

KATIA ELIZA SAATKAMP

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA
UTILIZADOS COMO SUBSTRATOS NA CONTAGEM DE BOLORES
E LEVEDURAS NO CONTROLE DA QUALIDADE DE ERVA-MATE.**

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas como parte das
exigências para conclusão do Bacharelado em
Ciências Biológicas na área de Microbiologia -
Estágio em Patologia Básica.

Orientadoras: Ida Chapaval Pimentel e
Márcia Regina Beux

CURITIBA
1998

KATIA ELIZA SAATKAMP

**COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA
UTILIZADOS COMO SUBSTRATOS NA CONTAGEM DE BOLORES
E LEVEDURAS NO CONTROLE DA QUALIDADE DE ERVA-MATE.**

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas como parte das
exigências para conclusão do Bacharelado em
Ciências Biológicas na área de Microbiologia -
Estágio em Patologia Básica.

Orientadoras: Ida Chapaval Pimentel e
Márcia Regina Beux

CURITIBA
1998

*Aos meus pais Romeu e Venilda
por não medirem esforços para
que esta se realizasse*

DEDICO

*Ao meu esposo Ricardo pelo
apoio e incentivo, e ao meu
filho Gabriel por ocasião da
sua chegada*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus que esteve presente em todos os momentos iluminando-me com Sua luz e abençoando-me com Seu amor.

A professora Ida Chapaval Pimentel, Engenheira Agrônoma, mestre, professora do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná, por sua orientação.

A Bióloga Márcia Regina Beux , mestre em Tecnologia de Alimentos, Responsável pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA), que coordenou o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao professor Gabriel Adolfo Guimarães, Engenheiro Químico, Diretor Executivo – CEPPA por ter cedido o local e material para a realização deste trabalho.

Ao professor Juarez Gabardo, Chefe do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná, por seu auxílio na análise estatística dos resultados.

Aos meus familiares pelo apoio e incentivo em todas as horas.

A Anelise, Vanusa e Noêmia, do Laboratório de Microbiologia –CEPPA, pelo companheirismo.

A Débora por sua amizade presente em todos os anos de graduação.

SUMÁRIO

RESUMO	i
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1. OS FUNGOS	02
2.1.1. Leveduras	02
2.1.2. Bolores.....	03
2.2. DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS PROVOCADA POR FUNGOS.....	03
2.2.1. Deterioração de alimentos provocada por leveduras.....	03
2.2.2. Deterioração de alimentos provocada por bolores.	04
2.3. MICOTOXINAS.....	04
2.4. ERVA-MATE.....	05
2.5. CONTAGEM TOTAL DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS.....	05
2.5.1. Método de plaqueamento em superfície.....	06
2.5.2. Método de plaqueamento em profundidade ou “pour plate”	06
2.5.3. Método SimPlate	06
2.6. MEIOS DE CULTURA	07
2.6.1. Ágar Batata Dextrosado (BDA)	07
2.6.2. Meio de cultura Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC)	07
2.6.3. Meio de cultura utilizado no método SimPlate	08
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	08
3.1. MATERIAIS	08
3.1.1. Material geral.	08
3.1.2. Contagem de bolores e leveduras em superfície.....	09
3.1.3. Contagem de bolores e leveduras pelo método SimPlate.....	09
3.1.4. Contagem de bolores e leveduras em profundidade ou “pour plate”	09
3.2. MÉTODOS.....	10
3.2.1. Preparo das amostras	10
3.2.2. Diluições.....	11
3.2.3. Preparo das soluções	11

3.2.3.1. Solução aquosa de ácido tartárico	11
3.2.3.2. Água tamponada.....	11
3.2.4. Preparação dos meios de cultura	12
3.2.4.1. Ágar Batata Dextrosado	12
3.2.4.2. Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol	12
3.2.4.3. Meio para bolores e leveduras- SimPlate	13
3.2.5. Plaqueamento em superfície.....	13
3.2.5.1. Inoculação	13
3.2.5.2. Incubação.....	15
3.2.5.3. Contagem das colônias e cálculo dos resultados.....	16
3.2.6. Plaqueamento em profundidade ou “pour plate”	16
3.2.6.1. Inoculação	16
3.2.6.2. Incubação.....	17
3.2.6.3. Contagem das colônias e cálculo dos resultados.....	17
3.2.7. Plaqueamento pelo método SimPlate	17
3.2.7.1. Preparação das placas e inoculação.....	17
3.2.7.2. Incubação.....	19
3.2.7.3. Contagem e resultados.....	19
3.2.8. Análises estatísticas	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5. CONCLUSÃO.....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

RESUMO

O presente trabalho comparou diferentes meios de cultura, Ágar Batata Dextrosado (BDA), Ágar Dicloran Rosa de Bengala Clorafenicol (DRBC) e Meio para Bolores e Leveduras pelo método SimPlate, utilizados como substrato na contagem de fungos em alimentos, visando determinar qual é o mais efetivo.

Foram submetidas aos métodos três diferentes amostras de erva-mate (*Ilex paraguariensis*). Para as amostras **A** e **B** os métodos SimPlate e DRBC foram estatisticamente os mais eficientes. Para a amostra **C**, não houve diferença estatística quanto a eficiência dos métodos, porém, houve diferença em relação a expressão dos resultados considerando a Portaria 451 de 19/set/97, neste caso, o método SimPlate é o único que reprova a amostra, indicando sua eficiência.

Entre os métodos estatisticamente mais eficientes, na prática, o DRBC, apesar do tempo de incubação ser de 5 dias, permite uma melhor visualização das colônias, já o SimPlate, embora apresente o tempo de incubação reduzido à 48 horas, a visualização, sob luz UV, é dificultada quando se trata de uma amostra que apresenta partículas maiores, como no caso da erva-mate, que recobrem as cavidades impedindo a emissão de fluorescência.

1. INTRODUÇÃO

A contagem de bolores e leveduras é uma das análises realizadas no controle de qualidade de alimentos, cujo intuito reside em estimar a validade de um determinado produto alimentício.

A presença excessiva destes microrganismos resulta na deterioração ou redução da vida útil do alimento.

Embora seja considerada uma análise indicadora de contaminação, quantificar estes fungos é fundamental na avaliação da qualidade de produtos armazenados, como cereais, enlatados e outros, como a erva-mate.

Esta quantificação permite rastrear se as boas práticas de armazenamento, processamento e transporte foram adotadas de forma a garantir a qualidade do produto final.

Em alimentos, os fungos são considerados microrganismos que não oferecem risco direto a saúde apesar de algumas espécies de bolores serem produtoras de micotoxinas tidas como prejudiciais e até cancerígenas ao homem.

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 uma amostra irá formar, quando fixada em um meio sólido adequado, uma colônia visível e isolada.

Os fungos por serem aeróbios, preferencialmente são inoculados na superfície do meio de cultura, podendo ser utilizado também o método de plaqueamento em profundidade, sendo o Ágar Batata Dextrosado e o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol os rotineiramente utilizados em laboratórios de análise de alimentos. Após a inoculação as placas devem ser incubadas durante 5 dias para permitir o desenvolvimento das colônias.

Um novo método analítico, baseia-se nos produtos metabólicos formados e não na visualização das colônias, o que reduz o tempo de incubação de 5 para 2 dias, permitindo obter o resultado em menos da metade do tempo exigido na análise convencional.

Neste trabalho selecionou-se a erva-mate como o alimento a ser testado, pois, além de ser um produto de exploração nativa da região Cone Sul, apresenta propriedades

alimentícias, tais como estimulante neuromuscular, sendo consumida em larga escala na região sul do país (COSTA,1989).

O presente trabalho teve como objetivo principal comparar diferentes meios de cultura, Ágar Batata Dextrosado, Ágar Dicloran Rosa de Bengala Clorafenicol e Meio para Bolores e Leveduras pelo método SimPlate, utilizados como substrato na contagem de fungos em alimentos, visando determinar qual é o mais efetivo. Os objetivos específicos foram: comparar a contagem de fungos na sementeira em superfície e profundidade utilizando como substrato o Ágar Batata Dextrosado e o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Clorafenicol; avaliar o método proposto pelo SimPlate, que é baseado na atividade metabólica fúngica; comparar os três métodos quanto a contagem de fungos obtida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. OS FUNGOS

Os fungos são organismos eucariontes, aclorofilados e aeróbios. Todos são heterotróficos, podendo ser saprófitas, parasitas ou simbiontes, as substâncias nutritivas são assimiladas por absorção após terem sido parcialmente degradadas por enzimas extracelulares. São divididos em dois grandes grupos, os unicelulares, leveduras e os pluricelulares, bolores (RAVEN *et al* citado por BEUX, 1995).

2.1.1. Leveduras

As leveduras unicelulares apresentam-se sob forma variada – de esférica a ovóide, de elipsóide a filamentosa. Como os bolores as leveduras são tanto benéficas quanto prejudiciais (PELCZAR *et al*, 1996).

Para o desenvolvimento destes organismos é necessário a presença de nutrientes do tipo carboidratos, proteínas, vitaminas e sais minerais. O pH ideal está em torno de 4,5 a 5,0, embora sobrevivam na faixa de 3,0 a 7,5. Geralmente se desenvolvem sob temperaturas

entre 20° e 30°C, morrem a 45° ou 47°C. As leveduras são consideradas anaeróbicas facultativas, na presença de oxigênio se desenvolvem mais rapidamente produzindo CO₂ e H₂O. Na ausência de oxigênio crescem mais lentamente eliminando etanol, CO₂ e H₂O.

As leveduras mais comuns em alimentos e bebidas são: *Saccharomyces cerevisiae*, *Torula*, *Candidas*, *Debaromyces* e *Mycoderma* (LEITÃO, 1988).

2.1.2. Bolores

Nos bolores, as células são cilíndricas e estão ligadas nas extremidades para formar um filamento denominado hifa, que pode apresentar esporos. Individualmente, as hifas são microscópicas. Porém, quando grandes quantidades de hifas acumulam-se em um pedaço de pão por exemplo, a massa fúngica denominada micélio é visível a olho nú (PELCZAR, 1996).

A produção de esporos é a forma mais comum de reprodução destes organismos.

O desenvolvimento dos bolores é controlado por fatores como: nutrientes, umidade, temperatura (20° a 30°C), oxigênio (são aeróbicos), acidez (pH ideal = 4,5-5,0).

Os bolores mais comuns em alimentos são: *Aspergillus*, *Botrytis*, *Oidium*, *Rhizopus*, *Penicillium* (LEITÃO, 1988).

2.2. DETERIORAÇÃO DE ALIMENTOS PROVOCADA POR FUNGOS

2.2.1. Deterioração de alimentos provocada por leveduras

Considerando-se inicialmente apenas as leveduras, cabe lembrar que a ocorrência de espécies patogênicas em alimentos é praticamente desconhecida, sua importância residindo muito mais no fato de serem eventuais agentes de deterioração em alimentos nos quais apresentam condições ótimas de desenvolvimento (LEITÃO, 1988).

Nota-se que há diversidade de comportamento destes organismos, sendo que, dependendo do tipo de alimento e de suas características básicas, uma mesma espécie pode

ser considerada benéfica e essencial ao processo tecnológico, já em outro produto ela pode ser o agente de deterioração. Um exemplo clássico é dado por *Saccharomyces cerevisiae*, levedura importante na fabricação de bebidas alcoólicas e de álcool etílico e principal agente de deterioração de suco de frutas ou mesmo de bebidas carbonatadas.

2.2.2. Deterioração de alimentos provocada por bolores

A exemplo das leveduras, com as quais apresentam características fisiológicas similares, os bolores revelam notável capacidade de adaptação e crescimento sob condições extremamente variáveis (LEITÃO,1988). A partir deste dado conclui-se que qualquer tipo de alimento está sujeito a deterioração pelo crescimento de bolores, desde que haja contato com o ambiente atmosférico por serem organismos aeróbios.

O termo “deterioração fúngica dos alimentos” geralmente está associado ao crescimento visível de colônias. No entanto, muitas vezes, um produto mostra-se alterado por bolores, independente da visualização das colônias, alteração esta devida principalmente à atividade hidrolítica apresentada por muitas espécies (BANWART,1979).

Este fato, acrescido da eventual capacidade de elaborar micotoxinas, torna extremamente importante o adequado controle da proliferação de bolores nos alimentos (LEITÃO,1988).

2.3. MICOTOXINAS

Se tem demonstrado que um elevado número de bolores produzem substâncias tóxicas denominadas micotoxinas. Umas são mutagênicas e cancerígenas, outras são tóxicas para determinados órgãos e outras se comportam como tóxicas por meio de outros mecanismos. Pelo menos 14 micotoxinas são cancerígenas, sendo entre elas as aflatoxinas os agentes cancerígenos mais potentes. Geralmente se admite que aproximadamente 93% dos compostos mutagênicos tem propriedades cancerígenas. Quanto as micotoxinas, os

sistemas de ensaio microbiológico revelam um nível correspondente de 85% entre a ação cancerígena e a mutagênese (JAY, 1994).

2.4. ERVA-MATE

A portaria 234 define erva-mate como o produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos, das variedades de *Ilex paraguariensis*, na forma inteira ou moída obtidos através de tecnologia apropriada.

2.4.1. Microbiologia x chá

Pesquisa realizada no Sri-Lanka mostrou que para o estudo da microflora da superfície de folhas de chá, as técnicas microbiológicas, embora tenham evoluído, são ainda deficientes, o que requer a combinação de algumas delas.

Para isolar fungos do grupo *Aspergillus flavus* presentes nos campos de chá japoneses foi utilizado o meio Ágar Dicloran Rosa de Bengala Clorafenicol que é seletivo para esta espécie.

2.5. CONTAGEM TOTAL DE MICRORGANISMOS

Utiliza-se um método geral para a contagem de diferentes grupos microbianos como os aeróbios mesófilos e psicrotrófilos, os bolores e leveduras, e os clostrídios sulfito-redutores, bem como para a contagem de gêneros e espécies, como por exemplo *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*.

Esta versatilidade é decorrente do princípio do método que se baseia na premissa de que cada célula microbiana presente em uma amostra irá formar, quando fixada em um meio de cultura sólido adequado, uma colônia visível e isolada. Variando o tipo de meio (meio de enriquecimento, meio seletivo, meio seletivo-diferencial) e as condições de

incubação (temperatura e atmosfera), é possível selecionar o grupo, gênero ou espécie que se deseja contar. Como as células microbianas muitas vezes ocorrem em agrupamentos, não é possível estabelecer uma relação direta entre o número de colônias e o número de células. A relação correta é feita entre o número de colônias e o número de “unidades formadoras de colônias”(UFC), que podem ser tanto células individuais como agrupamentos característicos de certos microrganismos (SILVA e JUNQUEIRA, 1995).

A contagem total de microrganismos pode ser realizada através do método de plaqueamento em superfície ou em profundidade.

2.5.1. Método de plaqueamento em superfície.

O inóculo é dispensado sobre a superfície do meio e espalhado, sobre a mesma, com o uso de uma alça de Drigalski.

2.5.2. Método de plaqueamento em profundidade ou “pour plate”

O inóculo é dispensado em placas de Petri vazias e esterilizadas, sendo o meio adicionado posteriormente à temperatura de 45°C. Com movimentos em forma de “oito” se obtém a mistura do inóculo com o meio. Após a completa solidificação do meio as placas são incubadas.

2.5.3. Método SimPlate

O inóculo juntamente com o meio são dispensados no centro de placas que apresentam determinado número de cavidades. O movimento da placa em sentido horário e anti-horário faz com que o conteúdo se aloje nas cavidades. O excesso de conteúdo é eliminado por um recorte presente na lateral da tampa (ANEXO I).

2.6. MEIOS DE CULTURA

2.6.1. Ágar Batata Dextrosado Acidificado (BDA)

A infusão de batatas realizada na preparação deste meio incentiva o crescimento dos fungos. A adição de ácido tartárico (solução 10%) ao meio previamente esterilizado reduz o pH à 3,5 o que impede o crescimento de outras bactérias (DIFCO MANUAL, 1984).

2.6.2. Meio de cultura Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC)

O ágar DRBC é um meio seletivo que mantém o bom crescimento de bolores e leveduras. O pH do meio foi reduzido de 7,2 a 5,6 para melhorar a inibição da dispersão do fungo. A presença de rosa de bengala no meio suprime o crescimento da bactéria e restringe o tamanho e altura das colônias de fungos que crescem mais rapidamente. A concentração de rosa de bengala foi reduzido de 50 mcg/ml para 25 mcg/ml permitindo desta forma melhor atuação do ágar rosa de bengala cloranfenicol em conjunto com dicloran. O agente fúngico, dicloran, foi adicionado ao meio para reduzir o diâmetro das colônias de fungos dispersos. Cloranfenicol foi incluído no meio para inibir o crescimento de bactérias presentes no experimento e nas amostras de alimentos. A inibição das bactérias e restrição da dispersão de fungos com rápido crescimento ajudam no isolamento de fungos de crescimento lento, prevenindo o crescimento excessivo das espécies de rápido crescimento. Em adição, rosa de bengala diminui o diâmetro das colônias de bolores e leveduras assim facilitando sua identificação e contagem. Recuperação reduzida de leveduras pode ser encontrada devido a alta atividade do rosa de bengala com pH 5,6 (KING *et al*, 1979).

O uso de antibióticos é preferido à solução de ácido tartárico porque soluções estoque são relativamente fáceis de preparar e um ágar pH baixo, inibidor de algumas espécies de bolores e leveduras, não dá resultado. Cloratetraciclina-HCl, ágar com concentração média de 40ppm, é recomendado. Outros antibióticos (como cloranfenicol e

estreptomicina) podem ser usados, mas devem sempre ser usados na mesma concentração que cloratetraciclina-HCl e adicionado à ele (MISLIVEC *et al*, 1995).

2.6.3. Meio de cultura utilizado no método SimPlate

SimPlate para bolores e leveduras tem sido usado para detectar e quantificar a concentração dos mesmos nos alimentos. O uso da tecnologia de múltiplas enzimas está relacionado a atividade enzimática fúngica presente em bolores e leveduras. O meio emite fluorescência quando enzimas do substrato são metabolizadas por leveduras e bolores. O meio é inoculado com uma amostra de alimento preparada e dispensada no SimPlate e incubado à 30°C por 48 horas ou alternativamente à 25°C por 72 horas. A presença de leveduras e bolores no meio é revelado observando a fluorescência sob uma lâmpada ultravioleta com comprimento de onda de 365nm (CHEN *et al*, [1997]).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

O experimento foi realizado no laboratório de microbiologia do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – CEPPA, utilizando-se 3 diferentes marcas de erva-mate submetidas a análise em 3 diferentes meios e pelos 3 diferentes métodos.

3.1.1. Material geral

- 3 diferentes marcas de erva-mate
- Sacos plásticos para pesagem das amostras
- Stomacher (homogenizador de amostras)
- Frascos com 225ml de água tamponada
- Frascos para diluição com 90ml de água tamponada

- Pipetas de 10ml esterilizadas
- Seladora

3.1.2. Contagem de bolores e leveduras em superfície

- Placas de Petri esterilizadas
- Pipetador automático com ponteiras de 0,1ml esterilizadas
- Alça de Drigalski
- Meios de cultura:
 - Ágar Batata Dextrosado
 - Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol
- Solução aquosa de Ácido tartárico 10% esterilizada
- Estufa regulada à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

3.1.3. Contagem de bolores e leveduras pelo método SimPlate

- Placas de SimPlate
- Meio pré-dispensado do SimPlate
- Água destilada esterilizada
- Frascos de 100ml esterilizados
- Pipetador automático com ponteira de 1ml esterilizadas
- Estufa regulada à 30°C
- Lâmpada ultravioleta com comprimento de onda de 365nm

3.1.4. Contagem de bolores e leveduras em profundidade ou “pour plate”

- Placas de Petri esterilizadas
- Pipetador automático com ponteira de 1ml esterilizada
- Meio de cultura: BDA
- Solução aquosa de ácido tartárico 10% esterilizada

- Estufa regulada à $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparo das amostras

Foi retirado assepticamente uma unidade analítica de 25g de cada marca de ervamate e transferido para o saco de homogeneização esterilizado (Figura 1), obedecendo os seguintes cuidados:

-as embalagens foram abertas em câmara asséptica, próximo a chama de um bico de Bunsen;

-todos os instrumentos e utensílios utilizados na abertura da embalagem e retirada das unidades analíticas (tesouras e colheres) foram previamente esterilizados e flambados no momento de uso;

-após a pesagem o saco para homogeneização e a embalagem foram fechados com auxílio de uma seladora.

Figura 1 : Pesagem das amostras.



3.2.2. Diluições

Adicionou-se à unidade analítica de 25g, 225ml de água tamponada e homogeneizou-se, obtendo desta forma a diluição 10^{-1} (Figura 2).

Para a segunda diluição (10^{-2}), transferiu-se assépticamente 10ml da primeira diluição para 90ml de diluente. As diluições subsequentes foram obtidas de maneira similar, transferindo-se 10ml da diluição anterior para 90ml de diluente.

Figura 2: Amostra A diluída em água tamponada (diluição 10^{-1}).



3.2.3. Preparação das soluções

3.2.3.1. Solução aquosa de ácido tartárico 10%

Dissolver 10g de ácido tartárico puro em 100ml água destilada, esterilizar.

3.2.3.2. Água tamponada

a) Solução estoque de tampão fosfato: Dissolver 34g de fosfato biácido de potássio em 500ml de água destilada. Ajustar o pH a 7,2 com solução de hidróxido de sódio 1N e

diluir a 1 litro com água destilada. Esterilizar a solução à 121°C durante 15 minutos e armazenar em refrigerador. O pH final após a esterilização deverá ser $7,0 \pm 0,1$.

b) Água tamponada: Adicionar 1,25ml da solução estoque (a) em 1 litro de água destilada. Distribuir em tubos ou frascos e esterilizar a 121°C durante 15 minutos (SILVA, 1997).

3.2.4. Preparação dos meios de cultura

3.2.4.1 Ágar batata dextrosado (BDA)

INGREDIENTES:

Infusão de batatas.....	200g
Dextrose.....	20g
Ágar.....	15g
Água destilada.....	1,0L

Pesou-se os ingredientes, a estes foi adicionado a água destilada e foi esterilizado a 121°C/15minutos. Após esterilização aguardou-se o meio retornar a temperatura próxima à 40°C e adicionou-se ácido tartárico 10% esterilizado de forma a reduzir o pH para o intervalo de 3,0-3,5. Foi distribuído o meio em placas de Petri esterilizadas, na quantidade de 15ml por placa para a contagem em superfície, no caso da contagem em profundidade ou “pour plate” o meio foi reservado para uso posterior.

3.2.4.2. Ágar Dicloran Rosa de bengala Cloranfenicol (DRBC)

INGREDIENTES:

Peptona.....	5,0g
Glicose.....	10,0g
Fosfato monopotássico.....	1,0g

Sulfato de magnésio.....	0,5g
Dicloran.....	0,002g
Rosa de bengala.....	0,025g
Cloranfenicol.....	0,001g
Ágar.....	15,0g
Água destilada.....	1,0L

Após a pesagem dos ingredientes, adicionou-se a água destilada e esterilizou-se a 121°C/15minutos. Foi distribuído o meio em placas de Petri esterilizadas, na quantidade de 15ml por placa.

3.2.4.3. Meio para bolores e leveduras - SimPlate

O meio pré-dispensado foi colocado no frasco esterilizado de 100ml e à ele adicionado 100ml de água destilada esterilizada (ANEXO I). O frasco foi tampado e agitado para que o meio se dissolvesse.

3.2.5. Plaqueamento em superfície

3.2.5.1. Inoculação

- Inoculou-se 0,1ml de cada diluição na superfície das placas (Figuras 3 e 4);
- Usando uma alça de Drigalski, foi espalhado o inóculo por toda a superfície do meio (Figura 5).

Figura 3: Inoculação superficial em meio BDA.



Figura 4: Inoculação superficial em meio DRBC.



Figura 5: Uso da alça de Drigalski para espalhar o inóculo.



3.2.5.2. Incubação

-As placas foram incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 5 dias (Figura 6).

Figura 6: Estufa bacteriológica regulada à 25°C .



3.2.5.3. Contagem das colônias e cálculo dos resultados

Foram consideradas as placas que apresentaram de 15 a 150 colônias (MISLIVEC,1992). Obtendo-se o número de colônias, este foi multiplicado por 10, para levar em conta o volume dez vezes menor inoculado no plaqueamento em superfície, dividindo pelo valor da diluição resultando no número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama da amostra.

3.2.6. Plaqueamento em profundidade ou “Pour Plate”

3.2.6.1. Inoculação

- Inoculou-se 1ml de cada diluição em placas de Petri esterilizadas e vazias (Figura 7);
- Sobre o inóculo adicionou-se 15ml de meio BDA à 45°C (Figura 8).
- Com movimentos suaves na forma de oito obteve-se a mistura do inóculo com o meio.

Figura 7: Inoculação em placa de Petri vazia e esterilizada.



Figura 8: Adição do meio de cultura(BDA) à placa com o inóculo.



3.2.6.2. Incubação

-Após a solidificação do meio as placas foram incubadas a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 5 dias (Figura 6).

3.2.6.3. Contagem das colônias e cálculo dos resultados

Foram consideradas as placas que apresentaram de 25 a 250 colônias (MISLIVEC,1992). Obtendo-se o número de colônias, este foi multiplicado pelo inverso da diluição resultando no número de unidades formadoras de colônia (UFC) por grama da amostra.

3.2.7. Plaqueamento pelo método SimPlate

3.2.7.1. Preparação das placas e inoculação

No centro da placa do SimPlate foi dispensado 1ml de amostra (Figura 9) e 9ml de meio já preparado(Figura 10), conseguindo um volume final de 10ml. Com a placa tampada foi distribuído o conteúdo girando a mesma delicadamente no sentido horário e anti-

horário. Alinhando o recorte na lateral da tampa com o escoadouro existente na borda da base da placa o excesso de conteúdo foi cuidadosamente eliminado (Figura11).

Figura 9: Inoculação em placa especial para o método SimPlate.



Figura 10: Adição de meio previamente preparado.



Figura 11: Eliminação do excesso de conteúdo da placa do SimPlate.



3.2.7.2. Incubação

As placas do SimPlate foram incubadas à 30°C por 48 horas (Figura 12).

Figura 12: Placas do método SimPlate incubadas em estufa bacteriológica regulada à 30°C.



3.2.7.3. Contagem e resultados

Sob luz ultravioleta foi contado o número de reservatórios fluorescentes do SimPlate. Comparou-se o número encontrado com a tabela de NMP (ANEXO II) para se obter o número de bolores e leveduras presentes na amostra, este valor foi multiplicado pelo da diluição. O resultado obtido corresponde ao número de unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g).

3.2.8. Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com repetições. Considerando que as amostras (3) são os blocos, os métodos são os tratamentos, cada um repetido 5 vezes, totalizando 60 parcelas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Transcorridos os dias de incubação, fez-se o cálculo dos resultados, conforme descrito anteriormente, para cada método utilizado. Os valores obtidos em cada repetição se encontram na Tabela 1.

Tabela 1: Média dos resultados obtidos na contagem de bolores e leveduras.

AMOSTRAS	REP.	SIMP.	BDA PP	BDA SUP.	DRBCSUP
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 da Tabela 1 encontram-se à seguir.

Tabela 2: Análise da variância dos dados apresentados na Tabela 1.

FATORES DE VARIACÃO	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.

** Valor significativo para F ao nível de 1%.

Realizada a análise de variância, observamos uma diferença significativa entre os métodos, as amostras, assim como com relação à interação (Método x Amostra) mostrando-nos que a existência da diferença entre a eficiência dos métodos é diferente entre as amostras.

Com o propósito de se investigar qual o método de melhor eficiência, completamos a análise com um teste de médias (Tukey) dentro de cada amostra, para o qual a diferença mínima significativa (d.m.s.), ao nível de 5%, calculada corresponde à 11199,40. As diferenças entre médias dos métodos, segundo as amostras, estão apresentadas na Tabela 3.

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 se comparado à d.m.s. ao nível de 5% que é igual à 11199,40.

Tabela 4: Médias dos diferentes métodos relativos a amostra **A**, assim como a representação gráfica das eventuais diferenças. Métodos unidos por uma linha não apresentam diferenças significativas.

MÉTODO	MÉDIAS	Relação entre médias
SIMP	55600	
DRBC SUP	54860	
BDA SUP	26260	
BDA PP	15560	

Na tabela acima observamos que, para a amostra **A**, os métodos SimPlate e DRBC Superfície apresentaram a mesma eficiência, sendo que esta é diferente significativamente da eficiência apresentada pelos métodos BDA Superfície e “Pour Plate”.

Tabela 5: Médias dos diferentes métodos relativos a amostra **B**, assim como a representação gráfica das eventuais diferenças. Métodos unidos por uma linha não apresentam diferenças significativas.

MÉTODO	MÉDIAS	Relação entre médias
SIMP	41800	
DRBC SUP	37000	
BDA SUP	19330	
BDA PP	12480	

Para a amostra **B** (Tabela 5) os métodos SimPlate e DRBC Superfície apresentam a mesma eficiência, DRBC e BDA Superfície também, entretanto, SimPlate e BDA Superfície apresentam diferença significativa. BDA Superfície e “Pour Plate” são eficientemente iguais, embora não se possa dizer o mesmo dos métodos DRBC Superfície e BDA “Pour Plate”.

Tabela 6: Médias dos diferentes métodos relativos a amostra C, assim como a representação gráfica das eventuais diferenças. Métodos unidos por uma linha não apresentam diferenças significativas.

MÉTODO	MÉDIAS	Relação entre médias
DRBC SUP	6120	
BDA SUP	4350	
BDA PP	3640	
SIMP	1676	

Segundo a Tabela 6, para a amostra C os métodos não apresentam diferença significativa em relação a eficiência, devido ao fato de que para esta amostra os valores de contaminação são baixos.

A partir das Tabelas 4, 5 e 6 é possível, então, dizer que a eficiência dos métodos não deve ser generalizada. Assim sendo, se houvesse necessidade premente de nomear os métodos melhores, dir-se-ia que os métodos SimPlate e DRBC são estatisticamente igualmente eficientes em relação a amostra A e B, não havendo, no entanto, nenhum método eficientemente diferente quando se considera a amostra C.

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

Se compararmos as médias dos diferentes métodos, em relação as amostras (Tabela 7), podemos observar que a amostra C apresenta em média 87% de contaminação por fungos a menos que as demais amostras.

Embora estatisticamente não exista diferença na eficiência dos métodos em relação a amostra C, verificamos que a diferença existe quanto a expressão dos resultados. Se

considerarmos o limite de $5,0 \times 10^3$ UFC/g em amostras de erva-mate, conforme a Portaria 451 de 19/set/97, percebemos que o único método que reprovava o produto seria o SimPlate, enquanto que os demais aprovavam para o consumo.

Considerando-se que, na prática laboratorial, o melhor método é aquele que recupera um maior número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), o método SimPlate se sobressai aos demais por sua aplicação estar relacionada à enzimas presentes no substrato que são metabolizadas pela presença de bolores e leveduras na amostra, bem como pelo tempo de incubação que é reduzido a até 48 horas, segundo CHEN *et al*, 1997. Entretanto, na prática a visualização, sob luz ultravioleta, é dificultada quando se trata de uma amostra que apresenta partículas maiores, como no caso da erva-mate, que recobrem as cavidades impedindo a emissão de fluorescência (Figura 13).

Em relação ao método DRBC, apesar do tempo de incubação ser de 5 dias, este permite uma melhor visualização das colônias devido à suas características, tais como: a presença de Rosa de Bengala, que restringe o crescimento excessivo das colônias de fungos com desenvolvimento rápido, permitindo assim que colônias de fungos com desenvolvimento lento também se desenvolvam; o pH reduzido inibe a dispersão dos fungos; a presença de Dicloran ajuda a reduzir o diâmetro das colônias e a presença de Cloranfenicol antibiótico inibe o crescimento de outras bactérias presentes no experimento (Figura 14), conforme concluiu KING *et al*, 1979.

Entre todos os meios de cultura testados o BDA foi o que apresentou, quando comparados aos resultados obtidos nos demais, menor eficiência, pois recuperou cerca de 40% dos esporos presentes nas amostras (Figuras 13 e 14, letras B e C) entre os métodos de plaqueamento o “pour plate” é o menos eficiente, quando comparado ao de superfície (Figura 13, letra B), por ter recuperado apenas 28% dos esporos, segundo observamos na Tabela 7.

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.

Figura 13: Placas após incubação. A) Método SimPlate; B) Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em profundidade.

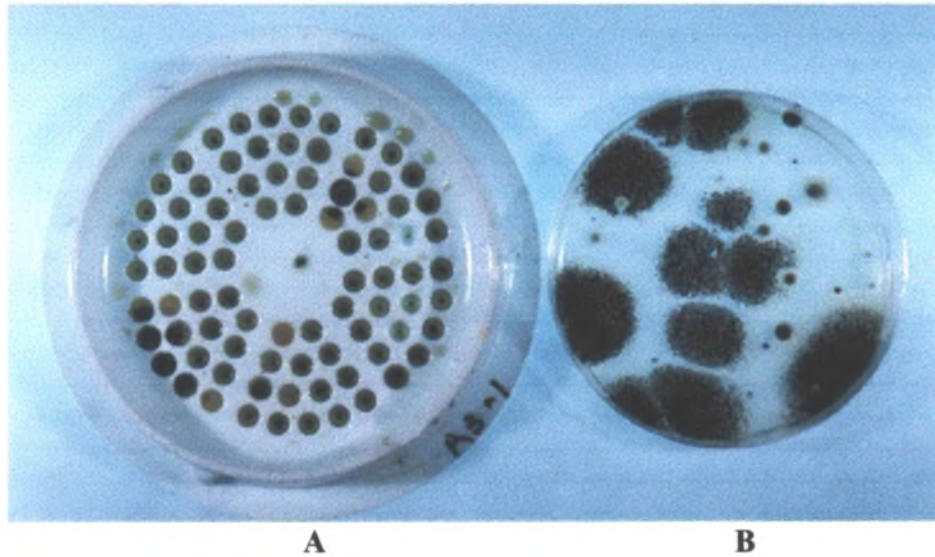
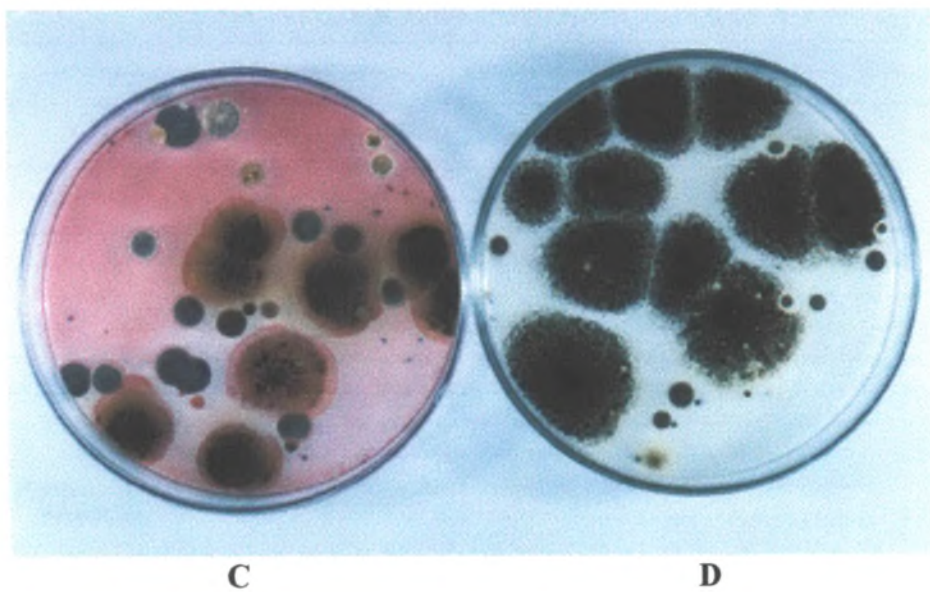


Figura 14: Placas após incubação. C) Ágar Batata Dextrosado pelo método de plaqueamento em superfície. D) Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol pelo método de plaqueamento em superfície.



5. CONCLUSÃO

Há uma interação significativa entre método e amostra, isto pode ser interpretado da seguinte maneira: As diferenças entre a eficiência dos diferentes métodos depende da amostra, ou seja, não devem ser generalizadas. Assim sendo, se houvesse necessidade premente de nomear os métodos melhores, diríamos que o método SimPlate e o meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol, pelo método de plaqueamento em superfície, são estatisticamente igualmente eficientes em relação à amostra **A** e **B**, não havendo no entanto nenhum método eficientemente diferente para a amostra **C**, por esta apresentar valores baixos de contaminação. Mas, levando-se em consideração a expressão dos resultados para esta última amostra e a Portaria 451 (19/set/97), o método SimPlate indica sua eficiência.

Entre todos os meios testados o DRBC é o que apresentou maior eficiência.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANWART, G.J. 1979. **Basic Food Microbiology**, AVI Publ. Company Westport, Conn. USA. 178pp.
- BEUX, Márcia Regina. **Biotransformação de resíduos agroindustriais do Estado do Paraná no cultivo do fungo saprófita comestível *lentinula edodes* (shiitake)**. Curitiba, 1995. 130p. Tese de mestrado em Tecnologia de Alimentos – Departamento de Tecnologia Química, UFPR.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n 234, de 25 de março de 1998. Aprova o regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade para erva-mate. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 26 de março de 1998. Seção 1, p.6.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n.451, de 19 de Setembro de 1997. Aprova o regulamento Técnico dos princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 22 de julho de 1998. Seção 1, p.4.
- 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].
- COSTA, S.G. **A erva-mate**. Curitiba: Secretaria do Estado do Planejamento e Coordenação Geral; *Scientia et Labor*, 1989. 86p.
- DIFCO MANUAL. **Dehydrated culture media and reagents for microbiology**. 10.ed. Detroit, Michigan, 1984. P.689-691.
- JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. [Zaragoza]: ACRIBIA, 1994. 804p.

- 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. 37:959-964, 1979.
- LEITÃO,M.F.F. **Tratado de microbiologia:** microbiologia de alimentos, sanitária e industrial. [São Paulo] : Manole, 1988. v.1. 186p.
- MADRID,A.;CEZANO,I.;VICENTE,J.M.. **Manual de indústrias dos alimentos.** [São Paulo] : Varela,1995. 599p.
- MISLIVEC, P.B.; BEUCHAT, L.R.; COUSIN, M.A.,. **Yeasts and Molds.** In: APHA. Compendium of methods for the microbiological examinatio of foods. 3ed. Washington, 1992. P. 239-249 (Chapter 16).
- MISLIVEC, P.B.; BANDLER, R.; STACK, M.E.; KOCH, H.A.; TOURNAS, V.H.. **Yeasts Molds and Mycotoxins.** In: FDA Bacteriological Analytical Manual. 8ed. 1995. Chapter 18.
- PELCZAR Jr., J.M. **Microbiologia:** conceitos e aplicações. São Paulo: MAKRON Books, 1996. V.I. 2.ed. 524p.
- RAVEN,P.; EVERT,R.; CURTIS,H. **Biology off plants.** Traduzido por Patrícia Voyeux, Irene Rizzini, C.T.Rizzini, Vera L.B. Souza, Beatriz Rizzini. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara 2, 1978. 724p.
- SILVA,N. da. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 1997. 295p.
- SILVA,N. da; JUNQUEIRA,V.C.A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos.** Campinas: ITAL,1995. 229P. (Manual Técnico,14).

ANEXOS

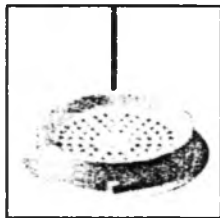
SimPlate™ Fast, Easy Protocol:

1. Prepare food samples as recommended in the current edition of *The Bacterial Analytical Manual*

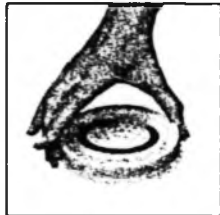
2. Pour dehydrated medium into 100ml sterile water. Cover and shake vial to dissolve.



3. Dispense 1ml of sample and 9ml of Yeast and Mold Medium onto the SimPlate landing pad to achieve a final volume of 10ml (± 0.2 ml) for a Normal Counting Range SimPlate.



4. Replace lid and distribute the sample medium mixture into the wells by gently swirling the plate.



5. To remove trapped bubbles, hold the SimPlate at approximately a 30° angle and gently tap against a hard, flat surface.



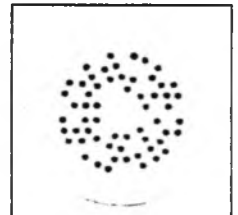
6. Pour off excess sample/medium mixture. The wells will remain filled with the sample/medium.



7. Turn notch away from spout and incubate for 48 hours at 30°C.



8. Place a UV light 6 to 12 inches above the SimPlate and count the number of positive fluorescent wells. Refer to the MPN table to determine the most probable number of yeasts and molds present in the SimPlate.



During and after use, the SimPlate will contain viable yeasts and molds which must be handled and discarded in accordance with good laboratory practices.

SimPlate

1-800-321-0207

IDEXX Laboratories, Inc.

One IDEXX Drive • Westbrook, ME 04092 USA
Tel 207-856 0496 Fax 207 856 0630

SimPlate™

Test Procedure

1. Dispense prepared food sample onto the center landing pad of the SimPlate
2. Add media to equal a total volume (sample plus media) of 10ml, +/- 0.2ml
3. Distribute liquid into the wells by swirling and pour off excess
4. Incubate for 24 hours at appropriate temperature (not to exceed 37°C)
5. Count positive wells and refer to MPN Table
6. Dispose of SimPlate in accordance with Good Laboratory Practices

Normal Counting Range MPN Table*

Positive Wells	MPN	Positive Wells	MPN	Positive Wells	MPN
1	= 2	31	= 76	61	= 216
2	= 4	32	= 80	62	= 224
3	= 6	33	= 84	63	= 232
4	= 8	34	= 86	64	= 240
5	= 10	35	= 90	65	= 248
6	= 12	36	= 94	66	= 256
7	= 14	37	= 96	67	= 266
8	= 16	38	= 100	68	= 276
9	= 18	39	= 104	69	= 288
10	= 22	40	= 108	70	= 298
11	= 24	41	= 112	71	= 312
12	= 26	42	= 116	72	= 324
13	= 28	43	= 120	73	= 338
14	= 30	44	= 124	74	= 354
15	= 32	45	= 128	75	= 372
16	= 36	46	= 132	76	= 392
17	= 38	47	= 136	77	= 414
18	= 40	48	= 142	78	= 440
19	= 42	49	= 146	79	= 470
20	= 46	50	= 150	80	= 508
21	= 48	51	= 156	81	= 556
22	= 50	52	= 160	82	= 624
23	= 54	53	= 166	83	= 738
24	= 56	54	= 172	84	= >738
25	= 58	55	= 178		
26	= 62	56	= 184		
27	= 64	57	= 190		
28	= 68	58	= 196		
29	= 70	59	= 202		
30	= 74	60	= 208		

Example:

25g of meat is stomached with 225ml of buffer
 Expected bio-load is <16,000 cfu/g

Sample Volume of Stomached Material (1/10 Dilution)
 Media Volume
 # Positive Wells
 MPN from Table
 Dilution Factor
 CFU/g

	Plate 1	Plate 2
	1ml	0.1 ml
	9 ml	10 ml
	84	32
	>738	80
	10	100
	>7380	8000

*This MPN table corrects for the pouring off of some of the food sample during testing.