



COMPARAÇÃO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO PARA A AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE FERMENTOS BIOLÓGICOS

Suzana Cláudia Silveira Martins¹, Larissa Maria Cidrão Guedes Fiúza², Claudia Miranda Martins³

1. Professora Doutora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (suzana220@gmail.com) Fortaleza-Brasil

2. Graduanda em Engenharia de Alimentos na Universidade Federal do Ceará

3. Professora Doutora do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, Brasil.

Recebido em: 06/05/2013 – Aprovado em: 17/06/2013 – Publicado em: 01/07/2013

RESUMO

Concentrações elevadas de fungos em alimentos industrializados são indicativas de problemas no processamento com conseqüente redução na vida de prateleira dos referidos produtos. No entanto, em fermentos biológicos a concentração de células vivas é fator decisivo na eficiência das fermentações industriais. Em geral, a quantificação de leveduras consiste na inoculação da amostra em meios de cultivo sólidos por plaqueamento em superfície ou em profundidade. De modo geral, os meios de cultura para essa avaliação são seletivos, inibindo o crescimento bacteriano. Infelizmente não se dispõe de um único meio que seja satisfatório para detecção ou quantificação de leveduras. Neste trabalho três diferentes meios de cultura e tempos de incubações foram avaliados na recuperação e contagem de células vivas de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentos desidratados. Foram analisadas 78 amostras de fermento biológico pela técnica do *pour-plate* nos meios de cultura Ágar Sabouraud Dextrose, Ágar Batata Dextrose e Ágar Yeast Moulds por períodos de incubação de 48 e 72 horas. As análises estatísticas não mostraram diferença significativa entre os meios de cultura, mas observou-se diferença significativa a nível de 0.01 entre os tempos de incubação.

PALAVRAS-CHAVE: *Saccharomyces cerevisiae*, leveduras, contagem células

COMPARISON OF DIFFERENT CULTURE MEDIA FOR CELL VIABILITY ASSESSMENT OF COMMERCIAL YEAST

ABSTRACT

Microbiological analyzes of fungi in foods are important to ensure the quality of manufactured products. However, in the case of commercial yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), the cell quantification is very importance, since the concentration of viable cells is responsible for the efficiency of fermentation. The yeast quantification involves inoculating the sample in culture media by plating on solid surface or in

depth. In general, the culture media for this evaluation are selective, eliminating bacterial contamination. Unfortunately did not have a single medium that is suitable for detection and quantification of yeast. In this work the efficiency of three different culture media and influence of incubation times on the recovery and counting of viable cells of *Saccharomyces cerevisiae* dehydrated were evaluated. 78 samples of commercial yeast were evaluated by the pour-plate technique in the culture media Agar Sabouraud, Agar and Potato Dextrose and Agar for Yeasts and Moulds at incubation times of 48 and 72 hours. Statistical analyzes showed no significant difference between the culture media, but there was a significant difference at 0.01 level between the incubation times.

KEYWORDS: *Saccharomyces cerevisiae*, yeasts, cell counting

INTRODUÇÃO

O primeiro processo industrial para a produção de micro-organismos úteis ao homem constituiu-se na obtenção da levedura de panificação, *Saccharomyces cerevisiae*, que a partir de 1860, passou a ser comercializada aos panificadores (LIPINSKY & LITCHFIELD, 1950). A partir de então, registrou-se um aumento significativo na produção industrial dessa levedura, comercializada como fermento biológico, nas formas prensada e seca, passou a ser usada em outros processos industriais, tais como, elaboração de concentrados proteicos, vitamina, álcool etílico, vinhos, cervejas, aguardentes, glicerina, riboflavina, etc (BORZANI, 2008, ARAUJO et al., 2009). A expansão desse mercado foi determinante na evolução tecnológica do processamento de fermentos biológicos (ROCHA et al., 2008) e, a seleção de linhagens de *S. cerevisiae* com elevado poder vegetativo, alta capacidade de multiplicação a temperaturas mais elevadas, fácil conservação e ação enzimática prolongada, é um dos principais fatores para o sucesso dos processos fermentativos (SANTOS et al., 2010).

A eficiência de um processo fermentativo depende fundamentalmente da concentração de células vivas no fermento biológico que, de acordo com BORZANI (2008) é de aproximadamente 10 bilhões por grama. Nesse contexto, o controle do número de células vivas de levedura nos processos industriais é de vital importância.

Entre os métodos para quantificação celular destacam-se os de contagem total, realizados em câmaras de contagens, que embora de rápida execução não diferencia células vivas das mortas. Por outro lado, a contagem de células viáveis em placas, apesar de mais demorado, permite determinar o número de células vivas na amostra (TORTORA, 2012). Nesse método, entre outros parâmetros, é de suma importância à escolha de um meio de cultura eficiente, assim como, do estabelecimento de condições gerais de cultivo que permitam avaliar a adequabilidade dos fermentos biológicos para processos industriais.

A recuperação de leveduras em amostras, como os fermentos biológicos prensados, que apresentam elevada densidade celular desses micro-organismos e reduzida concentração de bactérias e fungos filamentosos, pode ser efetuada por plaqueamento direto da suspensão do material em meio orgânico com elevada concentração de açúcares e moderada acidez. As temperaturas de incubação variam de 20 a 28° C e o tempo de incubação de 48 a 72 horas (WICKERHAM, 1969).

Tradicionalmente o Ágar Batata Dextrose 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 a redução do pH para 3,5 (COPPETI et al., 2009). O mesmo pode ser considerado para o Yeast Mould Agar (AYM) no qual o pH também é ajustado para valores entre 3 e 4 (DIFCO, 2007). Os meios suplementados com antibióticos e corantes, como o Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol, 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 da amostra, devido ao pH mais elevado (5-6) (SAMSON et al., 1996). O Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), denominado simplesmente de Ágar Sabouraud, também apresenta elevadas concentrações de carboidratos e pH 5,6, fatores que favorecem o crescimento de diversos fungos leveduriformes e filamentosos (WINN et al., 2008).

Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar comparativamente a eficiência de três diferentes meios de cultura de amplo emprego para contagem de fungos bem como, os tempos de incubação recomendados para a recuperação e contagem de células vivas de *S. cerevisiae* em fermentos desidratados.

MATERIAL E METODOS

Foram avaliadas em março de 2012, 78 (setenta e oito) amostras de fermento biológico desidratado, embalados a vácuo em pacotes individuais de 500 gramas, provenientes de um único fabricante. Cada amostragem foi preparada a partir de dois pacotes perfazendo um total de 39 (trinta e nove) amostras que foram numericamente identificadas e armazenadas de acordo com as orientações do fabricante até o momento da análise.

As amostras foram processadas segundo metodologia recomendada por SAMSON et al. (1996) para detecção e isolamento de fungos em alimentos. Dez gramas de cada amostra foram pesadas, reidratadas em 90 mL de água peptonada a 0,1% por aproximadamente uma hora. As amostras foram homogeneizadas e preparadas diluições decimais até 10^{-10} .

Foram testados os meios de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), Ágar Batata Dextrose (ABD) e o Ágar Yeast and Mould (AYM) sem a correção de pH ou adição de antibióticos, considerando a reduzida contaminação bacteriana dos fermentos biológicos. Todos os meios avaliados foram obtidos do fabricante Difco e a composição dos mesmos está na Tabela 1.

QUADRO 1: Composição (g/L) e pH dos meios de cultura usados para a recuperação e contagem de células de *S. cerevisiae* de fermentos desidratados

Ágar Sabouraud (g/L)	Ágar Batata (g/L)	Ágar Yeast Mould (g/L)
Peptona 10,0	Extrato de batata* 4,0	Peptona 5,0 Extrato de levedura 3,0 Extrato de malte 3,0
Dextrose 40,0	Dextrose 20,0	Dextrose 10,0
Ágar 15,0	Ágar 15,0	Ágar 20,0
pH 5.6 ± 0.2	pH 5.6 ± 0.2	pH 6.2 ± 0.2

Fonte: DIFCO, 2007; *4.0 g de extrato de batata equivalem a 200g de infusão de batata

A metodologia empregada na contagem de células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* em fermentos foi a técnica do *pour-plate* descrita pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1978). Como preconizado, inoculou-se um mL de cada diluição em placas de Petri estéreis, e, em seguida, 15-20 mL dos meios de cultivo avaliados, mantidos à temperatura de 45-50°C foram adicionados as placas e misturados às amostras diluídas. A incubação foi realizada a 25 °C por 48 e 72 horas (APHA, 2005). Após 48 horas foram selecionadas placas das diluições que apresentaram entre 30-300 colônias de leveduras e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias por grama da amostra (UFC/g). O mesmo procedimento foi repetido após 72 horas.

A análise estatística foi realizada usando um modelo *split-plot* adaptado para o estudo de medidas repetidas. Usou-se o teste de Tukey para comparações de médias (MONTGOMERY, 2012).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão os resultados das concentrações de células viáveis de *S. cerevisiae* de 39 amostras de fermentos desidratados inoculados nos meios de cultura ASD, ABD e AYM. As leituras são correspondentes aos tempos de incubação de 48 e 72 horas. O número de células vivas da levedura *S. cerevisiae* no fermento analisado após 72 horas de incubação, variou de $8,8 \times 10^{10}$ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama, na amostra 7 a $2,9 \times 10^{11}$ na amostra 20. Esses valores estão de acordo com o preconizado pelo fabricante do produto que estabelece valores entre 10^8 a 10^{12} células por grama. Também estão coerentes com BORZONI (2008) que reportam que cada grama de fermento, corresponde a aproximadamente 10^{10} células de leveduras.

TABELA 1: Concentração de células viáveis de *S. cerevisiae* em fermentos desidratados em diferentes meios de cultura e tempos de incubação

Amostras	Concentração Celular (UFC/g x 10 ⁹)					
	Ágar Sabouraud Dextrose (ASD)		Ágar Batata Dextrose (ABD)		Ágar Yeast Mould (AYM)	
	Tempos de Incubação (horas)					
	48	72	48	72	48	72
1	9,85	10,00	10,20	10,80	10,00	10,30
2	5,10	5,30	3,65	4,40	2,35	2,35
3	1,60	2,05	1,35	1,46	1,59	1,68
4	8,60	9,15	7,70	8,05	9,20	9,85
5	5,75	6,05	5,20	5,80	4,60	4,85
6	11,70	12,10	9,30	10,70	11,50	11,70
7	2,05	2,35	0,73	1,65	0,47	0,88
8	8,65	8,90	8,90	9,00	8,95	13,20
9	7,3	7,90	5,75	6,90	3,40	4,40
10	4,60	5,35	3,85	4,60	2,49	3,00
11	7,40	8,40	9,15	10,00	9,00	9,35
12	10,60	11,90	13,60	17,70	13,40	14,30
13	8,45	8,50	6,70	7,35	7,35	7,55
14	10,20	10,60	12,20	12,40	13,20	13,70

15	12,30	12,30	14,40	14,60	15,20	15,30
16	7,90	8,40	9,45	10,00	8,95	9,15
17	5,95	7,00	7,55	8,90	8,70	9,50
18	10,30	13,0	10,80	11,10	10,20	10,40
19	11,00	13,0	10,20	14,00	12,70	15,50
20	27,30	29,0	27,20	29,00	26,50	28,00
21	7,35	7,40	6,10	6,55	6,65	6,90
22	6,20	6,45	7,25	7,35	5,95	6,45
23	7,05	7,25	8,50	8,75	6,85	7,20
24	8,25	8,35	8,40	8,40	7,65	9,15
25	9,80	10,03	10,20	10,20	9,70	10,10
26	6,75	7,55	7,25	7,25	7,65	7,80
27	7,75	7,75	6,95	6,95	7,30	7,60
28	5,30	6,55	9,45	9,45	6,30	7,30
29	12,60	12,70	13,40	13,40	10,40	10,50
30	1,03	10,30	8,05	8,35	8,45	8,70
31	14,50	15,00	14,10	14,20	10,40	10,50
32	8,95	9,15	9,90	10,00	9,15	9,35
33	15,00	15,01	14,30	14,30	11,80	12,40
34	7,30	7,25	7,61	7,80	8,10	8,85
35	8,20	8,40	7,90	8,15	6,65	7,10
36	6,65	6,95	6,45	6,80	7,25	7,35
37	4,90	5,00	4,70	4,95	5,80	6,05
38	7,35	6,05	5,95	6,35	5,35	5,50
39	6,80	6,08	7,20	7,55	7,70	7,80
Média	8,12	9,09	8,71	9,36	8,43	9,01
Desvio padrão	4,37	4,44	4,44	4,72	4,41	4,67

Na prática laboratorial, o meio de cultura e o tempo de incubação mais indicado são aqueles que recuperam maior número de unidades formadoras de Colônias (UFC) (LAZARETTI, 2000). Os três meios de cultivo avaliados apresentam concentrações elevadas de carboidratos 1, 2 e 4%, pH variando de 5.6 a 6.2, enquanto o AYM difere dos demais em relação à adição dos fatores de crescimento extrato de malte e extrato de levedura (Tabela 1). No entanto, não foi constatada diferença significativa na recuperação e contagem de células de levedura das amostras de fermento biológico (Figura 1).

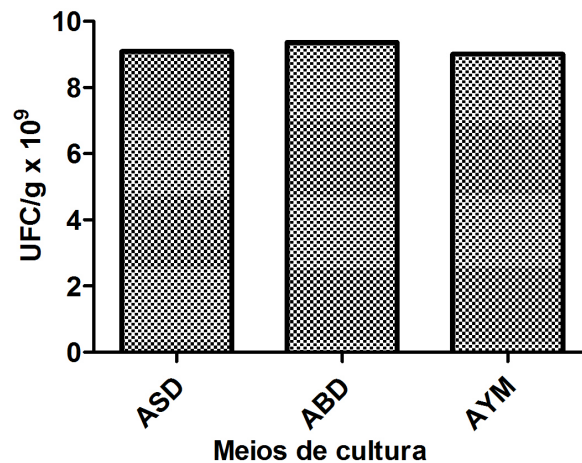


FIGURA 1. Valor médio da concentração de células de *Saccharomyces cerevisiae* após 72 h de incubação a 25 °C nos meios de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), Ágar Batata Dextrose (ABD) e Ágar Yeast Moulds (AYM)

Com relação ao tempo de incubação, as análises estatísticas indicaram diferenças significativas entre as contagens realizadas após 48 e 72 horas (Figura 2).

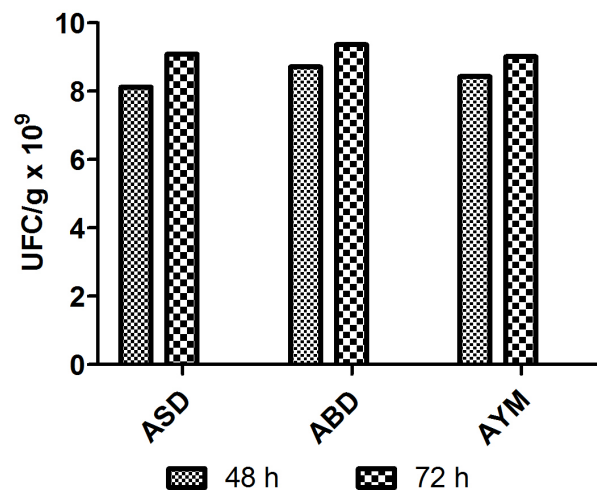


FIGURA 2. Valor médio da concentração de células de *Saccharomyces cerevisiae* após 48 e 72 h de incubação a 25 °C nos meios de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), Ágar Batata Dextrose (ABD) e Ágar Yeast Moulds.

BOVIL et al., (2001) compararam seis meios seletivos para recuperação e enumeração de leveduras probióticas a partir de ração animal. Foram testados os meios Ágar Extrato de Malte Acidificado (AEMA), CHROMagar Candida, Ágar Dicloran Rosa-Bengala Cloranfenicol (ADRBC), Ágar Molibdato Oxytetraciclina Glicose Extrato de levedura. O maior índice de recuperação celular foi observado no Ágar Molibdato Oxytetraciclina Glicose Extrato de levedura. DEAK et al., (2001) compararam os meios Ágar Dicloran 18% Glicerol (ADG18), Ágar Dicloran Rosa-Bengala Cloranfenicol (ADRBC), Ágar Triptona Glicose Extrato de levedura Cloranfenicol (ATGEC) e Ágar Plate Count suplementado com Cloranfenicol (APCC) para enumeração de leveduras deteriorantes em alimentos. Os autores não detectaram diferenças significativas entre os meios avaliados.

TANIWAKI et al., (2001) avaliaram a eficiência do Ágar Dicloran Rosa-Bengala Cloranfenicol (ADRBC), Ágar Dicloran 18% Glicerol (ADG18), Ágar Batata Dextrose suplementado com antibióticos e os três apresentaram eficiência semelhante. BEUCHAT et al., (2001) encontraram a seguinte sequência de eficiência em meios de cultura para recuperação de leveduras deteriorantes em alimentos desidratados Ágar Triptona Extrato de Levedura Cloranfenicol (ATGEC) > APCC = Ágar Soro de Laranja (ASL) > Ágar Batata Dextrose Acidificado (ABDA) > (ADRBC) > (ADG18).

VILJOEN et al., (2004) em uma avaliação interlaboratorial com 11 diferentes meios seletivos para a detecção e enumeração de leveduras em queijos constataram que Ágar Rosa-Bengala Cloranfenicol (ARBC), Ágar Dicloran Rosa-Bengala Cloranfenicol, (ADRBC), Ágar Dicloran 18% Glicerol (ADG18) e Ágar Extrato de Malte suplementado com NaCl e oxitetraciclina (AEMS) foram adequados para o desenvolvimento de leveduras não sendo observadas diferenças significativas entre as contagens obtidas. BEUCHAT et al., (2007) em estudo semelhante com frutas e vegetais secos concluíram que embora os meios ADG18 seja aceitável para enumeração de bolores e leveduras o meio ADRBC foi responsável pela recuperação de um maior número de células. ALBAUM & MASPHY (2009) também constataram que os meios ADRBC e Ágar Aureomicina Rosa-Bengala Glicose Peptona foram igualmente eficientes na recuperação de leveduras em amostras de água.

Embora no presente estudo os meios de cultura e as amostras avaliadas tenham sido diferentes dos citados na literatura, os resultados obtidos indicaram que a determinação da concentração de leveduras em fermentos biológicos, pelo método de contagem de células viáveis em placas, pode ser efetuada em qualquer um dos meios de cultura (ASD, ABD e AYM). Portanto, a análise de custo é importante na seleção do meio de cultura e pode ser um parâmetro econômico usado pelos laboratórios de controle de qualidade em indústrias de fermento biológico. Por outro lado, os resultados relativos ao tempo de incubação mostraram que a redução desse tempo de 72 para 48 horas, embora economicamente desejável, não é recomendável.

CONCLUSÕES

Os meios de culturas Ágar Sabouraud Dextrose, Ágar Batata Dextrose e Ágar Yeast Moulds são igualmente eficientes para recuperação e contagem de células vivas de leveduras em fermentos biológicos. Portanto, a análise de custo é importante para seleção dos meios de cultura.

O tempo de incubação recomendado para contagem de leveduras é de 72 horas.

REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 2005. 21th, Washington. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Washington.

ARAUJO, L.F.; DIAS, M.V.C.; BRITO, E.A.; OLIVEIRA-JUNIOR, S. Enriquecimento proteico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 3, n.3, p. 47-53, 2009.

BEUCHAT, L.R.; MANN, D.A.; GURTLER, J.B. Comparison of dry sheet media and conventional agar media methods for enumerating yeasts and molds in food. **Journal of Food Protection**, v.70, n.11, p. 2661-2664, 2007.

BEUCHAT, L.R.; FRANDBERG, E.; DEAK, T.; ALZAMORA, S.M.; CHEN, J.; GUERRERO, A.S.; LÓPEZ-MALO, A.; OHLSSON, I.; OLSEN, M.; PEINADO, J.M.; SCHNURER, J.; de SILONIZ, M.I.; TORNAI-LEHOCZKI, J. Performance of mycological media in enumerating desiccated food spoilage yeasts: an interlaboratory study. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, n.1-2, p. 89-96, 2001.

BORZANI, W. Algumas aplicações industriais in BORZANI,W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**, v. 1, p. 253-254, 2008.

BOVILL, R.; BEW, J.; ROBINSON, S. Comparison of selective media for the recovery and enumeration of probiotic yeasts from animal feed. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n.1-2, p: 55-61, 2001.

COPETTI, M.V.; SANTURIO, J.M.; CAVALHEIRO, A.S.; ALVES, S.H.; FERREIRO, L. Comparison of different culture media for mycological evaluation of commercial pet food. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n.4, p. 329-335, 2009.

DEAK, T.; CHEN, J.; GOLDEN, D.A.; TOMAI-LEHOCZKI, J.; VILJOEN, B.C.; WYDER, M.T.; BEUCHAT, L.R. Comparison of dichloran 18% glycerol (DG18) agar with general purpose mycological media for enumerating food spoilage yeasts. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, n.1-2, p:49-53, 2001.

DIFCO Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Procedures. 9^a ed. Difco Laboratories University of Michigan, 2007, 350p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS-ICMSF. **Microorganism in foods. 1: Their significance and methods of enumeration**. 2^a ed. Toronto: University of Toronto Press 1978, 436p.

LAZARETTI, K.L.S.; BEUX, M.R.; PIMENTEL, I.C.; TALAMINI, A.; GABARDO, J. Comparação entre os meios de cultura para contagem de fungos no controle

microbiológico de erva-mate. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n.2, p. 163-170, 2000.

LIPINSKY, E.S.; LITCHFIELD, J.H. Bacterial and chemical analysis of mayonnaise, salad dressing and related products. **Journal of Food Science**, v. 15, n.2, p. 138-145, 1950.

MONTGOMERY, D.C. **Design and Analysis of Experiments**. 8th Edition. Willey & Sons, New York, 2012, 752p.

ROCHA, A.P.T.; ALSINA, O.L.S.; SILVA, V.S.; DA SILVA, F.L.H. Cinética de produção de levedura seca em leite de jorro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, n.1, p.81–86, 2008.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTEMBORG, O. Methods for the detection and isolation of food-borne fungi. In: SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTEMBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. CBS, The Netherlands, 1996, 5th ed, p. 261-269.

SANTOS, J.R.A.; GUSMÃO, N.B.; GOUVEIA, E.R. Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e agitação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n.1, p. 75-80, 2010.

TANIWAKI, M.H.; SILVA, N.; BANHE, A.A.; IAMANAKA, B.T. Comparison of culture media, simplate, and petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. **Journal of Food Protection**, v.64, n.10, p:1592-1596, 2001.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10^a.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 934p, 2012.

WICKERHAM, L.G. New homothallic taxa of *Hansenula*. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v. 37, n.1, p. 15-32, 1969.

VILJOEN, B.C.; KNOX, A.; BEUCHAT, L.R.; DEAK, T.; MALFEITO-FERREIRA, M.; HANSEN, T.K.; HUGO, A.; JAKOBSEN, M.; LOUREIRO, V.; LOURENS-HATTINGH, A.; VASDINNYEI, R. An inter-laboratory evaluation of selective media for the detection and enumeration of yeasts from blue-veined cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.1, p: 9-14, 2004.

WINN, Jr. W.; ALLEN, S; JANDA, W.; KONEMAN, E; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Koneman Diagnóstico Microbiológico**. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565 p.