

# Biofilmes em Processos Industriais de Produção de Etanol: Ênfase Para a Presença de Bactérias Gram-Negativas

\*NÁDIA CRISTINA VIANA

\*\*MARIO LÚCIO LOPES

\*SANDRA HELENA DA CRUZ

\*ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ” – ESALQ/USP

\*\*FERMENTEC, PIRACICABA, SÃO PAULO, SP, BRASIL

## Resumo

A produção de etanol no Brasil é baseada na utilização de caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço como substrato, fermentado por diferentes linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A utilização destes substratos permite a entrada de bactérias contaminantes na fermentação alcoólica, bactérias estas que competem com as leveduras, afetando o rendimento fermentativo e gerando perdas econômicas para as unidades produtoras de etanol. Estes microrganismos contaminantes formam biofilmes, que são estruturas que proporcionam a formação de comunidades bacterianas, agem como barreira de proteção contra fatores estressantes do meio e, principalmente, impedem a ação de antibióticos. A maior parte das contaminações é causada por bactérias Gram-positivas, entretanto, tem sido encontradas, nos biofilmes, bactérias Gram-negativas. Nos casos de contaminação, onde são detectadas bactérias Gram-negativas, os tratamentos tradicionais, uso de ácido e antibiótico, não surtem efeito, já que estes atuam principalmente em bactérias Gram-positivas. Controlar o aparecimento de uma linhagem Gram-negativa resistente é um desafio, devido à falta de informações sobre estratégias eficazes, o que pode acarretar perdas econômicas impactantes. Neste contexto, esta revisão busca detalhar o perfil das contaminações bacterianas Gram-negativas que acometem a produção industrial de etanol, a fim de que os envolvidos no setor sucroenergético possam considerar este aspecto da contaminação bacteriana.

**Palavras Chave:** contaminação, bactérias gram-negativas, fermentação, etanol, biofilme

## Summary

The production of ethanol in Brazil is based on the use of sugarcane juice and / or molasses as a substrate, fermented by different strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The use of these substrates allows the entry of contaminating bacteria in the alcoholic fermentation, these bacteria compete with the yeasts, affecting the fermentative yield and generating economic losses for the ethanol producing units. These contaminating microorganisms form biofilms, which are structures that provide the formation of bacterial communities, act as a protective barrier against stressors of the environment and, mainly, prevent the action of antibiotics. Most of the contaminations are caused by Gram-positive bacteria, however, Gram-negative bacteria have been found in biofilms. In the event of contamination where Gram-negative bacteria are detected, traditional treatments,

such as acid washing and the use of antibiotics don't have the desired effect, since they're more effective against Gram-positive bacteria. Controlling the appearance of a resistant Gram-negative strain is a challenge due to the lack of information about effective strategies, which can lead to shocking economic losses. In this context, this review seeks to detail the profile of Gram-negative bacterial contaminations that affect industrial ethanol production, so that those involved in the sugar-energy sector can consider this aspect of bacterial contamination.

**Keywords:** contamination, gram-negative bacteria, fermentation, ethanol, biofilm

## Introdução

A contaminação bacteriana em processo fermentativo é um problema persistente e um desafio econômico para a indústria do bioetanol, em particular na produção de etanol combustível, devido à dificuldade em higienizar grandes volumes de mosto, composto por caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço diluído e manter condições estéreis (Amorim *et al.*, 2011; Bischoff *et al.*, 2008).

O Brasil é um dos grandes produtores de etanol combustível do mundo, aumentando constantemente sua produção; nas três últimas décadas atingiu rendimentos na ordem de 90-92% (Andrietta *et al.*, 2006; Lopes *et al.*, 2016). Atualmente, o processo mais utilizado no Brasil para obtenção de etanol utiliza a cana-de-açúcar em um processo descontinuo alimentado, ou *Melle-Boinot*, cuja maior vantagem é a recuperação do fermento do vinho por meio de centrifugação, sendo o fermento utilizado para um novo ciclo fermentativo. Este processo é utilizado em 85% das destilarias nacionais (BNDS, CGEE, 2008; CGEE, 2009).

A partir da implantação do Protocolo Agroambiental, em 2007, a colheita manual da cana-de-açúcar vem sendo substituída pela colheita mecanizada, sem a queima da cana no campo (UNICA, 2013). A região Centro-Sul é responsável por 93% da cana-de-açúcar moída no país, na qual se destaca o Estado de São Paulo, onde a colheita mecanizada da cana-de-açúcar está próxima a 100% (Leal, 2017).

Idealmente, a cana colhida mecanicamente seria introduzida na usina livre de impurezas, porém a realidade observada é um aumento na quantidade de impurezas vegetais e minerais, incluindo

resíduos de palha, ponteiras e folhas verdes (Gimenez *et al.*, 2016). Estas impurezas transportam contaminações bacterianas, mudando o perfil das comunidades formadoras de biofilmes encontradas na fermentação (Benedini *et al.*, 2008). Uma das principais fontes de contaminantes do caldo de cana-de-açúcar utilizado na fermentação é o solo, onde são encontradas um bilhão de células de bactérias para cada uma grama de amostra de solo (Lopes *et al.*, 2016).

Embora a indústria produtora de etanol venha demonstrando preocupação com as alterações na qualidade da matéria-prima, e como isto impacta diretamente o rendimento fermentativo, pouco tem sido explorado quanto as contaminações bacterianas decorrentes desta mudança (Leal, 2017).

Contaminações bacterianas graves ocorrem de maneira imprevisível, podendo ocasionar paradas forçadas na produção para limpeza dos equipamentos e substituição total ou parcial do inóculo, pois os subprodutos destes contaminantes, como os ácidos acético e láctico, levam a fermentações lentas e inibem o desempenho da levedura, ocasionando perdas econômicas de grandes proporções (Bischoff *et al.*, 2008; Narendranath *et al.*, 1997).

Neste contexto, se faz necessária a compreensão do perfil das contaminações bacterianas que acometem a produção industrial de etanol, para que o produtor tenha acesso a informações precisas e tecnologias de controle biológico mais adequados.

#### DIVERSIDADE MICROBIANA EM FERMENTAÇÕES INDUSTRIALIS

A microbiota encontrada nas fermentações industriais é diversa, e em grande parte dos casos é detectada a presença de mais de uma levedura nativa (sendo estas pertencentes ao gênero *Saccharomyces* ou não), altamente competitiva, que estabelece dominância ou age em consórcio com a linhagem comercial (Pallman, 2001; Mussatto *et al.*, 2010; Amorim, 2005; Beato *et al.*, 2016; Viana *et al.*, 2017).

No entanto, os principais agentes contaminantes encontrados em unidades produtoras de etanol são as bactérias, principalmente as Gram-positivas, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, entre outros. Estes agentes contaminantes são expressivos, desenvolvendo estratégias de sobrevivência e competição para se estabelecerem na fermentação alcoólica (Amorim *et al.*, 2011; Lucena *et al.*, 2010; Murphree *et al.*, 2014).

Embora a maior parte das contaminações seja causada por bactérias Gram-positivas, também, são encontradas em biofilmes bactérias Gram-negativas. Nestes casos são encontrados os gêneros *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Komagataebacter*, *Pseudomonas*, entre outros. Estes grupos de bactérias, embora menos frequente nos processos fermentativos, é de difícil controle (Andrietta *et al.*, 2006; Amorim *et al.*, 2011).

Bactérias produzem os ácidos acético (Gram-negativas) e láctico (Gram-positivas), responsáveis pela diminuição do rendimento e queda na viabilidade celular de leveduras *S. cerevisiae*, ultrapassando facilmente a população de leveduras devido a sua rápida velocidade de crescimento e tolerância aos fatores inibidores (Alcarde *et al.*, 2007; Schell *et al.*, 2007).

Convém ressaltar que grande parte destas contaminações bacterianas tem como origem comunidades preestabelecidas através da formação de biofilme, que engloba uma cadeia de interações complexas. Biofilmes apresentam um papel importante na limitação da ação de antibióticos (Rich *et al.*, 2011), porém nem todas as linhagens encontradas nestas comunidades são resistentes.

#### BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVAS

As bactérias são classificadas em Gram-positivas e negativas de acordo com a composição de sua parede celular, formada por um complexo macromolecular, conhecido como mucocomplexo, sendo este menos abundante em bactérias Gram-negativas em comparação com as Gram-positivas. A parede celular de bactérias Gram-negativas é quimicamente mais complexa, possuindo maior quantidade de aminoácidos e lipídeos (Jawetz *et al.*, 2009). Estas características são identificadas por meio da técnica de Coloração de Gram, cujo composto é absorvido pelas bactérias Gram-positivas, que adquirem coloração roxa, em oposição as Gram-negativas, que adquirem coloração vermelha (Gregsen, 1978).

As bactérias encontradas mais frequentemente em processos industriais, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, entre outros, apresentam característica Gram-positivas e as bactérias pertencentes ao gênero *Enterobacter* e *Acetobacter* apresentam característica Gram-negativas (Murphree *et al.*, 2014). Ocionalmente ocorrem casos de contaminação onde as linhagens dominantes e melhor adaptadas são bactérias Gram-negativas. Bactérias com esta característica são resistentes a diversos antibacterianos utilizados nas indústrias, que tem eficácia comprovada contra bactérias Gram-positivas (Heist, 2009). As bactérias Gram-negativas afetam, consideravelmente, o rendimento da produção de etanol, convertendo álcool em ácido acético e promovendo a acidificação do meio; e, portanto, diminuindo a viabilidade das leveduras e causando queda no rendimento fermentativo (Lopes *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2016; Muthaiyan e Ricke, 2009). Bactérias do gênero *Acetobacter* são descritas como contaminantes comuns, mesmo não sendo capazes de crescer sem a presença de oxigênio (Lushia e Heist, 2005; Heist, 2009).

Bactérias acéticas Gram-negativas, como *Aerobacter*, *Acetobacter*, *Acetomonas*, *Obesumbacterium* e *Zymomonas*, são extremamente resistentes às ações inibitórias de lúpulos e derivados, e também do etanol. Além disto, possuem necessidades nutricionais simples, o que promove o estabelecimento de linhagens mais adaptadas que crescem em ambientes fermentativos; isto é uma das causas mais comuns de acidez e potencial causadora da morte de leveduras (Muthaiyan *et al.*, 2010; Muthaiyan e Ricke, 2009).

Ainda, convém considerar que bactérias Gram-negativas como *Enterobacter cloacae*, *Erwinia herbicola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter vinelandii*, *Paenibacillus polymyxa*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *Acetobacter diazotrophicus* são colonizadoras da rizosfera da cana-de-açúcar e de seus tecidos internos, sendo responsáveis pela fixação de nitrogênio (Cavalcante e Dobereiner, 1988; Olivares *et al.*, 1996). Algumas destas bactérias possuem marcadores genéticos ligados a produção de enzimas relacionadas ao mecanismo de utilização de sacarose como fonte

de carbono que as tornam simbióticas com a cana-de-açúcar, mecanismo este observado em bactérias Gram-negativas (Arrieta *et al.*, 1996).

Estudos vem isolando, com sucesso, bactérias ácido-acéticas diretamente de amostras de cana-de-açúcar e do solo desta cultura, demonstrando a relação endofítica entre a planta e os micro-organismos (Arifuzzaman *et al.*, 2014; Fuentez-Ramirez *et al.*, 1998).

Vale ressaltar que a mudança recente da matéria-prima sendo introduzida na usina, por conta da mecanização da colheita, tem impactado diretamente na mudança da microbiota encontrada nos biofilmes contaminantes já que a queimada da cana-de-açúcar agia como um agente inibidor das bactérias endofíticas.

### BIOFILMES CONTAMINANTES

As bactérias são responsáveis pela formação de biofilmes, películas que se associam a uma superfície e formam um microambiente favorável à permanência dos microrganismos de maneira eficiente (Watnick; Kolter, 2000). Este mecanismo gera proteção das células contra condições estressantes, e permite trocas genéticas e interações entre os microrganismos, garantindo a evolução microbiana destas comunidades (McLean, 2002; Brexó e Sant'ana, 2017). Estes biofilmes podem ser compostos por uma, ou múltiplas espécies, formando micro ecossistemas complexos envolvidos por uma camada polimérica secretada, contendo primariamente exopolissacarídeos, sendo encontrados em superfícies bióticas ou abióticas (Dunne, 2002; McLean, 2002).

Os biofilmes estão diretamente associados a contaminações persistentes e de difícil controle, apresentando resistência a procedimentos de limpeza e de controle biológico, e resultando na inibição do rendimento fermentativo, floculação e alteração na morfologia de células de leveduras (Rich *et al.*, 2015; Brexó e Sant'ana, 2017). Os mecanismos de proteção dos biofilmes impactam diretamente a suscetibilidade de bactérias a controles biológicos, presumidamente pela diminuição do poder de penetração de antibióticos nas camadas poliméricas extracelulares, entre outros fatores dependentes da composição da comunidade bacteriana (Davenport *et al.*, 2014).

O sistema de reciclo de células de levedura e a formação de biofilmes atuam como reservatórios de bactérias altamente adaptadas e resistentes, que são continuamente introduzidas nos ciclos fermentativos (Skinner e Leathers, 2004). Este sistema de reciclo, embora seja uma medida de controle, acaba agindo como uma ferramenta de seleção para bactérias que apresentem resistência, permitindo sua perpetuação nas comunidades bacterianas.

### ESTRATÉGIAS DE CONTROLE

As estratégias de controle de contaminação bacteriana envolvem tratamento ácido do creme de levedura e a adição de antibióticos e biocidas químicos e naturais, como α-ácidos derivados, nas dornas da fermentação, os quais não afetam o desempenho das leveduras. Porém, algumas bactérias, em particular as Gram-negativas, apresentam resistência a tais métodos de controle, chegando em casos extremos de contaminação a ocasionar perdas de cerca

de 10.000 a 30.000 litros de etanol por dia (Amorim *et al.*, 2011). Além do impacto no rendimento, as contaminações bacterianas prejudicam o metabolismo das leveduras, ocasionando floculação e, portanto, inibindo o desempenho fermentativo (Beato *et al.*, 2016). Pesquisas com antibióticos e agentes antimicrobianos em culturas mistas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas mostraram que a estreptomicina, bacitracina, terramicina, penicilina, e clorotetraciclina apresentaram eficácia, com a exceção de algumas linhagens Gram-negativas (Muthaiyan *et al.*, 2010; Strandskov *et al.*, 1956). Atualmente, os antimicrobianos mais utilizados são a base de virginiamicina, monensina e α-ácidos (Lopes *et al.*, 2016).

### ESTUDOS DE CASO: perfil de contaminações por bactérias Gram-negativas em processos industriais

Biofilmes contaminantes da fermentação alcoólica em escala industrial, de acordo com o estudo de Dellias (2014), mostrou que estas comunidades são compostas principalmente por bactérias formadoras de ácido láctico (LAB), predominantemente do gênero *Lactobacillus*, encontrando ainda cerca de 10% de bactérias Gram-negativas, como *Acetobacter*, *Burkholderia*, *Komagataeibacter* e *Pseudomonas*. Os resultados mostram, ainda, a presença de leveduras nestas comunidades microbianas, caracterizando biofilmes mistos. Dellias *et al.* (2018) concluiu que a suscetibilidade destes microrganismos a agentes antimicrobianos é dependente de linhagens e, em alguns casos, relacionado ao local de coleta das amostras.

Uma linhagem de *Enterobacter cloacae* foi isolada em uma unidade americana produtora de etanol, que apresentou altos níveis de resistência a antibióticos utilizados comumente em dornas fermentadoras. A utilização da análise por PCR (*polymerase chain reaction*) revelou que esta linhagem possui genes responsáveis pela resistência a penicilina e eritromicina, permitindo sua persistência em comunidades de biofilme apesar da utilização de métodos de controle rotineiros (Murphree *et al.*, 2014).

Outro estudo de caso publicado pela empresa Fermentec Ltda. descreve uma situação de contaminação bacteriana na qual as técnicas tradicionais de controle biológico não foram eficazes, sendo identificada a presença dominante de bactérias Gram-negativas. Aproximadamente 80% do total de bactérias encontradas nas amostras foram identificadas como *Acetobacter pasteurianus*. Este caso, em particular, resultou em perdas de rendimento fermentativo na ordem de 30%, juntamente com a inibição das leveduras e queda na viabilidade. Por fim, não foi possível restaurar o rendimento pelo uso de antibióticos, visto que a grande maioria dos métodos disponíveis apresenta melhor resultado contra bactérias Gram-positivas, sendo assim, foi necessária a substituição total do inoculo a fim de reestabelecer o rendimento industrial (Lopes *et al.*, 2004). O controle da contaminação microbiana em ambiente industrial é complexo, pois requer o equilíbrio entre a preservação do rendimento, cuidados com a geração de resíduos, por conta dos antibióticos, e principalmente, a compreensão do ecossistema industrial (Eguchi, 2007). Estudos com métodos de controle alternativos, como enzimas

provenientes de *Bacillus subtilis* mostraram resultados satisfatórios no controle da formação de biofilmes, porém tal método ainda não foi testado nas condições industriais brasileiras (Leathers *et al.*, 2014).

O potencial e escala das contaminações por bactérias Gram-negativas ainda é desconhecido, portanto é indispensável compreender as interações entre estas comunidades microbianas, bem como os fatores que contribuem para a disseminação e seleção natural de microrganismos adaptados ao ambiente industrial e agentes inibidores (Madaleno e Caetano, 2011; Murphree *et al.*, 2014).

## Considerações finais

Os estudos, como o de Dellias (2014), Fermentec (Lopes *et al.*, 2004) e Murphree *et al.* (2014), sugerem que, embora se originem de um problema comum, casos de contaminação bacteriana, possuem características particulares, o que reforça a necessidade de expandir os estudos e as tecnologias de controle disponível para a indústria do bioetanol. Para que seja possível uma melhor compreensão sobre estas bactérias, é necessário que os produtores de etanol estejam atentos à formação de biofilmes nos fermentadores.

Estes dados enfatizam a capacidade de bactérias Gram-negativas em contaminar e prejudicar fermentações alcoólicas, sendo necessários estudos aprofundados da ecologia microbiana encontrada nestes ambientes.

Lidar com o surgimento de uma linhagem Gram-negativa resistente é um desafio, já que as estratégias de controle biológico têm foco principal em bactérias Gram-positivas. Portanto, isolar e identificar os componentes da comunidade bacteriana Gram-negativa encontrada nos biofilmes é de suma importância para aperfeiçoar as medidas de controle biológico e garantir o sucesso do rendimento na produção de etanol.

## Referências bibliográficas

- ALCARDE, A.R.; HORII, J.; NOBRE, T.P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*. Campinas, v. 27, n.1, p. 20-25, 2007.
- AMORIM, H.V. *Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia*. São Paulo: Fermentec, 2005. 448p.
- AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 91, p. 1267-1275, July 2011.
- ANDRIETTA, M.G.S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S.R. *Bioetanol*: Brasil, 30 anos na vanguarda. In: MULTICIÊNCIA: CONSTRUINDO A HISTÓRIA DOS PRODUTOS NATURAIS, 2006, Campinas. Anais Campinas: UNICAMP, 2006. p.1-16.
- ARRIETA, J.; HERNÁNDEZ, L.; COEGO, A.; SUÁREZ, V.; BALMORI, E.; MENÉNDEZ, C.; PETIT-GLATRON, M.; CHAMBERT, R.; SELMAN-HOUSEIN, G. Molecular characterization of the levansucrase gene from the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus* SPT4. *Microbiology*, v.142, p.1077-1085, 1996.
- ARIFUZZAMAN, Md.; HASAN, Z.; RAHMAN, B.; PRAMANIK, K. Isolation and characterization of *Acetobacter* and *Gluconobacter* spp from sugarcane and rotten fruits. *Research and Reviews in Biosciences*, v.8, n.9, p.359-365, 2014.
- BEATO, F.B.; BERGDAHL, B.; ROSA, C.A.; FORSTER, J.; GOMBERT, A.K. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Brazilian biomes: new insights into biodiversity and industrial applications. *FEMS Yeast Research*, v.16, n.7, 2016.
- BNDES. CGEE. *Bioetanol da cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável*. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 316 p.
- BENEDINI, M.S., BROD, F.P.R., PERTICARRARI, J.G. Perdas de cana e impurezas vegetais e minerais na colheita mecanizada. *Revista Coplana*, 2008.
- BISCHOFF, K.M.; LIU, S.; LEATHERS, T.D. *et al.* Modeling Bacterial Contamination of Fuel Ethanol Fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, v.103, n.1, 2008.
- BREXÓ, R.P.; SANT'ANA, A.S. Microbial interactions during sugar cane must fermentation for bioethanol production: does quorum sensing play a role? *Critical Reviews in Biotechnology*, Jun 2:1-14. doi: 10.1080/07388551.2017.1332570. [Epub ahead of print], 2017.
- CAVALCANTE, V.A.; DOBEREINER J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, v.108, p.23-31, 1988.
- CGEE. CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. *Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil*. Brasília, DF: CGEE, 2009. 536p.
- DAVENPORT, E. K.; CALL, D. R.; BEYENAL, H. Differential Protection from Tobramycin by Extracellular Polymeric Substances from *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.58, n.8, p.4755-4761, 2014. <http://doi.org/10.1128/AAC.03071-14>
- DELLIAS, M.T.F. *Comunidade bacteriana dos biofilmes da fermentação alcoólica*: estrutura, composição, suscetibilidade aos antimicrobianos e formação de biofilmes em culturas puras. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. P. 97, 2014.
- DELLIAS, M.T.F.; BORGES, C.D.; LOPES, M. L.; CRUZ, S.H.; AMORIM, H.V.; TSAI, S.M. Biofilm formation and antimicrobial sensitivity of lactobacilli contaminants from sugarcane-based fuel ethanol fermentation. *ANTONIE VAN LEEUWENHOEK*, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1050-8> [Epub ahead of print]
- DUNNE, W.M. Bacterial adhesion: see any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, n.2, p.155-166, 2002.
- EGUCHI, J.Y. Ativos antimicrobianos utilizados na indústria. *Revista Sociedade Brasileira de Controle de Contaminação*, São Paulo, n.22, p.35-39, 2007.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPÚLVEDA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*, v.29, p.117-128, 1999.
- GIMENEZ, A.Z.; FRANZÉ, R.V.; MADALENO, L.L. Teores de impurezas vegetais e a concentração do amido no caldo de cana. *Ciência & Tecnologia: FATEC-JB*, v.8, n.1, p.42-54, 2016.
- GREGERSEN, T. Rapid method for distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *European Journal of applied microbiology and biotechnology*, v.5, p.123, 1978.
- HEIST, P. Identifying, controlling the most common ethanol contaminants. *Ethanol Producer Magazine*. Disponível em: <<http://www.ethanolproducer.com/articles/5464/identifying-controlling-the-most-common-microbial-contaminants/>> Acesso em: 19 jul. 2017.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica*. 24. ed., McGraw-Hill Medical, 2009. 820p.
- LEAL, M.R.L.V. O impacto na indústria com a mecanização da colheita. ÚNICA, 2017. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/convocados/17601337920329114090/o-impacto-na-industria-com-a-mecanizacao-da-colheita/>> Acesso em: 21 fev. 2017.
- LEATHERS, T. D. *et al.* Inhibitors of biofilm formation by biofuel fermentation contaminants. *Bioresource Technology*, v.169, p. 45-51, 1 out. 2014.
- LOPES, M.L.; PAULILLO, S.C.; GODOY, A.; CHERUBIN, R.A.; LORENZI, M.S; *et al.* Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. *Brazilian Journal of Microbiology*. V. 47, p. 64-76, 2016.
- LOPES, M.L.; AMORIM, L.C.; GODOY, A.; OLIVEIRA, A.J.; CHERUBIN, R.; BASSO, L.C. Interaction Between Yeast and Acetic Acid Bacteria in Industrial Fermentation for Ethanol Production: A Case Study. *Fermentec*, 2004.
- LUCENA, B.T.L.; SANTOS, B.M.; MOREIRA, J.L.S.; MOREIRA, A.P.B.; NUNES, A.C.; AZEVEDO, V.; MIYOSH, A.; THOMPSON, F.L.; MORAIS JR, M.A. Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiology*, v. 10, p. 298, 2010.
- LUSHIA, W.; HEIST, P. Antibiotic resistant bacteria in fuel ethanol fermentation. *Ethanol Producer Magazine*, p.80-82, 2005.
- MADALENO, L.L.; CAETANO, A.C.G; Controle de contaminantes na fermentação alcoólica com a aplicação de biocidas naturais. *Ciência e Tecnologia: FATEC-JB*, v.2, n.1, p.27-37, 2011.
- MCLEAN, R.J.C. An overview of biofilm molecular ecology. In: McLean, R.J.C.; Decho, A.W. (Ed) *Molecular ecology of biofilms*. Norfolk: Horizon Scientific Press, 2002. Cap.1, p.1-21.
- MURPHREE, C.A.; LI, Q.; HEIST, E.P.; MOE, L.A. A Multiple Antibiotic-Resistant *Enterobacter cloacae* Strain Isolated from a Bioethanol Fermentation Facility. *Microbes and Environment*, v.29, n.3, p.322-325, 2014.
- MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P.M.R.; SILVA, *et al.* Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 817-830, 2010.
- MUTHAYIAN, A.; RICKE, S.C. Current perspectives on detection of microbial contamination in bioethanol fermenters. *Bioresources Technology*, v.101, p.5033-5042, 2009.
- MUTHAYIAN, A.; LIMAYEM, A.; RICKE, S.C. Antimicrobial strategies for limiting bacterial contaminants in fuel bioethanol fermentations. *Progress in Energy and Combustion Science*, v.37, p.351-370, 2010.
- NARENDRANATH, N. V.; HYNES, S. H.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of Lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 11, p. 4158-4163, 1997.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M. *et al.* Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, v.21, p.197 -200, 1996.
- PALMANN, C.L. Use of WL medium to profile native flora fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 58, p. 198-203, 2001.
- RICH, J.O.; LEATHERS, T.D.; BISCHOFF, K.M.; ANDERSON, A.M.; NUNNALLY, M.S. Biofilm formation and ethanol inhibition by bacterial contaminants of biofuel fermentation. *Bioresource Technology*, v.96, p.347-54, 2015. doi: 10.1016/j.biortech.2015.07.071
- RICH, J. O. *et al.* Rapid evaluation of the antibiotic susceptibility of fuel ethanol contaminant biofilms. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 2, p. 1124–1130, 1 jan. 2011.
- SCHELL, D.J.; DOWE, N.; IBSEN, K.N.; RILEY, C.J.; RUTH, M.F.; LUMPKIN, R.E. Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. *Bioresource Technology*, v.98, 2007.
- SKINNER, K.A.; LEATHERS, T.D. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.31, p.401-408, 2004.
- STRANDSKOV, F.B.; BOCKELMANN, J.B. Bacterial contaminants, effect of brewer's yeast strain on *Flavobacterium proteus* contaminants of brewery fermentations. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v.4, p.945, 1956.
- ÚNICA, Colheita mecanizada de cana produz queda nas emissões de gases causadores do efeito estufa. 2013. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/38156175920320868796/colheita-mecanizada-de-cana-produz-queda-nas-emissoes-de-gases-causadores-do-efeito-estufa/>> Acesso em: 23 jul. 2017.
- VIANA, N.C.; PORTUGAL C.; DA CRUZ, S.H Morphophysiological and molecular characterization of wild yeast isolates from industrial ethanol process. *African Journal of Microbiology Research*, v.11, p.1422-1430, 2017.
- WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*, v.182, n.10, p.2675-2679, 2000.