

**ISOLAMENTO DE FUNGOS EM DIFERENTES ALIMENTOS DESTINADOS A
ALIMENTAÇÃO DE BOVINOS**

MARIA MARLUCIA GOMES PEREIRA¹, LUCAS SILVEIRA TAVARES², ELIANA PINHEIRO
DE CARVALHO³, GUILHERME PRADO⁴, CARLOS ALBERTO DA ROCHA ROSA⁵

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de amostras de alimento destinado ao consumo bovino coletadas diretamente em fazendas leiteiras e avaliadas quanto à contagem total e isolamento de fungos. Durante as coletas foram adquiridas amostras de aproximadamente 1 kg de ração, farelo de soja, farelo de soja e trigo e caroço de algodão, as quais foram homogeneizadas diretamente no depósito, e só então era retirada a amostra. Foram analisadas um total 40 amostras, as quais corresponderam a um total de 35 amostras de ração (a base de milho), 3 de farelo de soja, 1 de farelo de soja e trigo e 1 de caroço de algodão. As contaminações fúngicas estavam presentes em 100% das amostras. A microbiota fúngica apresentou um valor médio da ordem de 4,83 (\log_{10}/g) no meio DRBC, 3,55 no meio DG18 e 2,28 no meio AFPA. Os gêneros fúngicos de maior prevalência na ração foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* e, com um percentual menor, os gêneros *Alternaria*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces*. No farelo de soja, os gêneros de maior frequência foram *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, seguidos pelos gêneros *Cladosporium*, *Eurotium* e *Alternaria*, com um percentual inferior. No misto de farelo de soja e trigo, os gêneros de maior predominância foram *Penicillium*, *Fusarium*, e *Aspergillus*. No caroço de algodão, como gêneros de maior predominância, tivemos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Curvularia*, seguidos dos gêneros *Alternaria* e *Cladosporium*.

Palavras-chaves: ração, farelo de trigo, farelo de soja, caroço de algodão, fungos, isolamento

INTRODUÇÃO

Alguns fungos são capazes de produzir substâncias denominadas micotoxinas. Tais substâncias são responsáveis por transtornos tanto na saúde animal quanto para o homem. Em alguns países representam perdas de extrema significância, além de serem responsáveis por problemas relacionados à saúde pública.

O controle de fungos tem sido uma grande preocupação para os órgãos competentes. O crescimento do fungo, uma vez estabelecido, pode promover a síntese de micotoxinas, embora nem sempre a presença do fungo signifique presença da toxina ou vice-versa.

A aflatoxina pode ser produzida por três espécies de *Aspergillus*: *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. O *A. flavus* produz apenas AFB₁ e AFB₂, enquanto as outras duas espécies produzem aflatoxina B e G (Creppy, 2002).

Alguns fatores como temperatura, umidade e substrato exercem importante papel no crescimento dos fungos e na síntese das micotoxinas. Condições adequadas de colheita e armazenamento são de extrema relevância no contexto geral do controle de micotoxinas.

As espécies de *A. parasiticus* e *A. flavus* necessitam de temperatura, umidade e atividade de água que favoreçam sua proliferação. A temperatura e a atividade de água geralmente interagem

¹ Professor Adjunto, UFPI

² Mestrando em Ciência dos Alimentos, DCA/UFLA

³ Professor Adjunto, DCA/UFLA

⁴ Pesquisador em Saúde e Tecnologia, FUNED

⁵ Professor Adjunto, UFRJ

estimulando a síntese de micotoxina. Para D'Mello & Macdonald (1997), o risco da presença de micotoxinas em alimentos é maior em produtos oriundos de trópicos úmidos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de amostras de alimento destinado ao consumo bovino coletadas diretamente em fazendas leiteiras e avaliadas quanto à contagem total e isolamento de fungos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das Amostras

As amostras de alimento foram obtidas em fazendas leiteiras em quantidade correspondente a aproximadamente 1 kg. Estas estavam acondicionadas em sacos de aproximadamente 60 kg ou em tambores de aço, e a amostra correspondia ao alimento disponível no dia da coleta. Durante as coletas foram adquiridas amostras de ração, farelo de soja, farelo de soja e trigo e caroço de algodão, as quais eram homogeneizadas diretamente no depósito, e só então era retirada a amostra.

Foram analisados um total 40 amostras, as quais corresponderam a um total de 35 amostras de ração (a base de milho), 3 de farelo de soja, 1 de farelo de soja e trigo e 1 de caroço de algodão.

Isolamento e Contagem da Microbiota

A contagem de unidades formadoras de colônias (ufc g⁻¹) de fungos filamentosos e leveduras foi realizada segundo metodologia de diluição decimal seriada descrita por Pitt & Hocking (1997), conforme a seguir:

Foram agitadas em liquidificador, com copo esterilizado, 50 gramas da amostra em 450 mL de água peptonada a 0,1%. A partir dessa diluição inicial (10⁻¹), prepararam-se diluições decimais seriadas até 10⁻⁵. Os inóculos foram alíquotas de 1mL por placa de Petri (em triplicata) de cada uma das diluições nos meios de cultivos, tais como: Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol (DRBC), utilizado para contagem geral (King et al., 1979; Dichloran 18% Glicerol Agar (DG18), que é um meio seletivo para fungos xerofílicos (Hocking & Pitt, 1980); *Aspergillus flavus e parasiticus* Agar (AFPA), utilizado para o isolamento e a diferenciação de cepas aflatoxígenas (Bothast & Fennell, 1974), e o meio de Nash-Snyder Agar (NSA) para isolamento de espécies do gênero *Fusarium* (Nelson et al., 1983).

As placas de DRBC, DG18, AFPA foram incubadas a 28 °C por sete dias em ausência de luz. As placas de NSA foram incubadas a 25 °C por 7 dias em fotoperíodos de 12 horas sob luz fria e 12 horas de luz negra. Todas as placas foram observadas diariamente, sendo selecionadas as que apresentaram (ufc) em torno de 10 a 100 (Dalcero et al., 1997; Dalcero et al., 1998).

A identificação e isolamento dos fungos foi realizada no Laboratório do Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas (NPMM/UFRRJ) do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Resultados e Discussão

Os valores médios da contagem de fungos (log₁₀/g) nos meios DRBC, DG18 e AFPA (Figura 1) representam 4,83 com oscilações de 2,25 a 8,38; 3,55 com oscilações de 2 a 7,41 e 2,28 com oscilações de 1 a 5,58, respectivamente. As contaminações fúngicas estavam presentes em 100% das amostras. O meio DRBC restringe o espalhamento das colônias sem afetar excessivamente a germinação dos conídios. Já o meio DG18 é usado na enumeração de fungos em alimentos de baixa umidade, ou seja, favorece o crescimento de fungos xerofílicos. O meio AFPA é recomendado para a detecção e enumeração de fungos potencialmente aflatoxigênicos, como *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Em um misto de alimento animal, Abarca et al. (1994) obtiveram valores em

\log_{10}/g que variaram de 2 a 8. Em amostras de rações para bovinos, Martins (1987) apud Martins (2001) encontrou valores médios de 4,93 \log_{10}/g e Martins (2001) obteve valores médios da ordem de 4,82, oscilando entre 2,76 a 5,23 \log_{10}/g .

De acordo com o mesmo pesquisador, em matérias-primas ou numa ração de boa qualidade microbiológica o teor de fungos não deve ser maior que 5 \log_{10}/g e o desenvolvimento das populações fúngicas nos alimentos promove um estado de deterioração logo que estas alcançam teores totais da ordem de 7,5 \log_{10}/g . No experimento observou-se que, no meio DRBC que cerca de 21 das 35 amostras de ração analisadas (60%) apresentaram contagem de fungos menor que 5 \log_{10}/g valores, que segundo Smith & Moss (1985) apud Martins & Martins (2001) constituem boa qualidade microbiológica, 12 amostras (34,3%) apresentaram-se com contagens entre 5 e 7,5 \log_{10}/g . e 2 amostras (5,7%) apresentaram contagens superiores à 7,5 \log_{10}/g , podendo se dizer que estes últimos produtos são impróprios para o consumo animal, ou seja, nestes valores o alimento não deveria ser analisado quanto à presença de micotoxinas pois em tais condições o mesmo apresenta-se com suas propriedades organolépticas alteradas.

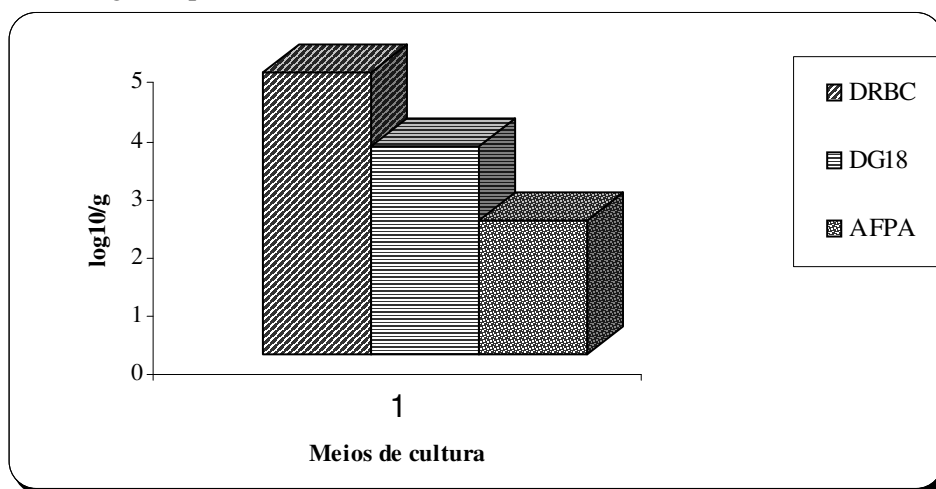


Figura 1 - Valores médios da contagem de fungos em \log_{10}/g em alimento bovino da região de Lavras, Sul de Minas Gerais, obtido em três diferentes meios de cultivo.

Na Figura 2 estão apresentados os gêneros fúngicos presentes na ração. De um total de 346 isolados, o gênero *Penicillium* correspondeu a 32,08%, o *Aspergillus* representou 28,32% e o *Fusarium*, 27,45%; com e em um percentual inferior estão os gêneros *Alternaria*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* (4,05; 3,47; 2,31; 1,15 e 1,15, respectivamente).

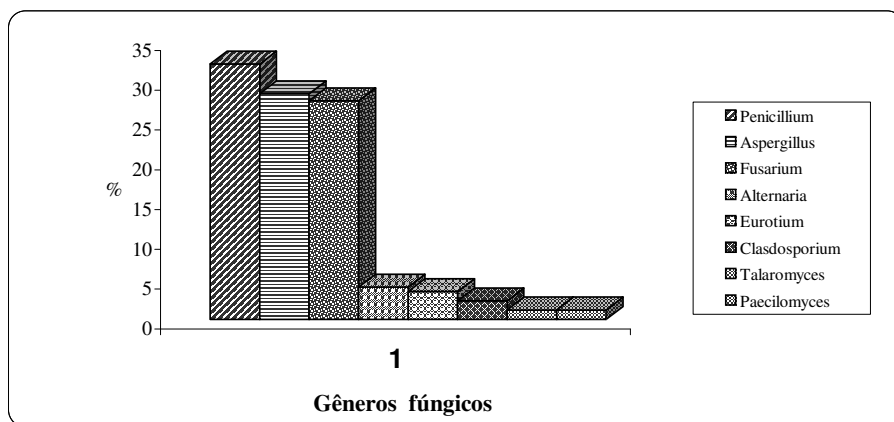


Figura 2 - Gêneros fúngicos de maior prevalência em ração animal na região de Lavras, Sul de Minas Gerais

Os principais gêneros fúngicos isolados de farelo de soja (Figura 3) foram *Fusarium* (37,14%), *Aspergillus* (31,42%) e *Penicillium* (14,28%), seguidos pelos gêneros *Cladosporium*, *Eurotium* e *Alternaria*, representando 11,43 e 2,85%, respectivamente.

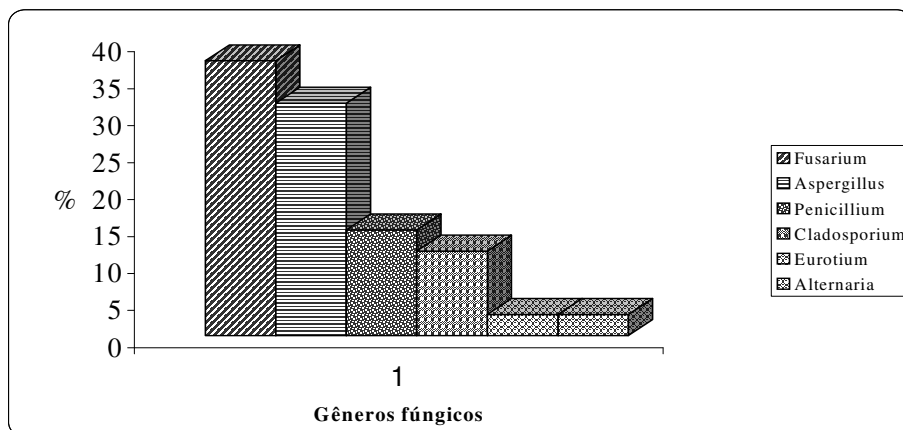


Figura 3- Gêneros fúngicos de maior prevalência em farelo de soja na região de Lavras, Sul de Minas Gerais

Os gêneros fúngicos isolados dos farelos de soja e trigo (Figura 4) foram *Penicillium* (44,44%), *Fusarium* (33,33%) e *Aspergillus* (22,22%). Já no caroço de algodão (Figura 5) constatou-se uma maior predominância dos gêneros *Aspergillus* (36,37%) e *Penicillium* (27,27%), seguidos dos gêneros *Curvularia* (18,9%), *Alternaria* (9,1%) e *Cladosporium* (9,1%).

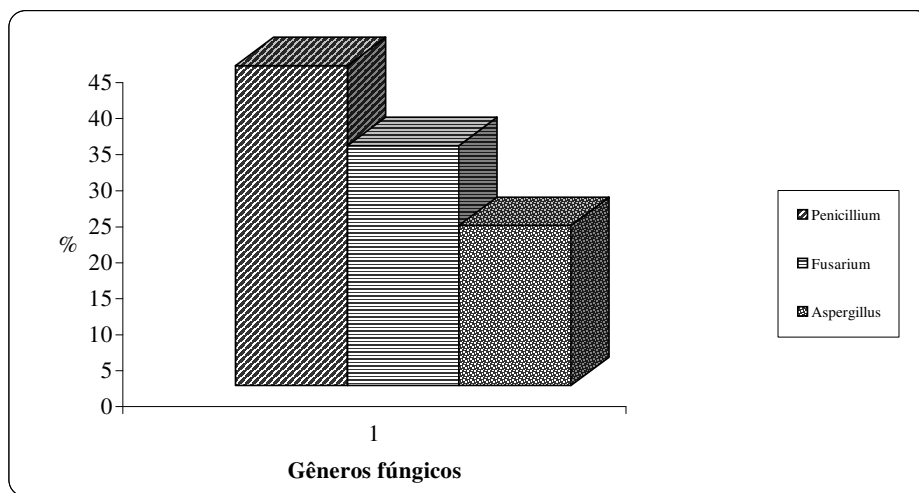


Figura 4 - Gêneros fúngicos de maior prevalência em farelo de soja e trigo na região de Lavras, Sul de Minas Gerais

Martins & Martins (2001) analisaram 189 amostras de ração bovina durante um período de 4 anos e os gêneros predominantes foram *Aspergillus* (91,0%), *Penicillium* (58,0%), *Mucor* (52,3%), *Phoma* (31,6%), *Absidia* (30,3%) e *Fusarium* (20,0%). Os dados diferem em relação aos apresentados em nosso levantamento, em que se observou que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* apresentaram um percentual inferior aos obtidos por tais autores e, ainda, que os gêneros *Mucor*, *Phoma* e *Absidia* não foram isolados em nossas amostras, mas estão em conformidade com o fato de que os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* têm sido evidenciados como os de maior frequência na maioria das pesquisas, convém citar, que o meio utilizado em nosso experimento foi o Dicloran Rose Bengal Cloranfenicol e o meio usado por Martins & Martins (2001) o Rose Bengal Cloranfenicol.

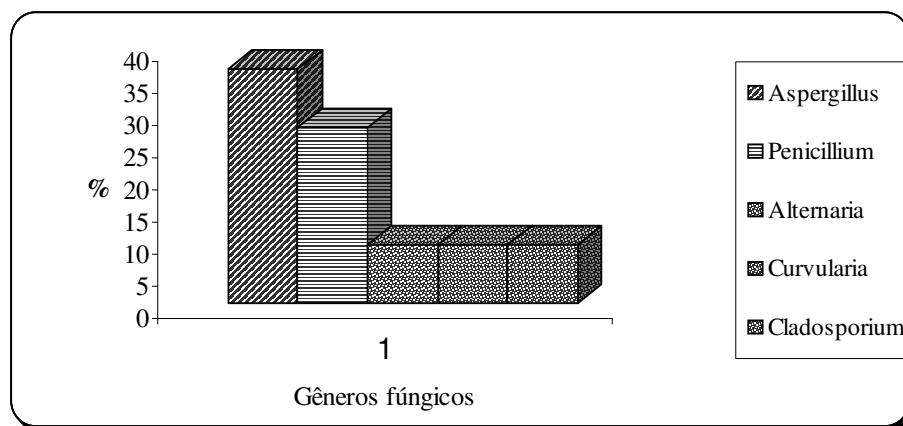


Figura 5 Gêneros fúngicos de maior prevalência em caroço de algodão na região de Lavras, Sul de Minas Gerais.

De acordo com o ICMSF (1996), a microbiota fúngica natural que coexiste com a produção de alimentos é dominada pelos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*, o que está de acordo com os dados do presente estudo em que tais gêneros apresentaram-se com maior frequência nos produtos avaliados, excetuando-se o gênero *Fusarium*, que não foi isolado da amostra de caroço de algodão (Figura 5)

Em levantamento feito por Bullerman (1986) em alimentos como trigo, farinha de milho, soja e milho, as espécies potencialmente toxigênicas presentes foram *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *Fusarium spp*, *P. citinum*, *P. citreo-viride*, *P. cyclospium*, *P. martensii*, *P. patulum*, *P. puberulum*, *P. viridicatum*, *P. expansum*, *P. islandicum*, *P. urticae*, *Alternaria spp* e *Cladosporium spp*. Em nosso levantamento, as espécies de *Aspergillus* isoladas da ração, farelo de soja, farelo de soja e trigo e caroço de algodão foram *A. flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e *A. fumigatus*, *A. candidus*, *A. niveus* e *A. terreus*. Sanchis et al. (1986), em 228 amostras de alimentos testados, verificaram que em 100% das amostras a incidência de fungos foi variável; em amostras de milho, os mesmos autores verificaram uma maior frequência de *A. flavus* (54,5%). Em levantamento feito por Abarca et al. (1994), as espécies mais comuns encontradas em uma mistura de alimento animal foram: *A. flavus* (52,2%), *A. fumigatus* (40%), *A. candidus* (23,2%), *Eurotium chevalieri* (23,2%) e *Fusarium moniliforme* (47,6%).

Em relação ao gênero *Penicillium*, observou-se que apenas a espécie *P. citrinum* esteve presente tanto nos isolados por Bullerman (1986) como nos isolados em nosso trabalho, sendo diferentes as demais espécies predominantes. As espécies de *Penicillium* de maior frequência foram *P. restrictum* e *P. crustosum*, das quais constatou-se presença nos quatro produtos analisados. O gênero *Fusarium* esteve presente na ração, farelo de soja e farelo de soja e trigo (Figuras 2, 3 e 4).

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A microbiota fúngica apresentou um valor médio da ordem de 4,83 (\log_{10}/g) no meio DRBC, 3,55 no meio DG18 e 2,28 no meio AFPA.
- Os gêneros fúngicos de maior prevalência na ração foram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* e, com um percentual menor, os gêneros *Alternaria*, *Eurotium*, *Cladosporium*, *Talaromyces* e *Paecilomyces*.
- No farelo de soja, os gêneros de maior frequência foram *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, seguidos pelos gêneros *Cladosporium*, *Eurotium* e *Alternaria*, com um percentual inferior.
- No misto de farelo de soja e trigo, os gêneros de maior predominância foram *Penicillium*, *Fusarium*, e *Aspergillus*.

XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA
27 de setembro a 01 de outubro de 2010

- No caroço de algodão, como gêneros de maior predominância, tivemos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Curvularia*, seguidos dos gêneros *Alternaria* e *Cladosporium*.
- Das 35 amostras de ração analisadas 21 amostras (60%) apresentaram boa qualidade microbiológica e 2 amostras (5,7%) apresentaram-se impróprias para o consumo.

REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J. Mycoflora and aflatoxin-producing strains in animal mixed feeds. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, n. 3, p. 256-258, Mar. 1994.

ABDEL-FATTAH, H. M.; KAMEL, Y. Y.; MEGALLA, S. E.; HAFEZ, A. H. Aflatoxin and aflatoxicosis. I. Fungal flora of some food and animal feed with special references to aflatoxin-producing abilities. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 77, n. 3, p. 129-135, 1982.

BULLERMAN, L. B. Mycotoxins and food safety. **Food Technology**, v. 40, n.5, p. 59-66, May 1986.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; LUNA, M.; ANCASI, G.; REYNOSO, M. M.; CHIACCHIERA, S.; MIAZZO, R.; PALACIO, G. Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 141, n. 1, p. 37-43, 1998.

DALCERO, A.; MAGNOLI, C.; CHIACCHIERA, S.; PALACIO, G.; REYNOSO, M. M. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.137, n. 3, p.179-184, 1997.

D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 69, n. 1/3, p. 155-166, Nov. 1997.

DUTTON, M. F.; KINSEY, A. Occurrence of mycotoxins in cereal and animal feedstuffs in Natal, South Africa, 1994. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 131, p.31-36, 1995.

HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-Glycerol media for enumeration xerophilic fungi from low moisture foods. **Applied Environmental Microbiology**, v.39, p. 488-492, Mar.1980.

BOTHAST, R. J.; FENNELL, D. I. A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. **Mycologia**, Bronx, v. 66, n. 2, p.365-369, 1974.

KING, A. D.; HOCKING, A. D.; PITT, J. I. Dichloran-Rose bengal medium for enumeration and isolation of fungi from foods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 959-964, May. 1979.

MARTINS, H. M.; MARTINS, M. L. Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal: 1996-1999). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96, n. 538, p. 85-88, 2001.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos**: Características de los patógenos microbianos. Zaragoza: Acribia, p. 403-428, 1996.

MUNIMBAZI, C ;BULLERMAN, L. B. Molds and mycotoxins in foods from Burundi. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 8, p. 869-875, 1996.