

COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO PARA AVALIAÇÃO MICOLÓGICA DE RAÇÕES COMERCIAIS PARA CÃES E GATOS

CURTIS, A.O.*² ; BESS, F. ²; SILVEIRA F. ²; SANTURIO, J.M.² ; FERREIRO, L¹.

INTRODUÇÃO

As análises microbiológicas dos gêneros alimentícios têm destacado valor para garantia de produtos industrializados de qualidade. A quantificação de leveduras e fungos filamentosos geralmente envolve a inoculação da amostra em meios de cultivo sólidos através de plaqueamento em superfície ou em profundidade (Beuchat, 1992). De modo geral os meios de cultura para avaliação fúngica são altamente seletivos, suprimindo contaminações bacterianas (Skaar & Stewing, 1996) e limitando o crescimento e disseminação das colônias fúngicas (Bragulat *et al*, 1995). Infelizmente não se dispõe de um único meio que seja satisfatório para detecção ou quantificação de leveduras e fungos filamentosos em todos os tipos de alimentos.

Tradicionalmente o ágar batata acidificado tem sido utilizado para quantificação geral de fungos; entretanto, este meio não apresenta uma fonte nutritiva adequada e pode inibir a recuperação de células injuriadas devido ao seu baixo pH (3,5) (Samson *et al*,1996). Os meios suplementados com antibióticos e tinturas, como o ágar dicloram rosa de bengala e cloranfenicol (King *et al*, 1979), surgiram como alternativa mais eficaz que os meios acidificados por serem menos inibitórios a células injuriadas, mais efetivos na inibição do desenvolvimento bacteriano e produzirem menor precipitação de partículas de alimento, devido ao pH mais elevado (5-6) (Samson *et al*,1996). Rotineiramente o dicloram e o corante rosa de bengala têm sido aplicados com sucesso no controle da velocidade de disseminação de espécies fúngicas, restringindo, principalmente, os zigomicetos de rápido crescimento (King *et al*, 1979). Posteriormente, introduziram-se meios com atividade de água (Aw) reduzida, como o dicloram glicerol 18% (Aw 0,95) para quantificação geral de fungos moderadamente xerofílicos, daqueles com crescimento fastidioso, os quais em meios com Aw tradicional (Aw 0,99) poderiam ter seu crescimento impedido devido ao desenvolvimento rápido das outras espécies (Hocking & Pitt, 1980).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia destes 3 diferentes meios de cultura para quantificação e isolamento de fungos a partir de amostras de rações comerciais para cães e gatos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de Amostras

Cinquenta e quatro pacotes de diferentes rações secas (34 destinadas ao consumo de cães e 20 para gatos) produzidas por 9 diferentes empresas

¹Setor de Micologia, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

foram aleatoriamente adquiridas na cidade de Santa Maria em janeiro de 2004. Após a coleta, as amostras foram identificadas por códigos e armazenadas conforme a especificação no rótulo até o momento da análise.

Avaliação da contaminação fúngica das amostras

Para quantificação e identificação fúngica ao nível de gêneros utilizou-se ágar batata acidificado (PDA), ágar dicloram rosa de bengala com cloranfenicol (DRBC) e ágar dicloram glicerol 18% (DG18). As amostras foram processadas segundo metodologia recomendada por Samson *et al.* (1996) para detecção e isolamento de fungos presentes em alimentos.

Retirou-se 10g de cada amostra, reidratou-se em 90 mL de solução de água peptonada a 0,1% por aproximadamente 1 hora, homogeneizou-se o material obtendo-se assim a diluição 10^{-1} e preparou-se uma diluição 10^{-2} .

Para inoculação utilizaram-se as técnicas de plaqueamento em superfície e profundidade com as diluições da amostra. Para a técnica de semeadura em superfície inocularam-se alíquotas de 0,1mL das diluições 10^{-1} e 10^{-2} em placas contendo meio já solidificado, espalhando-se o inóculo na superfície do mesmo. Para semeadura em profundidade inoculou-se 1mL da diluição 10^{-1} em água peptonada e, a seguir, adicionou-se 15-20mL de meio de cultivo a 45-50°C, misturando-se adequadamente.

Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, sob condições de esterilidade.

As placas foram incubadas a 28°C durante 5 dias; a seguir, examinadas para presença de leveduras e fungos filamentosos, selecionando-se para quantificação as culturas contendo 10-100 colônias; os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC/g). Em amostras que resultaram em cultivos contendo menos que 10 UFC/g na menor diluição testada também foram contabilizadas.

Procedeu-se a identificação taxonômica dos gêneros, a partir dos meios de isolamento, conforme características macro e microscópicas das colônias, utilizando-se chaves de identificação apropriadas (Barnett & Hunter, 1998; Pitt & Hocking, 1997). Para a identificação das espécies, realizaram-se subcultivos em tubos contendo ágar batata e posteriormente seguiram-se esquemas de cultivo e chaves específicas para cada gênero (Pitt & Hocking, 1997). As colônias que, após serem subcultivadas durante 21 dias em agar batata, não produziram propágulos diferenciados foram consideradas como *Mycelia sterilia*.

A frequência de isolamento (%) dos gêneros foi calculada como:

$$= (\text{n}^\circ \text{ de amostras com presença do gênero} / \text{n}^\circ \text{ total de amostras}) \times 100$$

Análise estatística

As contagens de fungos foram analisadas através de ANOVA, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, através do programa "Statistical Analysis System".

RESULTADOS

As análises permitiram a classificação de 23 gêneros, além da detecção de fungos identificados apenas como *Mycelia sterilia* e leveduras em 40 (74%) das 54 amostras de rações (26 para cães e 14 para gatos). Em 14 amostras de ração (8 para cães e 6 para gatos) não se detectou presença fúngica.

O gênero *Aspergillus* foi o mais freqüentemente isolado nas amostras, independentemente do meio de cultivo observado. Comparativamente, o meio PDA foi menos eficaz, não proporcionando o isolamento de diversos gêneros, tais como *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Olyptrichum* e *Phoma*.

Na Tabela 1 se observam as freqüências de ocorrência de espécies do gênero *Aspergillus* e de seus teleomorfos. A utilização do meio DG18 possibilitou o isolamento de 18 diferentes espécies, com maior ocorrência de *A. niger* (40,7% do total das amostras). As espécies *A. penicillioides* e *E. rubrum* somente foram isolados em DG18. Já com o meio de PDA foi possível isolar apenas 14 espécies distintas de *Aspergillus*, também com predominância de *A. niger*. O emprego do meio DRBC proporcionou o de 13 espécies, com maior freqüência de *A. niger* e *A. candidus*, ambos presentes em 18,5% das rações.

Tabela 1: Freqüência de isolamentos de *Aspergillus* e seus teleomorfos a partir de rações animais, utilizando-se diferentes meios de cultivo.

	Nº de amostras com a espécie (Freqüência %)		
	DG18*	DRBC**	PDA***
<i>Aspergillus</i> e Teleomorfos	37 (68,52)	31 (57,41)	29 (53,65)
<i>Aspergillus niger</i>	22 (40,74)	10 (18,52)	16 (29,6)
<i>A. candidus</i>	20 (37,04)	10 (18,52)	4 (7,4)
<i>A. fumigatus</i>	11 (20,37)	5 (9,27)	6 (11,12)
<i>A. flavus</i>	10 (18,52)	6 (11,12)	6 (11,12)
<i>A. terreus</i>	9 (16,67)	6 (11,12)	6 (11,12)
<i>A. versicolor</i>	7 (12,96)	5 (9,27)	1 (1,85)
<i>A. sclerotiorum</i>	3 (5,56)	0	2 (3,70)
<i>A. ochraceus</i>	3 (5,56)	1 (1,85)	1 (1,85)
<i>A. oryzae</i>	2 (3,70)	1 (1,85)	2 (3,70)
<i>A. penicillioides</i>	2 (3,70)	0	0
<i>A. wentii</i>	2 (3,70)	0	2 (3,70)
<i>A. sindowii</i>	1 (1,85)	0	1 (1,85)
<i>A. ustus</i>	1 (1,85)	1 (1,85)	0
<i>Emericella nidulans</i>	7 (12,96)	4 (7,4)	1 (1,85)
<i>Eurotium amstelodami</i>	13 (24,07)	4 (7,4)	4 (7,4)
<i>E. repens</i>	11 (18,52)	2 (3,70)	2 (3,70)
<i>E. chevalieri</i>	3 (5,56)	2 (3,70)	2 (3,70)
<i>E. rubrum</i>	1 (1,85)	0	0

*DG18: Ágar dicloram glicerol 18%; **DRBC: Ágar dicloram rosa de bengala e cloranfenicol; ***PDA: Ágar batata acidificado

Das 40 amostras positivas, 39 apresentaram níveis de contaminação com contagens variando entre 10^1 e 10^2 UFC/g. Somente uma amostra apresentou nível de contaminação de 10^3 UC/g com microbiota composta exclusivamente por leveduras. Não se observou diferença significativa ($P < 0,05$) entre o número de fungos isolados nos diferentes meios de cultivo, devido ao alto desvio padrão encontrado nas diferentes amostras.

DISCUSSÃO

Leveduras e fungos filamentosos encontram-se amplamente distribuídos no solo, água e ar. Conseqüentemente, materiais não processados de origem vegetal ou animal encontram-se contaminados pelos mesmos quando chegam

na plataforma industrial. Boas práticas de processamento podem originar produtos livres de fungos ou reduzir suas populações (Weidenbörner *et al*, 2000). Entretanto, ao fornecer-se tempo suficiente, estes microrganismos sobreviventes podem se multiplicar e eventualmente deteriorar o produto. A detecção e quantificação de células viáveis de fungos filamentosos e leveduras em produtos processados ou não, é um requisito parcial de programas de controle de qualidade, e podem ser utilizados para monitorar a efetividade das práticas de sanitização durante o período de pós-colheita de grãos, abate dos animais, processamento e distribuição de alimentos (Beuchat, 1992).

Na avaliação da microbiota presente em rações para animais de companhia, realizada por Scudamore *et al.* (1997), utilizando ágar malte e DG18, encontrou-se *Aspergillus*, *Eurotium* e *Penicillium* como gêneros predominantes entre 10 diferentes gêneros isolados (Scudamore *et al*, 1997). Estes dados concordam com os resultados encontrados neste estudo com análise através de DG18.

Observando-se a frequência de isolamento fúngico com os meios de DRBC e PDA verificou-se menor presença do gênero *Eurotium* do que a verificada no meio DG18. Em estudos similares conduzidos por Martins *et al.* (2003) utilizando DRBC e por Bueno *et al.* (2001) com PDA, encontrou-se, respectivamente, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mucor* e *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Mucor* como os 3 gêneros mais prevalentes. A presença de *Eurotium* spp. não foi relatada nestes estudos.

O gênero *Eurotium*, por requerer A_w mínima para crescimento próxima a 0,70, possui importância na deterioração de alimentos com A_w reduzida, como a encontrada nas rações comerciais. Em meios de cultivo com A_w elevada (0,99), como DRBC e PDA, o gênero *Eurotium* apresenta crescimento lento e pode ser sobreposto por espécies de crescimento rápido, prejudicando sua recuperação em cultivo. Assim, para análise de alimentos com baixa A_w , recomenda-se a utilização de meios com A_w reduzida (0,95), como o DG18 (Hocking & Pitt, 1987).

Todos os fungos microrganismos relatados nesta pesquisa já foram isolados em alimentos. Os que apresentaram ocorrência mais freqüente pertencem ao grupo de fungos moderadamente xerofílicos, os quais são capazes de se desenvolver em A_w inferiores a 0,85, estando estes comumente associados a alimentos de umidade intermediária, como as rações para animais (Hocking & Pitt, 1987).

A maioria dos fungos xerotolerantes pertence aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, ou são as formas perfeitas do *Aspergillus*, como *Eurotium* e *Emericella*. Quando presentes, o crescimento destes microrganismos pode causar a deterioração de alimentos. Um dos principais fatores de controle sobre o desenvolvimento destes em alimentos é a redução da água disponível no substrato, uma vez que é rara a deterioração microbiológica quando os níveis de A_w forem inferiores a 0,65 (Abellana *et al*, 1999).

Além de importantes deteriorantes de alimentos, a grande maioria das espécies de *Aspergillus* e teleomorfos relacionados isolados nesta pesquisa é potencialmente produtora de metabólitos tóxicos. Entretanto, a A_w mínima requerida para síntese de toxinas é superior à mínima requerida para multiplicação fúngica (Pitt & Hocking, 1997).

O *A. niger*, espécie potencialmente produtora de ocratoxina A (Dalcero *et al*, 2002), também foi a espécie mais freqüente nas rações, segundo resultados obtidos em Portugal (Martins *et al*, 2003).

O isolamento de *A. penicillioides* em alimentos é raro, principalmente por esta espécie xerofílica não crescer, ou se desenvolver muito lentamente, nos meios com alta Aw comumente utilizados para isolamento de fungos em alimentos. Seu crescimento é considerado ótimo em meios com Aw 0,91-0,93 (Pitt & hocking, 1997).

A contagem fúngica é um indicador da qualidade das rações, e não deve exceder 10^5 UFC/g em matérias primas ou numa ração de boa qualidade microbiológica (Chelskowski, 1991). Os baixos níveis de contaminação encontrados em amostras de ração para cães e gatos já foram relatados por outros pesquisadores (Martins *et al*, 2003; Scudamore *et al*, 1997). Estes baixos níveis se devem principalmente as altas temperaturas (120°C) a que os ingredientes são submetidos durante a extrusão, no processo de fabricação da ração. A microbiota final nos produtos, provavelmente, se deve a uma recontaminação destes, ocorrida no ambiente de processamento, principalmente pelos propágulos fúngicos presentes nas partículas de farinha dos cereais suspensas no ar e em menor proporção por uma resistência ao tratamento térmico (Weidenbörner *et al*, 2000).

O controle sobre o desenvolvimento fúngico durante a estocagem dos produtos é alcançado principalmente através da baixa Aw do produto final (Bueno *et al*, 2001). A média dos valores de Aw presentes nas amostras avaliadas neste estudo foi 0,61 (dados não apresentados). Entretanto, os microrganismos podem permanecer viáveis por períodos de tempo relativamente longos, e o armazenamento das rações em condições inadequadas, ou seja, em ambientes com alta umidade e temperaturas, pode propiciar condições favoráveis para que os propágulos fúngicos se desenvolvam e sintetizem diversas toxinas (Scudamore *et al*, 1997).

O uso de inibidores, como sulfato de cobre e ácidos orgânicos, na formulação de muitas rações para cães e gatos também pode contribuir para a inibição do desenvolvimento fúngico (Maia & Siqueira, 2002).

Apesar de não se ter encontrado diferença significativa na eficiência dos diferentes meios, o DG18 foi o meio que apresentou melhores resultados tanto na quantidade quanto na variedade de fungos isolados a partir das rações avaliadas.

CONCLUSÃO

Comparando-se os resultados obtidos neste estudo com diferentes meios observa-se que a microbiota encontrada pode variar conforme meio de cultivo utilizado. Conclui-se desta forma que, a utilização de meios específicos, selecionados conforme as características de cada alimento, permite evidenciar melhor a presença de microrganismos deletérios a estes alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abellana, M.; Benedi, J.; Sanchos, V.; Ramos, A.J. Water activity and temperatura effects on germination of *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* e *E. herbariorum* isolates from bakery products. *J. Appl. Microbiol.* 87, 371-380, 1999.

2. Barnett, H.L., Hunter, B., (1998). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. The American Phytopathological Society (APS Press), St. Paul , Minesota. 218 p.
3. Beuchat, L.R. Media for detecting and enumerating yeasts and moulds. *International J. Food Microbiol.* 17, 145–158, 1992.
4. Bragulat, M.R.; Abarca, M.L.; Castella, G.; Cabañes, F.J. Dyes as fungal inhibitors: effects on colony enumeration. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 578-582, 1995.
5. Bueno, D.J.; Silva, J.O.; Oliver, G. Mycoflora in commercial pet foods. *J. Food Prot.* 64 (5), 741-743, 2001.
6. Chelskowski, J. Mycological quality o mixed feeds and ingredients. *In: Chelskowski, J. (ed), Cereal grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage.* Elsevier, Amsterdam, 1991, p. 217-227.
7. Dalcero, A.; Magnoli, C.; Hallak, C.; Chiacchiera, S.M.; Palacio, G.; Rosas, C.A.R. Detection of ochratoxin A in animal feeds and capacity to produce this mycotoxins by *Aspergillus* section *Nigri* in Argentina. *Food Addit. Contam.*, 19, 1065-1072, 2002.
8. Hocking, A.D.; Pitt, J.I. Media and methods for detection and enumeration of microorganisms with consideration of water activity requirements. *In: Rockland, L.D., Beuchat, L.R. (Eds.) Water Activity: Theory and applications to food.* Marcel Dekker, Inc, New York, 1987, p. 153-172.
9. Hocking, A.D.; Pitt, J.I. Dichloran glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 488-492, 1980.
10. King, A.D.; Hocking, A.D.; Pitt, J.I. Dichloran rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 959-964, 1979.
11. Maia, P.P.; Siqueira, M.E.P.B. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in some Brazilians pet foods. *Food Addit. Contam.* 19 (12), 1180-1183, 2002.
12. Martins, M.L.; Martins, H.M.; Bernardo, F. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *Rev. Port. Ciênc. Vet.*, 98 (548), 179-183, 2003.
13. Pitt, J.I.; Hocking, A.D. *Fungi and food spoilage.* 2nd edition. Division of Food Research, Sydney, 1997, 593 pp.
14. Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C.; Filteborg, O. Methods for the detection and isolation of food-borne fungi. *In: Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., Filteborg Introduction to food-borne fungi.* CBS, The Netherlands, 1996 5th ed, p. 261-269.
15. Scudamore, K.A.; Hetmanski, M.T.; Nawaz, S., Naylor, J.; Rainbird, S. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. *Food Addit. Contam.*, 14 (2), 175-186, 1997.
16. Skaar, I.; Stewing, H. Malt-Yeast Extract- Sucrose Agar: A suitable medium to enumeration and isolation of fungi from silages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 3614-3619, 1996.
17. Weidenbörner, M.; Wieczorek, C.; Appel, S.; Kunz, B. Whole wheat and white wheat flour- the mycobiota and potential mycotoxins. *Food Microbiol.*, 17, 103-107, 2000.