



COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS MICOLÓGICOS DE USO GERAL PARA ANÁLISE DE ALIMENTOS NA ENUMERAÇÃO DE *Aspergillus brasiliensis*

A.F. Bondam¹, K.C. Cabral², T.C. Lisboa³, J. Schmitt⁴, J.F. Hoffmann⁵, R.C.S. Ramos⁶

- 1- Escola da Saúde – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor) – São Leopoldo – RS – Brasil – Telefone: +55 (51) 3590 8215 – e-mail: (alinefc@unisinors.br)
- 2- Escola da Saúde – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor) – São Leopoldo – RS – Brasil – Telefone: +55 (51) 3590 8215 – e-mail: (kccabral@unisinors.br)
- 3- Escola da Saúde – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor) – São Leopoldo – RS – Brasil – Telefone: +55 (51) 3590 8215 – e-mail: (tclisboa@unisinors.br)
- 4- Escola da Saúde – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor) – São Leopoldo – RS – Brasil – Telefone: +55 (51) 3590 8215 – e-mail: (schmittju99@gmail.com)
- 5- Escola da Saúde – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor) – São Leopoldo – RS – Brasil – Telefone: +55 (51) 3590 8215 – e-mail: (jessicahoffmann@unisinors.br)
- 6- Escola da Saúde – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Instituto Tecnológico em Alimentos para a Saúde (itt Nutrifor) – São Leopoldo – RS – Brasil – Telefone: +55 (51) 3590 8215 – e-mail: (rcramos@unisinors.br)

RESUMO – Os alimentos apresentam na sua composição fatores muito favoráveis ao crescimento de bolores e leveduras, podendo comprometer a saúde do consumidor e resultar em prejuízos financeiros. As análises laboratoriais podem ser realizadas para monitorar a qualidade dos alimentos, com isso o objetivo desse trabalho foi comparar o crescimento de *Aspergillus brasiliensis*, em diferentes meios, Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC), Ágar Dicloran Glicerol (DG18), Ágar Extrato de Levedura Glicose Cloranfenicol (YGC) e Petrifilm YM (YM). O método YM apresentou diferença significativa entre os meios de cultura YGC, DRBC, DG18. O método YGC apresentou diferença significativa entre YM, DRBC e DG18. Já os métodos DRBC e DG18, apresentaram maior recuperação e não apresentaram diferença entre si, mas sim perante os demais. Os resultados sugerem que o ágar DRBC e DG18 apresentaram melhor desempenho e recuperação, apoiando assim seu uso para avaliação geral para análises micológicas. Maiores estudos podem ser realizados comparando diferentes grupos de alimentos, mesmo que todas as metodologias avaliadas nesse estudo são normalizadas.

ABSTRACT – Food has very favorable factors for the growth of molds and yeasts, which can compromise the health of the consumer and result in financial losses. Laboratory analyzes can be performed to monitor the quality of the food, so the objective of this work was to compare the growth of *Aspergillus brasiliensis*, in different media (DRBC, DG18, YGC and YM Petrifilm). The YM method showed a significant difference between the culture media YGC, DRBC, DG18. The YGC method showed a significant difference between YM, DRBC and DG18. The DRBC and DG18 methods, on the other hand, showed greater recovery and showed no difference between them, but rather compared to the others. The results suggest that the DRBC and DG18 agar showed better performance and recovery, thus supporting their use for general evaluation for mycological analyzes. Larger studies can be performed comparing different food groups, even though all the methodologies evaluated in this study are normalized.

PALAVRAS-CHAVE: bolores; *Aspergillus*; meios de cultura.

KEYWORDS: molds; *Aspergillus*; culture media



1. INTRODUÇÃO

Os alimentos apresentam na sua composição fatores muito favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos, como pH, oferta de nutrientes e atividade de água. A carga microbiana dos alimentos pode ser reduzida ou eliminada no seu processamento, entretanto, mesmo após o processamento térmico convencional dos alimentos, alguns microrganismos continuam a oferecer riscos de contaminação, pois podem formar metabólitos termorresistentes indesejáveis, como exemplo as micotoxinas, que são produzidas por fungos. (Ferranti, 2012; Rodrigues et al., 2007). Além disso o crescimento de fungos nos alimentos pode resultar na redução de produtividade rural, tanto agrícola quanto agropecuária, devido à colheita de alimentos contaminados e a oferta destes aos animais (Ferranti, 2012).

Dentre os fungos de interesse em alimentos está o *Aspergillus brasiliensis*, sendo o gênero mais conhecido, devido a sua prevalência em ambientes naturais, de fácil cultivo em laboratório e com grande importância econômica. Segundo a ISO 11133 Amd.1 (2018), cepas específicas foram selecionadas com objetivo de garantir a coerência entre laboratórios e para facilitar a demonstração de diferenças entre meios de cultura. Dentre essas cepas está o *Aspergillus brasiliensis* como cepa controle de meios de cultura para enumeração de bolores e leveduras.

O processo produtivo de alimentos lácteos desidratados envolve o concentrado pré-aquecido que antecede sua secagem por spray. O controle do tempo e temperatura durante a etapa de pré-aquecimento é considerado crítico, pois a variação desse binômio pode afetar a microflora desses produtos. Bolores e leveduras tem sua carga reduzida se o processo está adequado, mas sua presença indica a contaminação dos equipamentos ou do ambiente durante ou após a fabricação. (Salfinger e Tottorello, 2015).

De modo geral, as análises laboratoriais podem ser realizadas para monitorar o desempenho do sistema de qualidade da indústria. A enumeração de bolores e leveduras nos alimentos é um dos parâmetros utilizados para avaliar a qualidade dos mesmos e o grau de deterioração, e ainda, é um componente essencial para programas de garantia microbiológicos, uma vez que um índice elevado de bolores e leveduras indica falha nas condições higiênicas ou nas condições de processamento e armazenamento do produto (Silva et al., 2017).

A quantificação tradicional de bolores e leveduras em alimentos é realizada pelo método de contagem padrão em placas determinando-se o número de unidades formadoras de colônias, através do plaqueamento em superfície ou em profundidade utilizando diferentes meios de cultura como ágar batata dextrose (BDA), ágar dicloran rosa bengala cloranfenicol (DRBC), ágar DG18 dichloran glicerol (DG18), ágar extrato de leveduras glicose cloranfenicol (YGC) e Petrifilm YM (YM) (Silva et al., 2017).

Cabe salientar que, dependendo da matriz alimentar, um meio de cultura ou técnica pode ser mais adequado do que o outro, além disso, a microbiota competitiva presente nos alimentos tem que ser considerada (Taniwaki et al. (2001).

Deste modo, o objetivo desse trabalho foi comparar o crescimento unicamente de *Aspergillus brasiliensis*, inoculado em quatro diferentes meios de cultura (DRBC, DG18, YGC e YM Petrifilm), comumente utilizados para enumerar fungos em alimentos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Meios de cultura

Os meios de cultura e técnicas avaliadas foram DRBC (Merck KGaA) e DG18 (Merck KGaA) por espalhamento em superfície, e YGC (Difco) e YM Petrifilm (3M Company) por espalhamento em profundidade.

2.2 Preparo do inóculo

A cepa de fungos, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (anteriormente designado como *Aspergillus niger* ATCC 16404) foi obtida da coleção ATCC (American Type Culture Collection).

Para preparar o inóculo para os testes, 10 μL de *A. brasiliensis* preservado em meio crioprotetido foi inoculado de modo aeróbico em condições estéreis, em um tubo com ágar BDA inclinado, e incubado a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ por 5 dias. Depois, o material biológico foi removido do tubo e transferido para tubos com diluente, afim de obter diluições decimais do mesmo. A suspensão 10^2 foi a utilizada para contaminar a matriz alimentar, onde foi inoculado 25 μL da suspensão em 25 g de amostra e adicionado 225 mL de diluente, a partir deste foi realizada a diluição decimal do mesmo e inoculação. Como matriz alimentar foi utilizado leite em pó estéril.

2.3 Inoculação e Incubação

A etapa de inoculação e incubação foi executada conforme as especificações descritas na norma ISO 6611 (2004), utilizando YGC em profundidade, incubando a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 dias; ISO 21527-1(2008) utilizando DRBC em superfície, incubando a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 dias; ISO 21527-2 (2008) utilizando DG18 em superfície, incubando a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 dias; e especificações descritas na norma AOAC, Official Method 997.02 (2016), utilizando YM Petrifilm, em profundidade, incubando de 20°C a 25°C durante 5 dias. Todos os métodos foram executados com tamanho de amostra $n = 20$.

Apenas as placas apresentando fungos contáveis foram analisados, e a contagem foi realizada em contador de colônias. As contagens de colônias foram inicialmente convertidas em \log_{10} para corresponder à suposição subjacente de distribuição normal.

2.4 Análise estatística

Foi realizado a avaliação de desempenho por índice z para comparar os meios e técnicas de enumeração. Os resultados foram submetidos a análise de variância, e quando significativo, o teste de Tukey ($P < 0,05$) foi aplicado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados obtidos, convertidas em \log_{10} , para a enumeração de *A. brasiliensis* em leite em pó estéril. As metodologias apresentaram resultados distintos, onde pode-se observar que, o método YM apresentou diferença significativa entre os meios de cultura YGC (12,2%), DRBC (20,9%) e DG18 (20,9%). O método YGC apresentou diferença significativa entre os demais YM (10,9%); DRBC (7,7%) e DG18 (7,7%). Já os métodos DRBC e DG-18, apresentaram maior recuperação na enumeração e não apresentaram diferença significativa entre eles, mas sim perante os demais, sendo entre o método YM (17,3%) e YGC (7,1%).

Tabela 1 – Enumeração de *A. brasiliensis* (\log_{10} de UFC/g) em diferentes meios de cultura e técnicas de inoculação.

Meio de cultura	<i>A. brasiliensis</i>	z-score
YM	4,16 \pm 0,09 ^c	-1,99
YGC	4,67 \pm 0,04 ^b	-0,39
DRBC	5,03 \pm 0,05 ^a	1,15
DG18	5,03 \pm 0,05 ^a	1,15

Média \pm desvio-padrão ($n=20$). Letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

O meio de cultura YGC é indicado pelo padrão internacional (ISO 6611, 2004) para enumeração de bolores e leveduras em leite e produtos lácteos, logo a diferença na enumeração desse pode ser devido ao fato de sua composição ser indicada especificamente para essa aplicação.

O meio YM é amplamente indicado para utilização em diversas matrizes alimentares, sendo um método facilitado de executar, pois não implica no preparo de meios de cultura, reduzindo o tempo de preparo para o



ensaio. No entanto, para enumeração de *A. brasiliensis* em leite em pó apresentou menores valores de enumeração do que os demais meios.

O ágar DG18 foi desenvolvido para enumerar leveduras e bolores xerófilos não fastidiosos, viabilizando o crescimento de fungos com capacidade de se desenvolverem em atividade de água (aw) abaixo de 0,85. (Beuchat et al., 2001; ISO 21527-2, 2008). Já o meio de cultura DRBC foi desenvolvido para enumerar bolores e leveduras em alimentos que contenham atividade de água maior que 0,95, como exemplo, ovos, carne, frutas e produtos lácteos (ISO 21527-1, 2008). Esses dois meios foram os que apresentaram maior enumeração para *A. brasiliensis* em leite em pó, isso pode ser explicado pelo fato que de o plaqueamento em superfície aumenta a exposição ao oxigênio e evita o “stress” causado pelo meio de cultura quente (Silva et al., 2017),

Bolores e leveduras são bastante comuns no ar, no solo e no material vegetal em decomposição e a contaminação desses microrganismos nos alimentos durante o processamento podem causar sérios prejuízos, assim sendo, é importante detectar essa microbiota nos alimentos (Kaya e Zorba, 2018). Atualmente, o DRBC e DG18 são amplamente utilizados para esse propósito e, de acordo com análise estatística nesse estudo, o desempenho desses meios mostrou que ambos não apresentam diferença significativa entre eles, porém avaliando os resultados de tamanho e tipo de colônia, observou-se que o tamanho das colônias inicialmente era maior no ágar DRBC em comparação ao DG18.

Outra forma de avaliar esse estudo é através da avaliação de desempenho por índice z (z-score). Segundo a ABNT NBR ISO/IEC 17043 (2011), nessa avaliação consideram-se os resultados como satisfatórios quando o z-score obtido é $\leq |2|$. Comparando os resultados de z-score nesse estudo, os extremos obtidos foram 1,15 para o DG18 e -1,99 para YM, classificando todos os resultados encontrados como satisfatórios.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A enumeração de bolores e leveduras em alimentos é de grande importância, para o conhecimento da carga desses nos alimentos, pois a ocorrência desses microrganismos pode resultar na oferta de alimentos contaminados, e ainda, em prejuízo agropecuário. Maiores estudos podem ser realizados comparando diferentes grupos de alimentos, avaliando a sua microbiota original, pois sabe-se que dependendo da matriz alimentar, um meio de cultura ou técnica pode ser mais adequado do que o outro, além disso, a microbiota competitiva presente nos alimentos pode impactar no resultado da enumeração.

Todas as metodologias avaliadas nesse estudo são normalizadas, sugerindo como recomendada a sua utilização, no entanto, o ágar DRBC e DG18 apresentaram melhor desempenho e recuperação, apoiando assim seu uso como recomendado para avaliação geral para análises micológicas em alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira de Normas Técnicas (2011) *ABNT NBR ISO 17043*. Avaliação da conformidade — Requisitos gerais para ensaios de proficiência.

Association of Official Analytical Chemists (2016). *Official Method 997.02*. Official Methods of analysis of AOAC International. 20.ed.

Beuchat, L. R., Frøndberg, E., Deak T., Alzamora, S. M., Chen, J., Guerrero, S., López-Malo, A., Ohlsson, I., Olsen, M., Peinado, J. M., Schnurer, J., de Sioniz, M. I. & Tornai-Lehoczki, J. (2001). Performance of mycological media in enumerating desiccated food spoilage yeasts: an interlaboratory study. *International Journal of Food Microbiology* 70, 89–96.

Beuchat, L. R., Mann, D. A. (2016). Comparison of New and Traditional Culture-Dependent Media for Enumerating Food borne Yeasts and Molds. *Journal of Food Protection* 79, 95- 111.



- Ferranti, L. S. (2012). *Aspergillus section Nigri produtores de fumonisina B 2 isolados de castanha-do-Brasil* (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- International Organization for Standardization. (2004). *ISO 6611*. Milk and milk products - Enumeration of colony-forming units of yeasts and/or moulds - Colony-count technique at 25 degrees C.
- International Organization for Standardization. (2008). *ISO 21527-1*. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.
- International Organization for Standardization. (2008). *ISO 21527-2*. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds — Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95.
- International Organization for Standardization. (2018). *ISO 11133*. Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- Kaya, B., Zorba, N. (2018). Comparison of Efficacy of DRBC and DG18 Media Used for Determination of Mold and Yeast Loads in Various Foods with Different Water Activity. *Journal of Science and Technology* 8(2), 206-214.
- Rodrigues, M. F., Silva, L. M. F., Portela, A. L. O. (2007). Análise microbiológicas de bolores e leveduras em amostras de tomate comercializados na cidade de Sobral-Ceará. *Congresso Brasileiro de Química - Associação Brasileira de Química - Seção Regional do Rio Grande do Norte (ABQ-RN) NATAL - RN - Brasil*.
- Salfinger, Y., Tottorello, M. L. (2015). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association.
- Silva, N., Junqueira, V. C. A., de Arruda Silveira, N. F., Taniwaki, M. H., Gomes, R. A. R., & Okazaki, M. M. (2017). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*. Editora Blucher.
- Taniwaki, M. H., Silva, N., Banhe, A. A., Iamanaka, B. T. (2001). Enumeration of Yeasts and Molds in Food. *Journal of Food Protection*, 64 (10) 1592–1596.