

## COMPARAÇÃO ENTRE OS MEIOS DE CULTURA PARA CONTAGEM DE FUNGOS NO CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE ERVA-MATE

KATIA ELISA SAATKAMP LAZARETTI \*

MARCIA REGINA BEUX \*\*

IDA CHAPAVAL PIMENTEL \*\*\*

ANELISE TALAMINI \*\*\*\*

JUAREZ GABARDO \*\*\*\*\*

A contagem de bolores e leveduras é uma das análises realizadas no controle de qualidade de alimentos com intuito de estimar a vida útil de determinado produto alimentício. Embora considerada indicadora de contaminação, quantificar estes fungos é fundamental na avaliação da qualidade de produtos armazenados, principalmente cereais e preparados para infusões, em virtude do potencial micotoxigênico de algumas espécies de bolores. O presente trabalho teve por objetivo comparar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de fungos, obtidas a partir de três marcas de erva-mate, semeadas em quintuplicata em ágar batata dextrosado, ágar dicloran rosa de bengala cloranfenicol e meio para bolores e leveduras - SIMPLATE. O ágar batata dextrosado e o ágar dicloran rosa de bengala cloranfenicol são rotineiramente empregados em laboratórios de análise, necessitando após inoculação, de cinco dias para leitura dos resultados. O meio para bolores e leveduras - SIMPLATE é um método novo, baseado na atividade metabólica, que permite efetuar a leitura em dois dias após a inoculação, reduzindo significativamente o prazo analítico. Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância e Teste de Tukey. Na prática laboratorial o melhor método é aquele que recupera maior número de unidades formadoras de colônias (UFC). Na amostra que apresentou contagem de até 10.000 UFC/g não se constatou diferença significativa entre os meios de cultura testados, porém nas amostras com contagens superiores a 10.000 UFC/g o ágar dicloran rosa de bengala cloranfenicol e o meio para bolores e leveduras - SIMPLATE revelaram-se estatisticamente mais eficazes que o ágar batata dextrosado.

\* Aluna do Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná (UFPR).

\*\* Mestre em Tecnologia de Alimentos, Coordenadora do Laboratório de Alimentos, Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA).

\*\*\* Professora de Microbiologia Básica, Departamento de Patologia Básica, UFPR.

\*\*\*\* Bióloga responsável pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos, CEPPA.

\*\*\*\*\* Professor, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, UFPR.

## 1 INTRODUÇÃO

A contagem de bolores e leveduras é uma das análises realizadas no controle de qualidade de alimentos, com o intuito de estimar a validade de determinado produto alimentício. A presença excessiva destes microrganismos resulta na deterioração ou redução da vida útil do alimento. Embora considerados indicadores de contaminação, quantificar estes fungos é fundamental para avaliar a qualidade de produtos armazenados, principalmente cereais e preparados para infusão como, por exemplo, a erva-mate, em virtude do potencial micotoxigênico de algumas espécies de bolores.

Em alimentos, os fungos são considerados microrganismos que não oferecem risco direto à saúde, apesar de algumas espécies de bolores serem produtoras de micotoxinas julgadas prejudiciais ao homem. Com relação às leveduras, a ocorrência de espécies patogênicas em alimentos é praticamente desconhecida, sua importância reside muito mais no fato de serem eventuais agentes de deterioração (LEITÃO, 1988).

Os bolores revelaram notável capacidade de adaptação e crescimento sob condições extremamente variáveis, desta forma, qualquer produto alimentício está sujeito a deterioração pelo crescimento destes organismos, desde que haja contato com o ambiente atmosférico (LEITÃO, 1988). Os métodos tradicionais utilizados na quantificação destes microrganismos permitem contar as unidades formadoras de colônias, partindo-se do princípio de que cada célula microbiana presente em determinada amostra irá formar, quando fixada em meio sólido adequado, uma colônia visível e isolada (SILVA e JUNQUEIRA, 1995).

Os fungos por serem aeróbios, preferencialmente são inoculados na superfície do meio de cultura, podendo ser utilizado, em alguns casos, o método de plaqueamento em profundidade. Os meios de cultura, rotineiramente, utilizados em laboratório de análise de alimentos são o ágar batata dextrosado, acidificado com solução de ácido tartárico 10% para obter pH em torno de 3,5, o que inibe o crescimento de bactérias (DIFCO MANUAL, 1984) e o ágar dicloran rosa de bengala cloranfenicol, cuja presença de dicloran e rosa de bengala reduzem o diâmetro das colônias de bolores e o cloranfenicol inibe o crescimento de bactérias presentes na amostra. Após a inoculação as placas devem ser incubadas durante cinco dias para permitir o desenvolvimento das colônias (KING et al., 1979).

Novo método analítico foi proposto pelo Simplate, baseado na atividade metabólica fúngica. O meio emite fluorescência quando enzimas do substrato são metabolizadas por bolores e leveduras, permitindo a contagem das colônias através da formação de fluorescência sob luz ultravioleta. O tempo de incubação é reduzido de cinco para dois dias,

permitindo a obtenção do resultado em menos da metade do tempo exigido pela análise convencional (CHEN et al.,1997).

O presente trabalho teve por objetivo comparar a eficiência de diferentes meios de cultura, ou seja, ágar batata dextrosado (BDA), ágar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC) e meio para bolores e leveduras – SIMPLATE, utilizados como substrato na contagem de fungos em alimentos.

Selecionou-se a erva-mate como alimento a ser testado por tratar-se de produto de exploração nativa na região Cone Sul, sendo consumida em grande escala na forma de infusão.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 PREPARO E PLAQUEAMENTO DAS AMOSTRAS**

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, sendo utilizadas três amostras de erva-mate adquiridas no comércio de Curitiba.

As amostras foram semeadas em quintuplicata pelo método de plaqueamento em superfície no ágar batata dextrosado e ágar dicloran rosa de bengala cloranfenicol e em profundidade no ágar batata dextrosado e no meio para bolores e leveduras - SIMPLATE, a partir de diluições seriadas.

No método de plaqueamento em superfície foi utilizado 0,1 mL de cada diluição e em profundidade 1 mL (SILVA e JUNQUEIRA, 1995).

Com exceção das placas inoculadas pelo método SIMPLATE, que foram incubadas a 30 °C por 48 horas, as demais foram incubadas a 25 °C por cinco dias.

### **2.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com repetições. Considerando que as amostras (3) representam os blocos e os métodos os tratamentos, com 5 repetições, obteve-se o total de 60 parcelas.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados do número de unidades formadoras de colônias obtidas em cada repetição encontram-se na Tabela 1.

**TABELA 1 - MÉDIA DOS RESULTADOS OBTIDOS NA CONTAGEM DE BOLORES E LEVEDURAS**

AMOSTRAS	REP	SIMP	BDA PP	BDA SUP	DRBC SUP
A	1	55600	16200	28100	57700
	2	47000	14600	30300	63600
	3	73800	14400	20800	60600
	4	62400	18000	30600	57900
	5	39200	14600	21500	34500
B	1	41400	12800	18300	37800
	2	28800	13400	21400	48000
	3	50800	10200	17700	25900
	4	37200	12000	14550	42900
	5	50800	14000	24700	30400
C	1	2480	3400	2950	4300
	2	2080	3300	4250	6050
	3	1200	3700	4800	5400
	4	1160	3900	4900	7050
	5	1460	3900	4850	7800

REP = Repetições; SIMP = Método SimPlate para bolores e leveduras; BDA PP = Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em profundidade; BDA SUP = Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em superfície; DRBC SUP = Ágar Dicloran Rosa de Bengala pelo método de plaqueamento em superfície.

Os dados relativos a análise de variância encontram-se na da Tabela 2. O valor absoluto das diferenças de médias de métodos, segundo a comparação e o bloco, encontram-se na Tabela 3.

**TABELA 2 - ANÁLISE DA VARIÂNCIA DOS DADOS APRESENTADOS NA TABELA 1. VALORES SIGNIFICATIVOS PARA F AO NÍVEL DE 1% INDICANDO QUE A EFICIÊNCIA DOS MÉTODOS É DIFERENTE ENTRE AS AMOSTRAS**

FATORES DE VARIAÇÃO	GL	SQ	QM	F
MÉTODOS	3	5831136553,3	1943712184,43	44,05**
AMOSTRAS	2	12232746630	6116373315	138,62**
INTERAÇÃO	6	3331430956,7	555238492,783	12,58**
RESÍDUO	48	2117961120	44124190	--
TOTAL	59	23513275260	--	--

GL = Grau de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = Quadrado médio; F = teste de F para hipótese.

**TABELA 3 - VALOR ABSOLUTO DAS DIFERENÇAS DE MÉDIAS DE MÉTODOS SEGUNDO A COMPARAÇÃO E O BLOCO**

COMPARAÇÕES (MÉTODOS)	AMOSTRA		
	A	B	C
SIMP-BDA PP	40040**	29320**	1964
SIMP-BDA SUP	29340**	22470**	2674
SIMP-DRBC SUP	740	4800	4444
BDA PP-BDA SUP	10700	6850	710
BDA PP-DRBC SUP	3930**	24520**	2480
BDA SUP-DRBC SUP	28600**	17670**	1770

SIMP = Método SimPlate para bolores e leveduras; BDA PP = Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em profundidade; BDA SUP = Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em superfície; DRBC SUP = Ágar Dicloran Rosa de Bengala pelo método de plaqueamento em superfície.

\*\* Valor da diferença de médias significativo.

A partir das Tabelas 4, 5 e 6 é possível afirmar que a eficiência dos métodos não deve ser generalizada.

**TABELA 4 - MÉDIAS DOS DIFERENTES MÉTODOS RELATIVOS A AMOSTRA A, ASSIM COMO A REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS EVENTUAIS DIFERENÇAS. MÉTODOS COM O MESMO SÍMBOLO NÃO APRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS**

Método	Médias	Relação entre médias
SIMP	55600	*
DRBC SUP	54860	*
BDA SUP	26260	**
BDA PP	15560	**

SIMP = Método SimPlate para bolores e leveduras; BDA PP = Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em profundidade; BDA SUP = Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em superfície; DRBC SUP = Ágar Dicloran Rosa de Bengala pelo método de plaqueamento em superfície.

Com base nos resultados estatísticos obtidos, se houvesse necessidade de nomear os métodos melhores, dir-se-ia que os métodos SimPlate e DRBC são igualmente eficientes em relação a amostra **A** e **B**. Entretanto, nenhum método destacou-se em eficiência quando se considera a amostra **C**.

**TABELA 5 - MÉDIAS DOS DIFERENTES MÉTODOS RELATIVOS A AMOSTRA B, ASSIM COMO A REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS EVENTUAIS DIFERENÇAS. MÉTODOS COM O MESMO SÍMBOLO NÃO APRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS**

Método	Médias	Relação entre médias		
<b>SIMP</b>	41800	*		
<b>DRBC SUP</b>	37000	*	**	
<b>BDA SUP</b>	19330		**	***
<b>BDA PP</b>	12480			***

SIMP = Método SimPlate para bolores e leveduras; BDA PP = Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em profundidade; BDA SUP = Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em superfície; DRBC SUP = Ágar Dicloran Rosa de Bengala pelo método de plaqueamento em superfície.

**TABELA 6 - MÉDIAS DOS DIFERENTES MÉTODOS RELATIVOS A AMOSTRA C, ASSIM COMO A REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS EVENTUAIS DIFERENÇAS. MÉTODOS COM O MESMO SÍMBOLO NÃO APRESENTAM DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS**

Método	Médias	Relação entre médias		
<b>DRBC SUP</b>	6120		*	
<b>BDA SUP</b>	4350		*	
<b>BDA PP</b>	3640		*	
<b>SIMP</b>	1676		*	

SIMP = Método SimPlate para bolores e leveduras; BDA PP = Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em profundidade; BDA SUP = Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em superfície; DRBC SUP = Ágar Dicloran Rosa de Bengala pelo método de plaqueamento em superfície.

Comparando as médias dos diferentes métodos, em relação as amostras (Tabela 7), verifica-se que as contagens obtidas para a amostra C sempre foram inferiores a 10.000 UFC/g.

Considerando-se que, na prática laboratorial, o melhor método é aquele que recupera maior número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), o método SimPlate distinguiu-se dos demais. Sua aplicação está relacionada à enzimas presentes no substrato, que são metabolizadas pela presença de bolores e leveduras na amostra e além disso o tempo de incubação pode ser reduzido a até 48 horas, segundo CHEN *et al.*, 1997. Entretanto, na prática, a visualização sob luz ultravioleta é dificultada quando se trata de amostra que apresenta partículas maiores, que

recobrem as cavidades impedindo a emissão de fluorescência, como no caso da erva-mate.

**TABELA 7 - MÉDIAS DOS DIFERENTES MÉTODOS RELATIVOS AS AMOSTRAS "A", "B" E "C"**

AMOSTRAS	SIMP	DRBC SUP	BDA SUP	BDA PP
A	55600	54860	26260	15560
B	41800	37000	19330	12480
C	6120	4350	3640	1676

SIMP = Método SimPlate para bolores e leveduras; BDA PP = Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em profundidade; BDA SUP = Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em superfície; DRBC SUP = Ágar Dicloran Rosa de Bengala pelo método de plaqueamento em superfície.

O método DRBC, apesar do tempo de incubação de cinco dias, permite melhor visualização das colônias devido as seguintes características: Rosa de Bengala, restringe o diâmetro das colônias de fungos, permitindo que colônias com crescimento lento também se desenvolvam; pH reduzido, que inibe a dispersão dos fungos; Dicloran, que auxilia na redução do diâmetro das colônias e Cloranfenicol, antibiótico que inibe o crescimento de outras bactérias presentes no experimento, conforme afirma KING *et al.*, 1979.

Entre todos os meios de cultura testados o BDA foi o que apresentou menor número de colônias. Segundo MISLIVEC *et al.* (1995), apesar do BDA acidificado ser o meio de cultura tradicionalmente utilizado na contagem de fungos, sua eficiência é inferior aos meios de cultura suplementados com antibióticos.

#### **4 CONCLUSÃO**

Apesar de constatada interação entre método e amostra, não houve diferença significativa entre os meios de cultura e métodos testados para a amostra que apresentou média das contagens inferior a 10.000 UFC/g. Entretanto, nas amostras com contagens superiores a 10.000 UFC o ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol e o meio para bolores e leveduras - SIMPLATE revelaram-se estatisticamente mais eficazes que o ágar batata dextrosado.

## Abstract

The mould and yeasts counting is one of the analyses accomplished in the control of quality of foods with an aim to estimate the useful life of certain nutritious product. Although considered indicative of contamination, to quantify these fungi is fundamental in the evaluation of the quality of stored products, mainly cereals and prepared for infusions, by virtue of the toxicant potential of some mould species. The present work had for objective to compare the number of forming colonies units (FCU) of fungi, obtained from three "mate" marks, sowed five fold in potato dextrose agar, dichloran-rose-bengal medium and medium for mould and yeasts - SIMPLATE. The potato dextrose agar and the dichloran-rose-bengal medium are routinely employed in analysis laboratories, needing after inoculation, of five days for reading of the results. The medium for mould and yeasts - SIMPLATE is a new method, based on the metabolic activity, that allows to make the reading in two days after the inoculation, reducing the analytic period significantly. The obtained results were appraised statistically by means of the variance analysis and Test of Tukey. In the laboratory practical the best method is that which recovers larger number of forming colonies units (FCU). In the sample that presented counting of up to 10.000 UFC/g significant difference was not verified among the tested culture mediums, even so in the samples with superior counting to 10.000 UFC/g the dichloran-rose-bengal medium and the medium SIMPLATE were revealed statistically more effective than the potato dextrose agar.

## REFERÊNCIAS

- 1 CHEN, C.M.; GU, H.; NAQUI, A. **SimPlate™ for yeasts and molds:** a new method for rapid detection and quantification of yeasts and molds in food. Westbrook, USA: IDEXX Laboratories, [1997].
- 2 DIFCO MANUAL. **Dehydrated culture media and reagents for microbiology.** 10<sup>th</sup>. ed. Detroit, Michigan, 1984. p. 689-691.
- 3 KING, A.D.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I. Dichloran-rose-bengal medium for the enumeration and isolation of molds from foods. **Appl. and Environ. Microbiol.**, v. 37, p. 959-964, 1979.
- 4 LEITÃO, M.F.F. **Tratado de microbiologia:** microbiologia de alimentos, sanitária e industrial. São Paulo: Manole, 1988. v.1.
- 5 MISLIVEC, P.B.; BANDLER, R.; STACK, M.E.; KOCH, H.A.; TOURNAS, V.H. Yeasts molds and mycotoxins. In: FDA. **Bacteriological analytical manual.** 8<sup>th</sup>. ed. Gaitsburg, 1995. p. 18.01.
- 6 SILVA, N. da.; JUNQUEIRA, V.C.A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos.** Campinas: ITAL, 1995. 229 p. (Manual Técnico, 14).