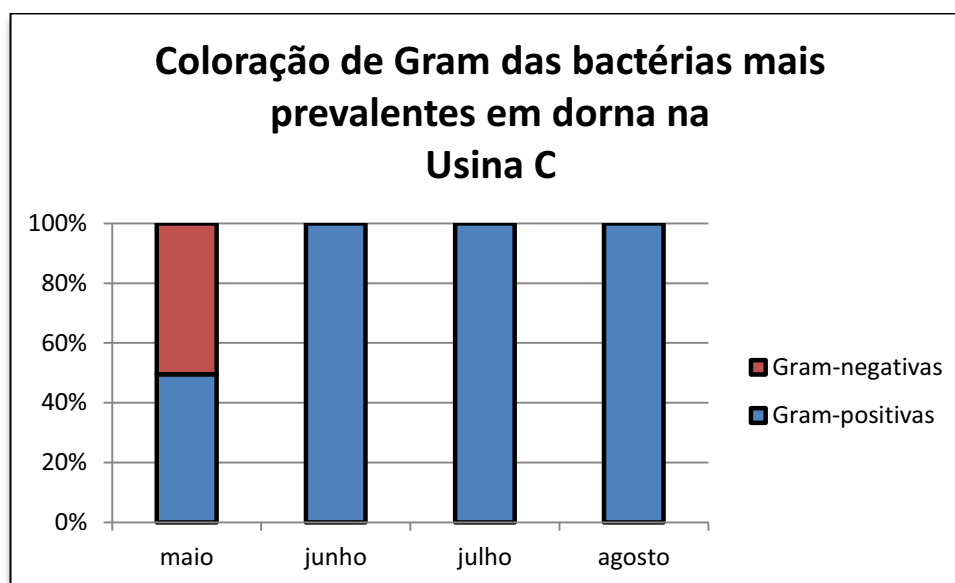


Gráfico 9 - Distribuição das características quanto à coloração de Gram das bactérias mais prevalentes em dornas da Usina C. As amostras da Usina C coletadas durante aos meses de maio a agosto, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados segundo Caporaso *et al.* (2012). Com base na literatura, as bactérias foram classificadas quanto sua coloração Gram, resultando numa distribuição mês a mês das porcentagens médias de bactérias gram-positivas e gram-negativas mais prevalentes em dorna da Usina C

A coloração de Gram das bactérias encontradas na Usina C nos meses de maio a agosto mostrou-se predominantemente gram-positiva (Gráfico 9).

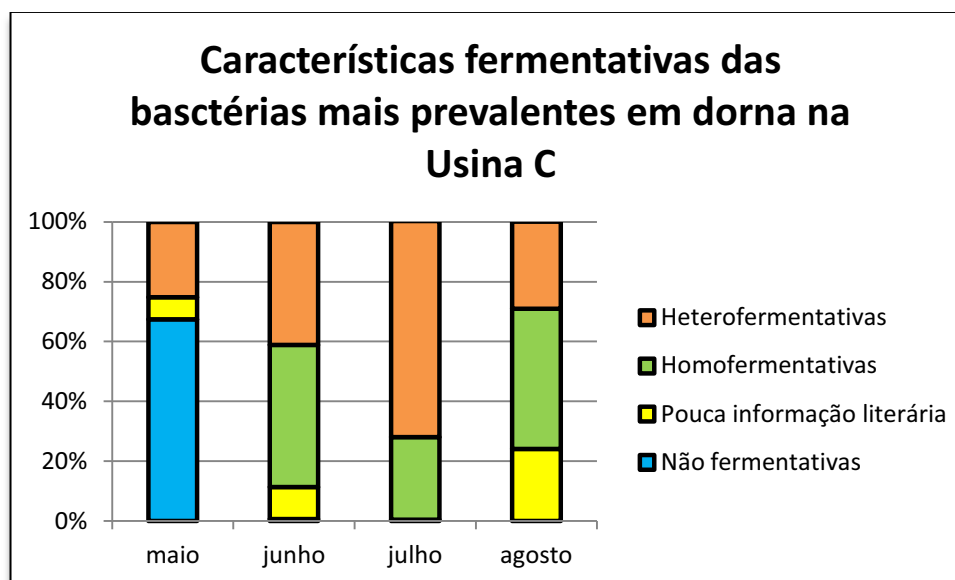


Gráfico 10 - Distribuição das características fermentativas (metabolismo do açúcar) das bactérias mais prevalentes em dornas da Usina C. As amostras da Usina C coletadas durante os meses de maio a agosto, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados segundo Caporaso *et al.* (2012). Com base na literatura, as bactérias foram classificadas de acordo com suas características fermentativas (metabolismo do açúcar), resultando numa distribuição das porcentagens médias de bactérias heterofermentativas, homofermentativas, com pouca informação literária e não fermentativas mais prevalentes em dorna da Usina C.

No que diz respeito às características fermentativas da Usina C, durante os meses de maio a agosto foi observado o predomínio geral de bactérias heterofermentativas (Gráfico 10).

Comparando as usinas com relação à sua localização, não se observou grandes diferenças entre a região de Goiás e o interior do estado de São Paulo. As três usinas apresentaram maior quantidade de bactérias do gênero *Lactobacillus* (Gráficos 2, 5 e 8) e coloração gram-positivas (Gráficos 3, 6 e 9), as quais são bactérias mais sensíveis a tratamentos com antibióticos, facilitando a eliminação da contaminação. Além disso, todas as usinas apresentaram predominantemente bactérias heterofermentativas (Gráficos 4, 7 e 10), o que é ruim para o processo de produção de etanol, visto que estas bactérias estarão competindo com a levedura pelo consumo de açúcar e nutrientes e isso diminuirá o rendimento da produção de etanol.

Através destes dados é possível considerar que há um perfil próximo entre os ambientes das diversas usinas independentemente de sua localização.

Tais resultados corroboram dados encontrados na literatura e validam a metodologia, conforme demonstrado por Escalante (2004), Carvalho-Netto (2007) e Marques (2011) que encontraram em seus estudos prevalência dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella*.

A Usina B faz uso da técnica de batelada alimentada, com separação em 6 (seis) dornas distintas. Sendo assim, foi feita a análise de amostras dorna a dorna desta usina, a fim de comparar a microbiota presente em cada uma delas.

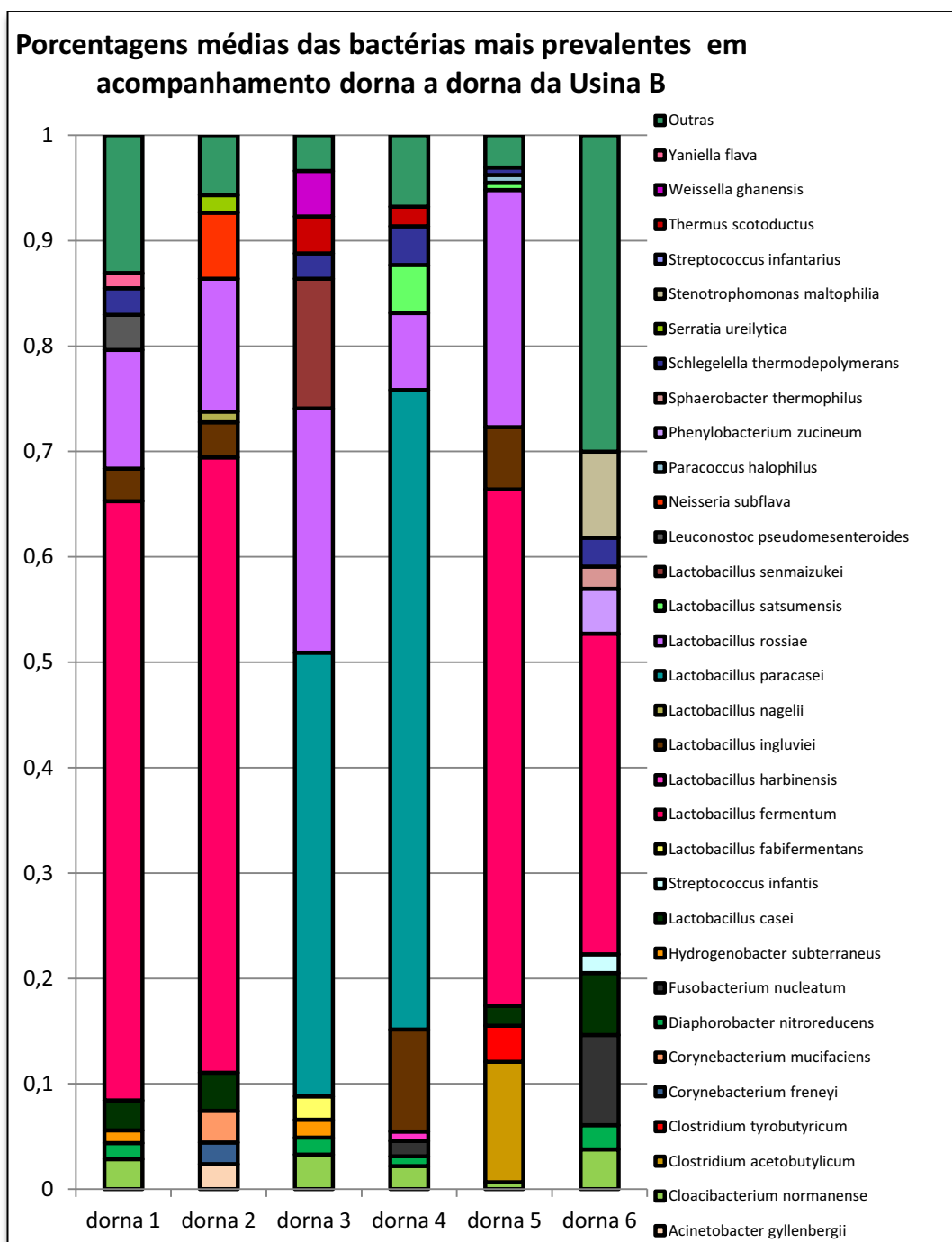


Gráfico 11- Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em acompanhamento dorna a dorna da Usina B, durante os meses de maio, junho e agosto de 2013. As amostras coletadas de diferentes dornas da Usina B durante os meses de maio, junho e agosto, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados dorna a dorna, segundo Caporaso *et al.* (2012), resultando numa distribuição geral das porcentagens médias das bactérias mais prevalentes em cada dorna da Usina B, onde cada espécie encontrada está representada por uma cor diferente.

De modo geral, percebe-se que o ambiente industrial da Usina B, favorece o aparecimento em todas as dornas da espécie *Clocibacterium normanense* e do gênero *Lactobacillus*, com destaque para as espécies *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rossiae*. As espécies *Schlegelella thermodepolymerans* e *Diaphorobacter nitroreducens*, também apareceram respectivamente em 5 (cinco) e 4 (quatro) das 6 (seis) dornas estudadas, porém em menor porcentagem (média de 2,4% para *Schlegelella thermodepolymerans* e 1,6% para *Diaphorobacter nitroreducens*) (Gráfico 11).

Também é interessante ressaltar que pelo fato da Usina B apresentar o sistema de produção dividido em dornas separadas, os contaminantes observados em uma dorna não necessariamente fazem parte da microbiota das demais dornas, necessitando que seja aplicado um tratamento individual.

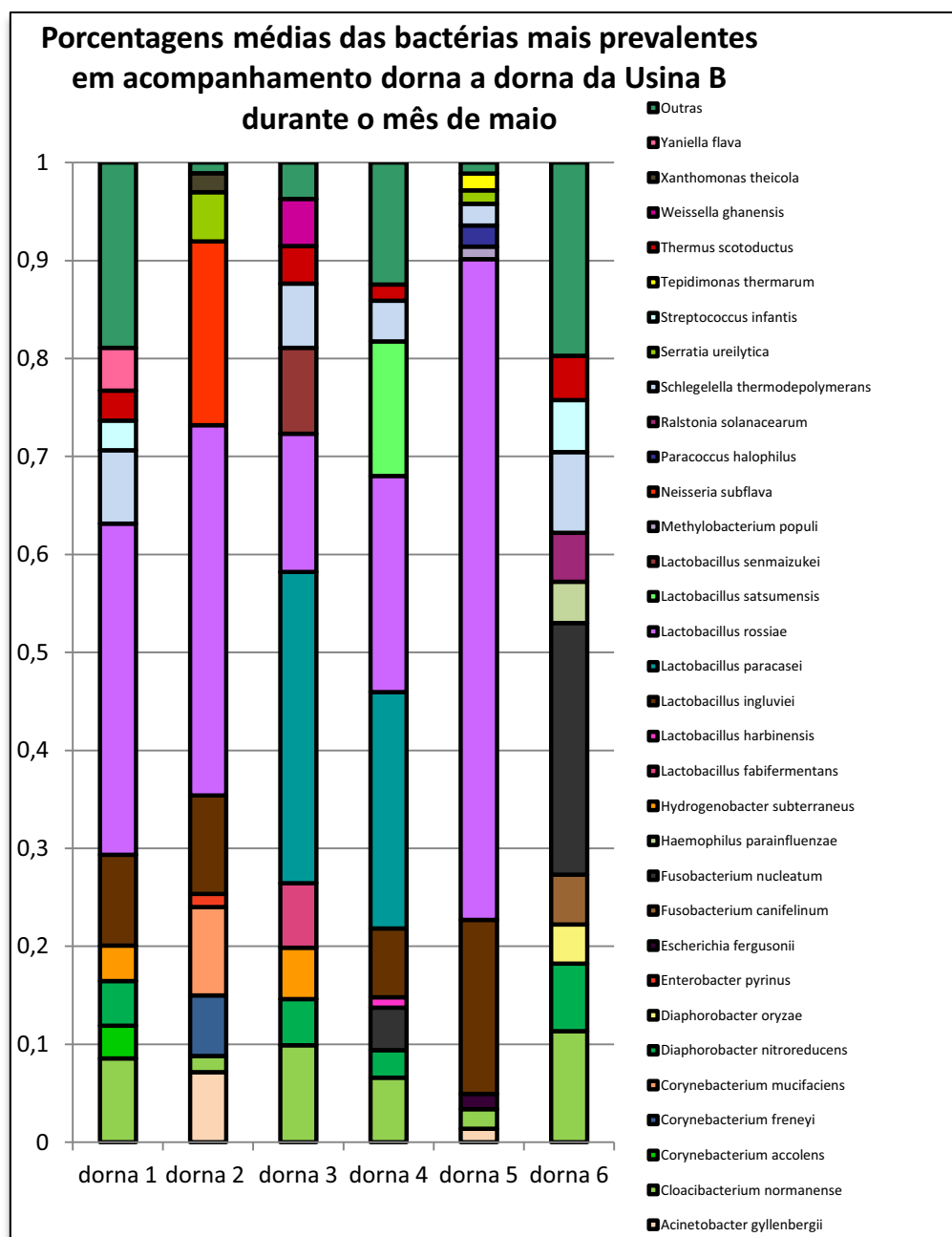


Gráfico 12- Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em acompanhamento dorna a dorna da Usina B, durante o mês de maio de 2013. As amostras coletadas de diferentes dornas da Usina B durante o mês de maio, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados dorna a dorna, segundo Caporaso *et al.* (2012), resultando numa distribuição das porcentagens médias das bactérias mais prevalentes em cada dorna da Usina B durante o mês de maio, onde cada espécie encontrada está representada por uma cor diferente.

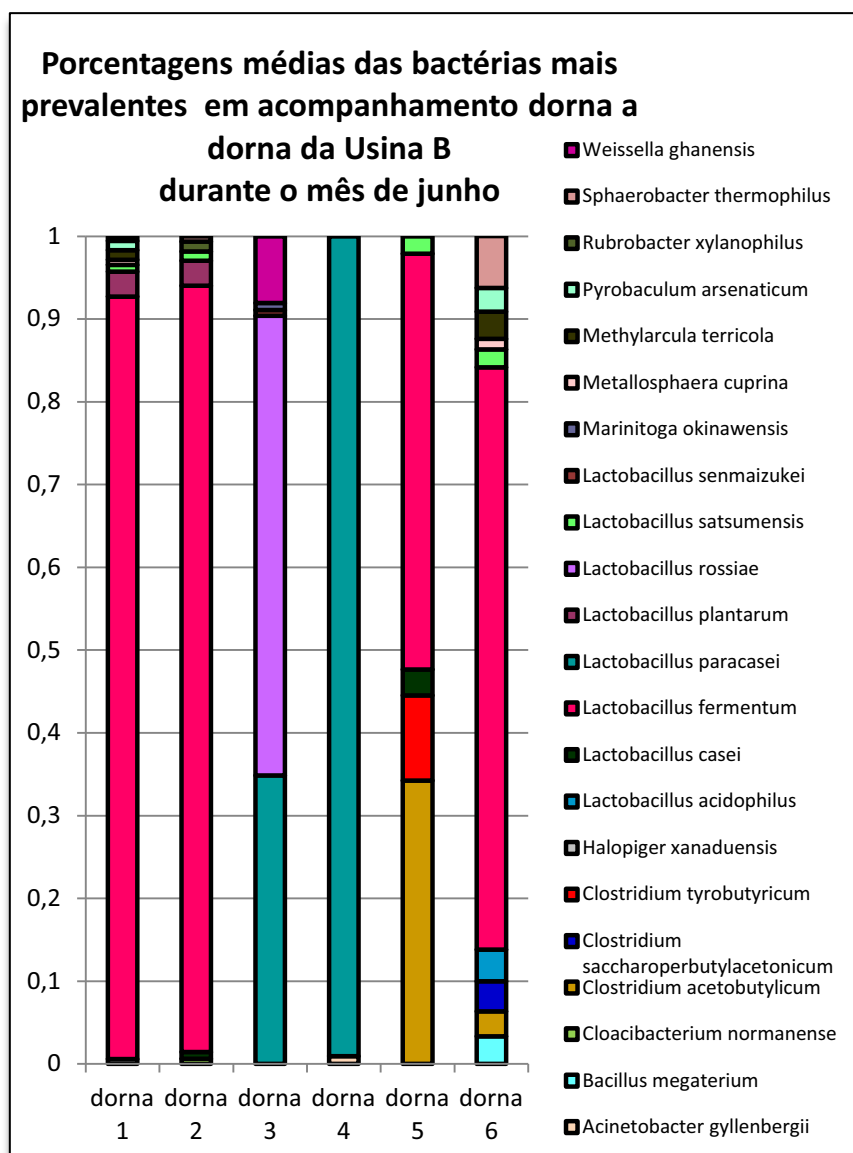


Gráfico 13 - Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em acompanhamento dorna a dorna da Usina B, durante o mês de junho de 2013. As amostras coletadas de diferentes dornas da Usina B durante o mês de junho, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados dorna a dorna, segundo Caporaso *et al.* (2012), resultando numa distribuição das porcentagens médias das bactérias mais prevalentes em cada dorna da Usina B durante o mês de junho, onde cada espécie encontrada está representada por uma cor diferente.

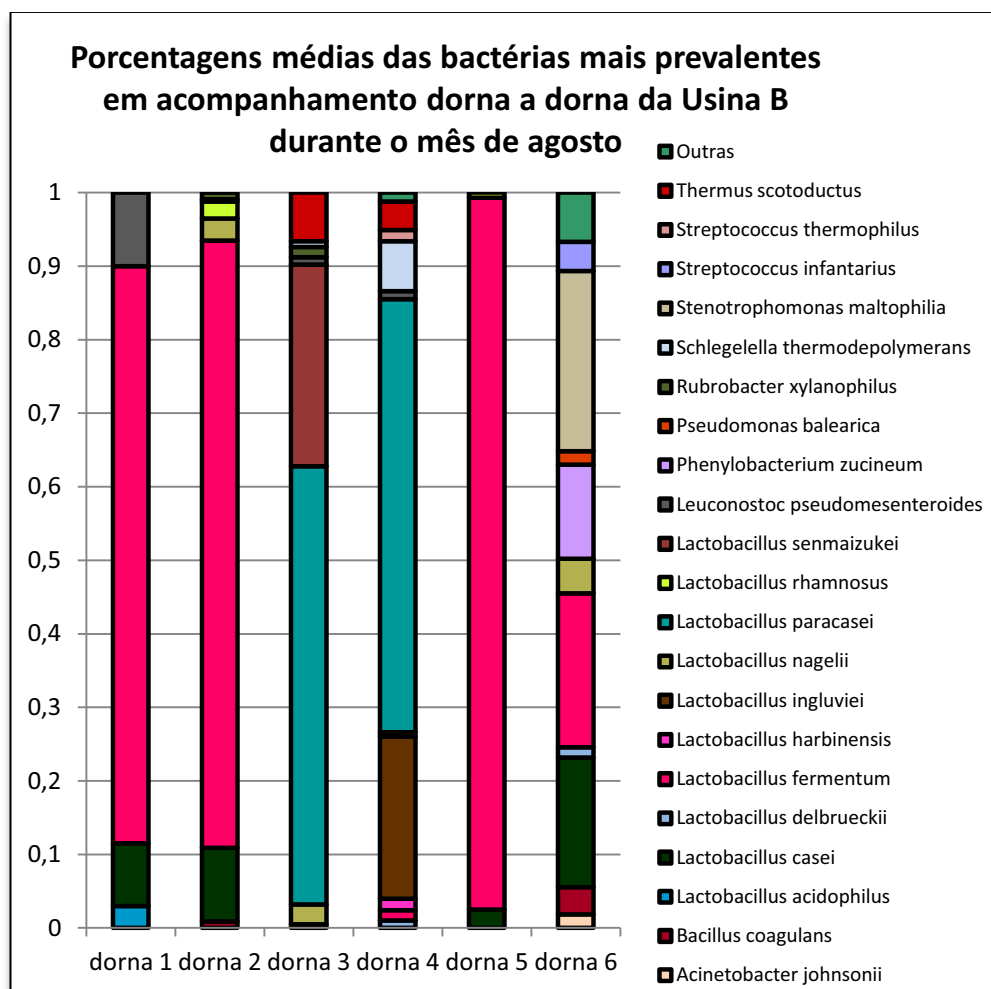


Gráfico 14 - Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em acompanhamento dorna a dorna da Usina B, durante o mês de agosto de 2013. As amostras coletadas de diferentes dornas da Usina B durante o mês de agosto, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados dorna a dorna, segundo Caporaso *et al.* (2012), resultando numa distribuição das porcentagens médias das bactérias mais prevalentes em cada dorna da Usina B durante o mês de agosto, onde cada espécie encontrada está representada por uma cor diferente.

Numa análise mês a mês, confirma-se na Usina B o gênero *Lactobacillus* como o mais prevalente, estando *Lactobacillus paracasei* presente nas dornas 3 e 4 em todos os meses de estudo, enquanto *Lactobacillus rossiae* que aparece em quase todas as dornas no primeiro mês dá lugar a outras bactérias nos meses seguintes (Gráficos 12 a 14).

Em contraposição à Usina B, a Usina A faz uso da técnica de fermentação contínua para produção de etanol. Com o intuito de identificarmos de onde poderia vir a contaminação vista na dorna deste outro tipo de processo de fermentação, foi realizado o que denominamos de rastreamento, isto é, amostras de diferentes pontos da Usina A (mel pobre,

mel final, melaço, água clorada e mosto) foram estudadas com a mesma tecnologia e comparadas ao que estava ocorrendo na dorna em três momentos: uma semana antes do rastreamento (03/07/2013), no momento do rastreamento (10/07/2013) e uma semana após o rastreamento (18/07/2013).

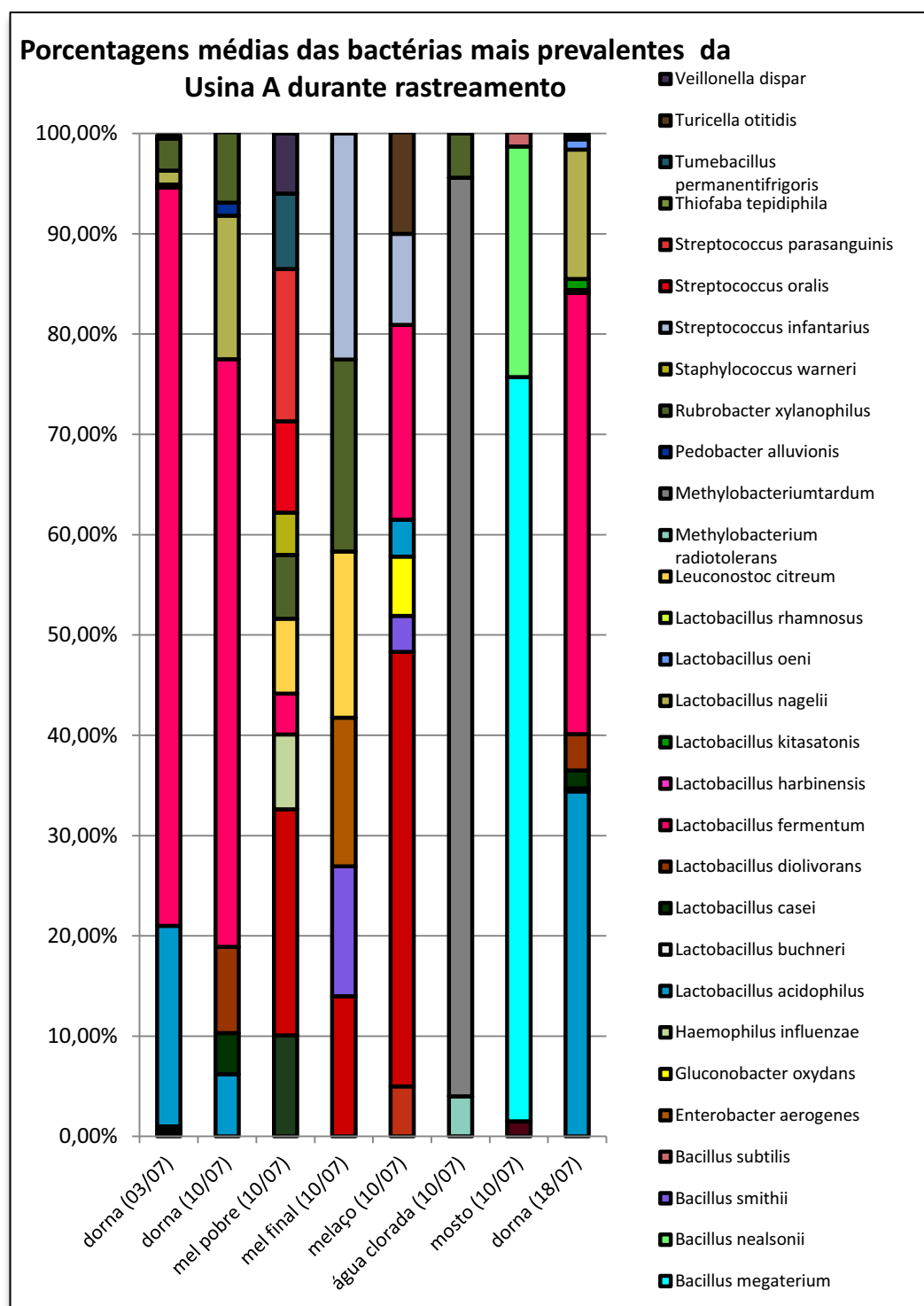


Gráfico 15 - Distribuição geral das bactérias mais prevalentes em rastreamento realizado na Usina A durante o mês de julho de 2013. As amostras coletadas de diferentes pontos além da dorna da Usina A durante

rastreamento, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados dorna a dorna, segundo Caporaso *et al.* (2012), resultando numa distribuição das porcentagens médias das bactérias mais prevalentes em cada ponto de rastreamento da Usina A bem como na dorna uma semana antes (03/07/2013), no momento (10/07/2013) e após o rastreamento (18/07/2013), onde cada espécie encontrada está representada por uma cor diferente.

Numa visão temporal dos resultados obtidos através do rastreamento foi observado que dentre espécies nos pontos do rastreamento (mel pobre, mel final, melaço, água clorada e mosto) apenas as espécies *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus acidophilus* também foram encontradas na dorna em seus três momentos de análise. Já *Rubrobacter xylophilus* foi encontrada apenas na dorna no momento do rastreamento (10/07/2013) e na semana anterior (03/07/2013).

Apesar da forte prevalência dos gêneros *Bacillus*, *Streptococcus* e *Methylobacterium* nos pontos de rastreamento, os mesmos não foram observados na dorna após o rastreamento, o que indica que a dorna não oferece condições favoráveis para o crescimento destes gêneros.

Outra questão interessante é observar que a contaminação que ocorre nos pontos de rastreamento num determinado momento irá refletir na dorna somente tempos depois.

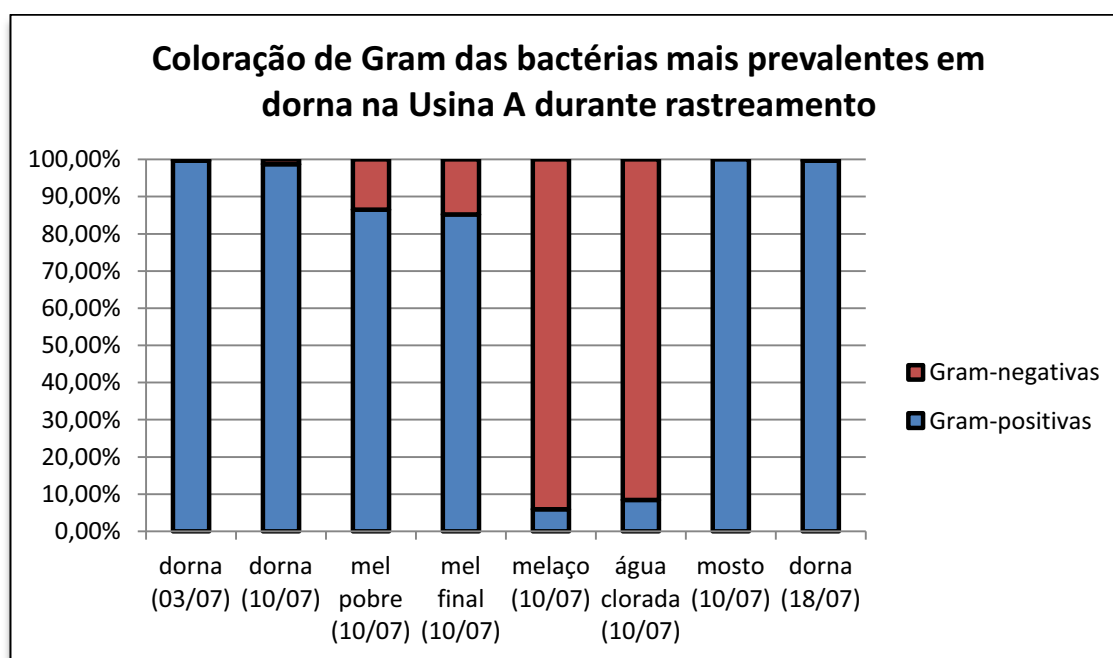


Gráfico 16 - Distribuição das características quanto à coloração de Gram das bactérias mais prevalentes em rastreamento realizado na Usina A durante o mês de julho de 2013. As amostras coletadas de diferentes pontos além da dorna da Usina A, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do

rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados segundo Caporaso *et al.* (2012). Com base na literatura, as bactérias foram classificadas quanto sua coloração Gram, resultando numa distribuição das porcentagens médias de bactérias gram-positivas e gram-negativas mais prevalentes por ponto de rastreamento da Usina A bem como na dorna uma semana antes (03/07/2013), no momento (10/07/2013) e após o rastreamento (18/07/2013).

Durante o rastreamento foi observado maior quantidade de bactérias Gram-positivas, indo de encontro com o encontrado nas dornas analisadas uma semana antes, no momento e uma semana após o rastreamento, apesar dos pontos de melaço e água clorada apresentarem predomínio de bactérias gram-negativas.

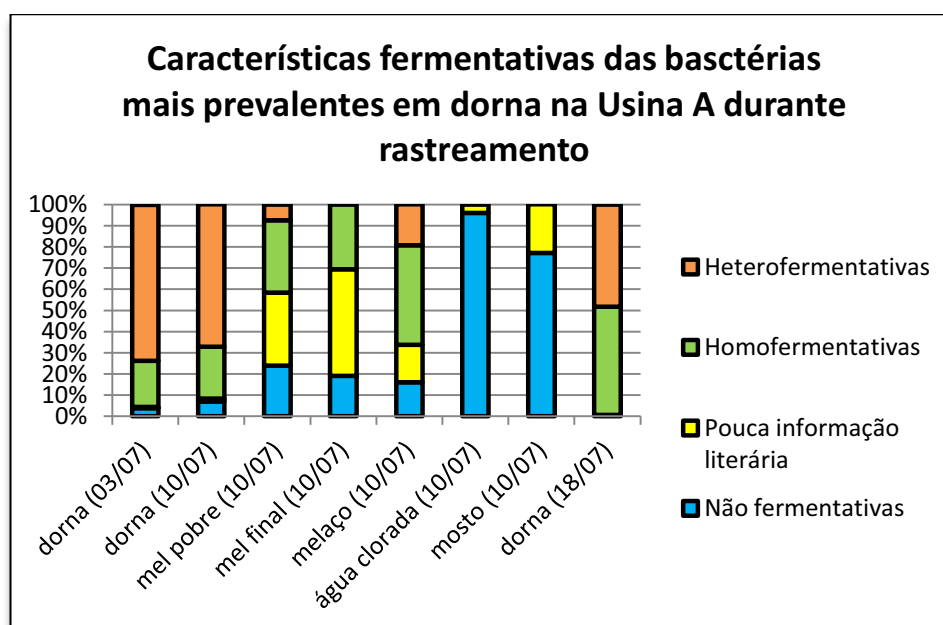


Gráfico 17- Distribuição das características fermentativas (metabolismo do açúcar) das bactérias mais prevalentes em rastreamento realizado na Usina A durante o mês de julho de 2013. As amostras coletadas de diferentes pontos além da dorna da Usina A, tiveram seu DNA extraído, e em seguida, foi feita PCR da região 16S do rDNA e sequenciamento de segunda geração em equipamento Miseq Illumina. Os dados obtidos foram analisados segundo Caporaso *et al.* (2012). Com base na literatura, as bactérias foram classificadas de acordo com suas características fermentativas (metabolismo do açúcar), resultando numa distribuição das porcentagens médias de bactérias heterofermentativas, homofermentativas, com pouca informação literária e não fermentativas mais prevalentes por ponto de rastreamento da Usina A bem como na dorna uma semana antes (03/07/2013), no momento (10/07/2013) e após o rastreamento (18/07/2013).

No rastreamento, as bactérias mais prevalentes apresentaram metabolismo do açúcar com comportamento não fermentativo (Gráfico 17), contudo as bactérias homofermentativas mesmo presentes em menor porcentagem (média de 22%) encontraram

condições favoráveis para crescimento ao longo do processo de produção, o que confere com o que se observou na dorna uma semana após o rastreamento (18/07/2013), atingindo uma porcentagem de 51,2%.

5. CONCLUSÃO

O sequenciamento de segunda geração (NGS, *Next Generation Sequencing*) confirmou o gênero *Lactobacillus* como predominante nas dornas estudadas, conforme estudos anteriores utilizando técnicas de plaqueamento e sequenciamento Sanger. Entretanto apresentou-se como uma metodologia fornecedora de resultados mais robustos, uma vez que revelou a presença de outros contaminantes não descritos anteriormente, como *Rubrobacter xylanophilus*, *Cloacibacterium normanense*, *Diaphorobacter nitroreducens*.

A metodologia ao se mostrar eficaz para estudo dos contaminantes em diferentes pontos do sistema de produção de etanol, permite rastrear a contaminação bacteriana de seu ponto inicial até alcançar a dorna. Diante dos resultados de prevalência, características e comportamento das bactérias, é possível se estabelecer um controle adequado, através de tratamentos personalizados, que serão mais eficientes e com menores custos.

REFERÊNCIAS

_____. **Relatório do Agronegócio: do bagaço ao posto**. Equipe de Inteligência Competitiva da Knowtec. Instituto CNA, 2013.

ALQUATI, P. H. **Caracterização e controle de micro-organismos contaminantes em microdestilaria de álcool**. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 1990.

AMORIM, Henrique V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Appl Microbiol Biotechnol**, 91: p.1267-1275, 7 jul. 2011.

AMORIM, Henrique V. **Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448 p.

ANGELIS, D. F. **Contaminação bacteriana na fermentação etanólica**. Disponível em:
<<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Contaminacao%20bacteriana%20na%20fermentacao%20etanolica.pdf>>.
Acesso em: 26 ago. 2013.

ANGELIS, Dejanira de Franceschi de. **Bactérias lácticas na fermentação etanólica**. Disponível em:
<<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Bacterias%20laticas%20na%20fermentacao%20etanolica.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2013.

ANTONINI, Sandra Regina Ceccato. **Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria**. Ufscar, Araras, 2004.

BASSO, L. C. **A fermentação alcoólica: alguns aspectos bioquímicos, fisiológicos e microbiológicos**. In: “V Semana de fermentação Alcoólica”. ESALQ -USP, Piracicaba, 2011.

BASSO, L. C. **Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation**. Biofuel Production – Recent Developments and Prospects. p. 85-100. 2011.

CAPORASO, J. Gregory et al. **Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample**. Pnas Early Edition, St. Louis, p.1-7, abr. 2010.

CAPORASO, J Gregory et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal**, 6 (8), p.1621-1624, ago. 2012.

CARVALHO-NETTO, Osmar Vaz de; ROSA, Daniel Dias; CAMARGO, Luis Eduardo Aranha.

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS CONTAMINANTES DE FERMENTO DE CACHAÇA POR SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S RDNA. Sci. Agric, Piracicaba, v. 65, n. 5, p.508-515, September/October 2008.

CHERUBIN, R. A. **Efeito da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, SP, Brasil, 2003.

FERNANDES JR, A. **Apostila: Bacteriologia Geral – Roteiro de práticas**. Unesp, Botucatu, 2011.

GARCIA, Eloi. **Metagenômica: uma nova revolução científica?** Disponível em:

<<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=980&sid=3&tpl=printerview>>. Publicado em: 10 maio 2007

GRUPO FARIAS. **Fluxo esquemático para fabricação de produtos derivados da cana-de-açúcar**.

Disponível em: <http://www.grupofarias.com.br/fluxograma_industrial_zoom.htm>. Acesso em 18 out. 2013.

EGUCHI, Silvia Y. **Ativos antimicrobianos utilizados na indústria**. Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação. 2010.

ESCALANTE, Adelfo; RODRÍGUEZ, María Elena; MARTÍNEZ, Alfredo. Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. **Fems Microbiology**, n. 235, p.273-279, abr. 2004.

JURKOWSKI, A. & HANDELSMAN, J. **Metagenomics: window to the microbial universe**. Nature Review Microbiology, 2007. Disponível em: <http://dels.nas.edu/resources/static-assets/materials-based-on-reports/special-products/metagenomics_poster_final.pdf>

MACEDO, Jorge Antônio Barros de et al. **FORMAÇÃO DE TRIHALOMETANOS EM SOLUÇÕES SANIFICANTES UTILIZADAS NO PROCESSO DE DESINFECÇÃO DE INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO**. Disponível em:

<<http://www.sanepar.com.br/sanepar/sanare/v17/FORMACAODETRihalometanos.htm>>. Acesso em: 10 out. 2013.

MARQUES, Milena Zonzini. **IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS CONTAMINANTES DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL EM USINAS SUCROALCOOLEIRAS**. 2011. 53 f. Monografia - Curso de Engenharia Biotecnológica, Unesp, Assis, 2011.

MASSAGUER, Pilar Rodriguez. **Bactérias Láticas**. Disponível em:

<https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.fea.unicamp.br%2Fservicos%2Fmaterias%2Fta718%2FTA_603%2FTA-603_Bacterias_Lacticas.doc&ei=7rKLUsqxNo-p4AP96YDAAQ&usg=AFQjCNECDdSZ5dFQj1E1dsGd7LdPNgLBw&sig2=W145WP8ZDw0qgFJi0VKK1g&bvm=bv.56643336,d.dmg>. Acesso em: 1 out. 2013.

MORAIS, Meline Rezende. **“Estudo sobre interações entre leveduras *Saccharomyces cerevisiae* nas fermentações em batelada alimentada em altas temperaturas.”**. 2013. 134 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2013.

MUTTON, Márcia Justino Rossini. **“Reflexos da qualidade da matéria-prima sobre a fermentação etanólica”** In: WORKSHOP SOBRE “PRODUÇÃO DE ETANOL: QUALIDADE DE MATÉRIA-PRIMA”. Lorena, 2008. 15 p.

NAVES, Raquel Ferreira. **CONTAMINAÇÃO MICROBIANA NAS ETAPAS DE PROCESSAMENTO E SUA INFLUÊNCIA NO RENDIMENTO FERMENTATIVO EM USINA ALCOOLEIRA**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 6, n. 11, p.1-16, 2010.

NOBRE, Thais de Paula; HORII, Jorge; ALCARDE, André Ricardo. **Cellular viability of *Saccharomyces cerevisiae* cultivated in association with contaminant bacteria of alcoholic fermentation**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27 (1), 20-25, jan./mar. 2007

PASCHOALINI, Glauce; ALCARDE, Valmir Eduardo. Estudo do Processo Fermentativo de Usina Sucroalcooleira e Proposta para sua Otimização. **Revista de Ciência & Tecnologia**, Piracicaba, v. 16, n. 32, p.59-68, jul./dez. 2009.

ROSSEL, Carlos Eduardo Vaz. **“Produção de Etanol de Cana-de-açúcar. Qualidade da matéria-prima”** In: I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol. Lorena, 2006.

SILVA, Greice Kelly Cardoso da. **AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE DIFERENTES ANTIBIÓTICOS SOBRE O CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS CONTAMINANTES DO PROCESSO FERMENTATIVO PARA A OBTENÇÃO DO ETANOL**. 2010. 51 f. TCC (Graduação) - Curso de Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2010.

SILVA, Mário César Souza e. **DIÓXIDO DE CLORO MONITORAMENTO DE SUA UTILIZAÇÃO**. Disponível em: <www.mcdesinfeccaoindustrial.com.br>. Acesso em: 09 out. 2013.

SIMON, Carola; DANIEL, Rolf. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 4, n. 77, p.1153-1161, fev. 2011.

STACKEBRANDT, Erko et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, 52, p.1043-1047, mar. 2002.

UNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Exportação de etanol por estado brasileiro**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em 2 set. 2013.

VALSEQUI, O. A. **Perdas no Processo: Do campo à Indústria**. Curso teórico e Prático da Fermentação Etanólica. Unesp/Ufscar, 2006.

VIEIRA, D. P. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações**. Laboratório de Biologia molecular – IPEN, 2005. Disponível em: <http://www.fea.br/Arquivos/Biotecnologia/Material%20Profª%20Cristina%20-%20Biologia%20Celular/Principios_da_PCR.pdf>. Acesso em 4 ago. 2013.

ANEXO

ANEXO 1 – Representação gráfica do fluxograma da produção de etanol

