

Fungos xerofílicos: métodos para isolamento e enumeração

(Xerophilic Fungi: Methods for isolation and enumeration)

Pricila Maira da Silva¹; Igor Emanuel Ribeiro de Souza¹; Marcos Henrique Centurione Ramos²; Wellington Marcelo Queixas Moreira²; Aniele Pianoscki de Campos²

¹Graduação – Centro Universitário UNIFAFIBE – Bebedouro, SP.
pricilamaira@ig.com.br; igor29@hotmail.com.br.

²Centro Universitário UNIFAFIBE – Bebedouro SP
marcos112112@gmail.com; moreira.well@gmail.com; apianoscki@yahoo.com.br.

Abstract. Xerophilic fungi are distinguished by their ability to grow under conditions of low water activity. They complete their cycle of life in concentrated or dried substrate in the presence of high levels of soluble solids of salt or sugar. Most fungi grow well in the range of 0.80 a_w , while the mediums culture routinely used for general enumeration, as the DRBC, PDA, PDA antibiotic, Sabouraud Dextrose Agar and Malt Extract Agar a_w is between 0,990- 0.999. Medium Culture for isolation and enumeration of Xerophilic fungi are generally based on the exclusion of microorganisms non-Xerophilic by adding solutes to reduce a_w such as glucose, sucrose, sorbitol, glycerol and sodium chloride.

Keywords: *Aspergillus; Penicilium; Heat-resistant.*

Resumo. Fungos Xerofílicos são distintos pela habilidade de crescimento em condições reduzidas de atividade de água. Eles completam seu o ciclo de vida em substratos secos ou concentrados, e na presença de níveis elevados de sólidos solúveis de sal ou açúcar. As maiores dos fungos crescem bem em a_w na faixa de 0,80, enquanto os meios rotineiramente usados para enumeração geral, como o DRBC, o PDA, o PCA com antibiótico, Ágar Sabouraud Dextrose e o Ágar Extrato de Malte tem a_w entre 0,990-0,999. Os meios para isolamento e enumeração dos fungos xerofílicos são geralmente baseados na exclusão dos microrganismos não xerofílicos, pela adição de solutos para reduzir a a_w , como a glicose, a sacarose, o sorbitol, o glicerol e o cloreto de sódio.

Palavras-chave: *Aspergillus; Penicilium; Termorresistente.*

Introdução

Fungos xerofílicos são diferenciados pela capacidade de se desenvolverem em atividade de água (a_w) abaixo de 0,85, mesmo que não em toda e qualquer condição de pH, temperatura, potencial redox e outros fatores de crescimento (PITT, 1996).

De acordo com TANIWAKI, a Atividade de água (a_w), é uma definição química da relação entre a pressão de vapor de um determinado material (p) e a pressão de vapor da água pura (p_0), nas mesmas condições: ($a_w = p/p_0$). Os valores de atividade de água são numericamente iguais aos de umidade relativa de equilíbrio (ERH), expressados como decimal. Por exemplo, se uma amostra qualquer de um alimento for mantida em um frasco selado, a uma temperatura constante, até que a água da amostra entre em equilíbrio com o vapor de água do ar, no espaço livre do frasco, a atividade de água do alimento será igual à umidade relativa de equilíbrio do ar dividida por 100: a_w (alimento) = ERH (ar) /100 (TANIWAKI e SILVA, 2001).

A atividade de água de um alimento reflete a quantidade de água livre disponível, isto é, água não comprometida com ligações químicas, dissolução de solutos, e outros. Assim, quanto maior a atividade de água do produto, maior a quantidade de água livre disponível (TANIWAKI e SILVA, 2001).

Os xerofílicos moderados são definidos como aqueles capazes de crescer em a_w abaixo de 0,85, mas não são fastidiosos em seus requerimentos de condições especiais para crescimento. Neste grupo, encontram-se as espécies de *Penicillium*, *Aspergillus* (particularmente a série de *Aspergillus restrictus*) e *Eurotium* (série *Aspergillus glaucus*), as linhagens de *Wallemia sebi* e poucos outros (SAMSON, 2002).

A maioria dos fungos possuem a capacidade de se desenvolverem em baixa atividade de água, no entanto, conseguem se desenvolverem também em a_w alta. Para algumas espécies é vital a condição de baixa a_w para crescimento e desenvolvimento de colônias nos meios de recuperação. Essa condição é alcançada através da adição de humectantes como o cloreto de sódio, os álcoois poli hídricos (glicerol ou propileno glicol) e os açúcares (glicose, frutose ou sacarose) (SAMSON, 2002).

Fungos xerofílicos moderados são os que possuem a capacidade de crescer em a_w abaixo de 0,85, mas não necessitam de meio específico para crescimento. Neste grupo,

encontram-se as espécies xerofílicas de *Penicillium*; *Aspergillus* (particularmente a série de *Aspergillus restrictus*) e *Eurotium* (série *Aspergillus glaucus*), as linhagens de *Wallemia sebi* e poucos outros (SAMSON, 2002).

Os xerofílicos fastidiosos extremos são aqueles que, além de exigirem a_w reduzida para crescimento, também se desenvolvem muito pouco quando o soluto no meio de cultura não é um açúcar. Nesse grupo encontram-se *Xeromyces bisporus*, *Chrysosporium fastidium*, *Chrysosporium farinicola*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium xerophilum*, *Eremascus albus* e *Eremascus fertilis*. Os fungos *Basipeptospora halophila* e *Polupaecium pisce* são descritos como bolores halofílicos, que crescem melhor na presença de cloreto de sódio do que em meios só com carboidratos (SAMSON, 2002). Muito das espécies dos fungos Xerofílicos são geralmente encontrados no solo, sua temperatura ótima de crescimento 25° a 37°C e não são capazes de produzir Micotoxina.

Objetivo

O presente estudo tem por finalidade testar meio de cultura desenvolvido em laboratório para detectar a presença de fungos xerofílicos em amostragem de suco de laranja concentrado, uma vez que os meios de cultura convencionais mostraram-se ineficazes em detectar a presença desses microrganismos.

Materiais e Métodos

Procedimentos para enumeração de fungos xerofílicos

Os métodos padrões de análises para detecção de fungos em alimentos são inadequados para gêneros como o *Chrysosporium*, que não se desenvolvem em atividades elevadas de água (KINDERLERER, 1998).

Os meios para isolamento e enumeração dos fungos xerofílicos são geralmente baseados na exclusão dos microrganismos não xerofílicos, pela adição de solutos para reduzir a a_w , como a glicose, a sacarose, o sorbitol, o glicerol e o cloreto de sódio (BEUCHAT e HOCKING, 1990).

Para a enumeração de xerofílicos, é recomendada a técnica de espalhamento superficial de diluições apropriadas no meio de cultura com a_w reduzida. A técnica do plaqueamento em profundidade não é recomendada porque os xerofílicos estressados requerem alta tensão de oxigênio para recuperação. Além disso, o desenvolvimento da colônia dentro do ágar é mais lento do que na superfície, dificultando a enumeração (TANIWAKI e SILVA, 2001).

Tem sido recomendado o uso de diluentes contendo glicose, sacarose, ou cloreto de sódio para proteger os propágulos dos fungos xerofílicos, particularmente, no caso de “stress” ou injúria. A hidratação lenta dos alimentos, mantendo-os de molho no diluente por 1 hora, antes da homogeneização, tem aumentado a recuperação de esporos fúngicos e de células de leveduras, diminuindo o tempo de germinação e aumentando a taxa de crescimento após o plaqueamento (HOCKING & PITT, 2009).

TESTES

1° Teste – Após a coleta de 1 (uma) amostra, esta foi homogeneizada em água tamponada e inoculada utilizando-se o método *pour plate*, em placas com PDA (Potato Dextrose Agar + ácido tartárico 10%) acidificado, e Incubado a 21° e 4°C. Após o processo de inoculação, as placas foram incubadas a 21°C durante 6 dias.

2° Teste A – Para esse teste, foram utilizados os seguintes meios de cultura formulados em laboratório:

Glicose	200.0 g
Sacarose.....	200.0 g
Extrato de levedura.....	10.0 g
Bacto Agar	10.0 g
Água deionizada ou destilada.....	580 ml

Após diluição, o meio foi esterilizado a 110°C durante 10 minutos.

Também foi utilizado o meio Potato Dextrose Agar, incubado a 21°C, 15°C e 4°C, utilizando-se as técnicas de inoculação *spread plate* (técnica de plaqueamento em superfície) e *pour plate* (técnica de plaqueamento em profundidade). Após o período de incubação, as amostras foram submetidas ao choque térmico, 70°C por 20 minutos utilizando os mesmos meios de cultura acima e temperatura.

2°*Teste B* - Foi realizada a inoculação em placas de Petri utilizando o Meio *OGYEA* (*Oxitetraciclina Glucose Yeast Extract Agar*).

3°*Teste* – Exposição a Luz UV

Placa Inoculada por Spread Plate em Meio *OGYEA* com Fungo Teste a temperatura ambiente, com exposição de 12 horas em Luz UV - 365 nm e 254 nm. Manteve-se a placa aberta para não ocorrer interferência do plástico da placa pela UV.

4°*Teste* – Ácido Peracético

Foi preparado uma solução de Vortexx (nome comercial de sanitizante a base de ácido paracético e peróxido de hidrogênio) á 300 ppm. Efetuou-se aplicação de 10 ml do inócuo dentro da solução e após 3 minutos foi feita uma inoculação; após 5 minutos foi realizada outra inoculação em placas de *OGYEA* e Meio Formulado.

5° *Teste* – Análises em amostras de diversos sucos concentrados.

Discussões e Resultados

O primeiro teste apresentou os seguintes resultados:

Placas incubadas a 21°C durante 6 dias, 9 dias, 15 e 20 dias, houve pouco crescimento (lento) do fungo, apenas 1 colônia e pequena. Na simulação de anaerobiose não houve crescimento. Placas incubadas a 4°C por 6 dias, 9 dias, 15 e 20 dias, não houve crescimento e a simulação de anaerobiose não houve crescimento. Após análises, verificou-se que, por se tratar de um Bolor Xerofílico, o meio de cultura *Potato Dextrose Agar* não é adequado para crescimento deste Fungo.

Segundo teste:

Pode-se observar crescimento de variados Fungos Filamentosos (*Penicilium*, etc.) Com 4 dias de Incubação, ocorreu crescimento nas temperaturas de 21°C e 15°C. O Meio *OGYEA* (*Oxitetraciclina Glucose Yeast Extract Agar*) mostrou-se eficaz em detectar os fungos que estavam na amostra em apenas 4 dias de Incubação. Quanto ao meio formulado específico para o Fungo Xerofílico, foi possível detectar seu desenvolvimento em 5 dias de Incubação. Após 26 dias de incubação a 4°C, observou-se o crescimento do Fungo Xerofílico. Quanto ao Meio PDA, este não foi efetivo em nenhuma temperatura. Não foram detectados fungos termorresistente neste inoculo.

Terceiro teste: Placas incubadas a 21°C por 5 dias

Observa-se uma degradação do Meio de Cultura (marrom escuro). Geralmente o meio de Cultura OGYEA tem uma coloração amarelada. Após 3 dias de Incubação, ocorreu o crescimento de apenas 1 Fungo, notando-se que neste teste, 12 horas de exposição à luz UV não foi o suficiente para eliminá-los.

Quarto teste: Placas incubadas a 21°C por 5 dias

Não houve crescimento de Fungos nos Meios OGYEA e meio Formulado. Houve crescimento de Leveduras, demonstrando que Ácido Peracético se mostrou eficiente para eliminação dos fungos, com tempo de ação em 3 minutos e 5 minutos.

Quinto teste: Análises em amostras de diversos sucos concentrados.

Amostras de diversos sucos concentrados disponível no mercado.

*UFC: Unidade formadora de colônia.

AMOSTRA	PDA 21°C – 5 dias	OGYEA 21°C – 5 dias	FORMULADO 21°C–5 dias
SAMPLE 1	20 UFC*/ml LEVEDURAS	40 UFC/ml LEVEDURAS	70 UFC/ml LEVEDURA
SAMPLE 2	210 UFC/ml LEVEDURAS presença de Rhodotorula	300 UFC/ml LEVEDURAS – presença de Rhodotorula	110 UFC/ml LEVEDURAS
SAMPLE 3	10 UFC/ml FUNGO	10 UFC/ml FUNGO	10 UFC/ml LEVEDURA
SAMPLE 5	50 UFC/ml LEVEDURAS	30 UFC/ml LEVEDURAS	10 UFC/ml LEVEDURA
SAMPLE 6	40 UFC/ml LEVEDURAS	80 UFC/ml LEVEDURAS – presença Rhodotorula 10 UFC/ml FUNGOS	80 UFC/ml LEVEDURA
SAMPLE 7	20 UFC/ml LEVEDURA	20 UFC/ml LEVEDURA	0 UFC/ml
SAMPLE 8	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml

Considerações finais

Para que seja feita a identificação específica de Fungos Xerofílicos, foi necessário utilizar um Meio de Cultura específico para ele. O Meio que se formulou no Laboratório mostrou-se eficiente para o Crescimento deste Fungo Específico (*Chrisosporium spp.*).

Quanto ao Meio de Cultura OGYEA, este mostrou-se eficiente em detectar ocorrência de Fungos Filamentosos na amostragem. Com apenas 5 dias obtivemos um ótimo crescimento. O mesmo não aconteceu com o Meio de Cultura (PDA – Potato Dextrose Agar + Ácido Tartárico 10%) que é utilizado no dia-a-dia para amostras de FCOJ (suco de laranja concentrado congelado). Crescimento muito lento (15 dias) ou nulo.

Em nenhuma das amostras analisadas foi detectada a presença de Fungos Termoresistentes. Entretanto, detectou-se o crescimento de Leveduras no meio formulado – confirmação de Levedura Osmotolerante (Leveduras capazes de tolerar altas concentrações de açúcares.)

Não houve crescimento de Fungos Xerofílicos. Mas foram encontrados Fungos no Meio OGYEA, a presença de *Rhodotorula* no meio OGYEA é mais evidente do que no meio PDA (Potato Dextrose Agar).

Referências

BEUCHAT, L. R.; HOCKING, D. A. (1990): *Some Considerations when Analyzing Foods for the Presence of Xerophilic Fungi*, *J. Food Protection*, Vol. 53, 11,984—989.

HOCKING, Ailsa D.; PITT, John I. – *Fungi and Food Spoilage* – Springer- Third Edition, 2009.

KINDERLERER, J.K, *Chrysosporium species, potential spoilage organisms of chocolate*. *Journal of Applied Microbiology* 01/1998; 83(6):771-8

SAMSON, R. A. et al. *Introduction to food and airborne fungi*. 6. ed. Netherlands: Centralbureau voor schimmelcultures, 2002.

PITT, J.I. et al. *Food mycology*. 3. ed. Washington: EDITORA, 1996.

TANIWAKI, Marta H.; SILVA, Neusely da. – *Treinamento em Fungos em Alimentos (Ocorrência e Detecção)* 2001.

Recebido em 23/04/2015

Aprovado em 03/08/2015