

**DESEMPENHO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA
UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DE FUNGOS PRESENTES EM
AMBIENTES DE PRODUÇÃO DE ALIMENTOS**

MÁRCIO ADRIANI GAVA

Dissertação apresentada à Escola Superior
Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz",
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Ciências, Área de
Concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro - 2002

**DESEMPENHO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA
UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DE FUNGOS PRESENTES EM
AMBIENTES DE PRODUÇÃO DE ALIMENTOS**

MÁRCIO ADRIANI GAVA
Biólogo

Orientador: Prof. Dr. **CLÁUDIO ROSA GALLO**

Dissertação apresentada à Escola Superior Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Fevereiro – 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Gava, Márcio Adriani

Desempenho de diferentes meios de cultura utilizando na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos / Márcio Adriani Gava. - - Piracicaba, 2002.

50 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.

Bibliografia.

1. Contaminação de alimento 2. Meio ambiente 3. Microbiologia de alimentos 4. Processamento de alimento I. Título

CDD 614.3

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Cláudio Rosa Gallo pela orientação, apoio e ensinamentos;

À BIOAGRI LABORATÓRIOS LTDA pelo financiamento da pesquisa;

Aos Professores Dr. Luiz Eduardo Gutierrez, Dra Marília Oetterer e Dra Silene Bruder Sarmiento pelas correções e sugestões;

À Engenheira Florestal Izabel Christina Gava de Souza pela colaboração nas análises estatísticas e sugestões;

À Dra. Márcia Regina de Camargo Ranzani pelo apoio laboratorial e sugestões;

À Camila Frutoso no auxílio laboratorial;

Ao Marcos Favarim no auxílio na coleta de amostras;

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS	iv
RESUMO	v
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Qualidade microbiológica do ar em ambientes interiores.....	4
2.2 Métodos para avaliar a qualidade do ar.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Material.....	11
3.1.1 Amostrador microbiológico de ar.....	11
3.1.2 Meios de Cultura.....	12
3.2 Métodos.....	16
3.2.1 Coleta das amostras.....	16
3.2.2 Incubação.....	17
3.2.3 Contagem de unidades formadoras de colônias de fungos e bactérias.....	17
3.2.4 Avaliação estatística dos resultados de contagem.....	18
3.2.5 Avaliação qualitativa dos resultados	18
3.2.5.1 Identificação dos fungos presentes.....	18
3.2.5.2 Avaliação dos meios de cultivo e identificação dos fungos fungos patogênicos e toxigênicos e estudo de bactérias.....	19

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 Avaliação quantitativa.....	20
4.2 Avaliação qualitativa	27
4.3 Avaliação da contagem total de bactérias.....	37
4.4 Avaliação ambiental das instalações amostradas.....	38
5 CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
APÊNDICES.....	47

LISTA DE QUADROS

	Página
1 Unidades formadoras de colônias/m ³ (valores médios) em diferentes meios de cultura, nos ambientes de produção de doce de leite e de amendoim.....	22
2 Unidades formadoras de colônias/m ³ (valores médios) em diferentes meios de cultura, nos ambientes de empacotamento e de produção de embutidos.....	23
3 Contagem em ufc/m ³ , de fungos, em diferentes meios de cultura envolvendo todos os ambientes e épocas de coleta.....	24
4 Unidades formadoras de colônias/m ³ (valores médios de cinco repetições) nos meios de cultura DRBC e Sabourand, nos ambientes de produção de doce de leite e de amendoim.....	26
5 Unidades formadoras de colônias/m ³ (valores médios de cinco repetições) nos meios de cultura DRBC e Sabourand, nos ambientes de empacotamento e de produção de embutidos.....	26

6 Gêneros de fungos desenvolvidos em diferentes meios de cultura no ambiente de produção de doce de leite.....	28
7 Gêneros de fungos desenvolvidos em diferentes meios de cultura no ambiente de produção de amendoim.....	29
8 Gêneros de fungos desenvolvidos em diferentes meios de cultura no ambiente empacotamento de embutidos.....	30
9 Gêneros de fungos desenvolvidos em diferentes meios de cultura no ambiente de produção de embutidos.....	31
10 Diâmetro e cor das colônias de <i>Aspergillus parasiticus</i> ao longo do período de incubação.....	33
11 Diâmetro e cor das colônias de <i>Aspergillus fumigatus</i> ao longo do período de incubação.....	33
12 Diâmetro e cor das colônia de <i>Aspergillus niger</i> ao longo do período de incubação.....	34
13 Diâmetro e cor das colônias de <i>Aspergillus flavus</i> ao longo do período de incubação.....	34
14 Diâmetro e cor das colônias de <i>Fusarium verticilloides</i> ao longo do período de incubação.....	35
15 Diâmetro e cor das colônias de <i>Fusarium moniliforme</i> ao longo do período de incubação.....	35

16 Diâmetro e cor das colônias de <i>Stachybotrys chartarum</i> ao longo do período de incubação.....	36
17 Diâmetro e cor das colônias de <i>Histoplasma capsulatum</i> ao longo do período de incubação.....	36
18 Unidades formadoras de colônias/m ³ (valores médios) de bactérias nos diferentes ambientes amostrados (médias de três repetições).....	37
19 Correção estatística “Feller”.....	48

DESEMPENHO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DE FUNGOS PRESENTES EM AMBIENTES DE PRODUÇÃO DE ALIMENTOS

Autor: MÁRCIO ADRIANI GAVA

Orientador: Prof.Dr.CLÁUDIO ROSA GALLO

RESUMO

O presente estudo foi dividido em duas fases; a primeira visou avaliar o desempenho de diversos meios de cultura, para fungos, no ar de ambientes de produção de alimentos, através da resposta de contagem e identificação dos gêneros que podem conter espécies indesejáveis; também foi avaliada a condição ambiental juntamente com a contagem total de bactérias. O ambiente de duas áreas foi utilizado para a pesquisa, uma indústria de doces, produção de doce de leite e doce de amendoim, na Cidade de Ribeirão Preto (SP) e, outra, uma indústria de embutidos, nos setores de empacotamento e produção, na Região de Piracicaba (SP). Os meios de cultura utilizados foram: “Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Ágar” (DRBC), “Sabouraud Dextrose a 4% Ágar”, “Malt Ágar” (MA), “Malt Extract Agar – Yeast and Molds” (MEAYM), “Plate Count Ágar-Cloranfenicol” (PCA-Cloranfenicol), “Dichloran 18% Glycerol Ágar” (DG 18), Batata Dextrose Ágar (BDA) e “Oxytetracycline Glucose Yeast

Agar” (OGY); para a contagem de bactérias foi utilizado o meio “Plate Count Agar” (PCA). Cada um dos pontos foi amostrado em triplicata utilizando um amostrador de impactação linear. A segunda fase do projeto avaliou os meios de cultura “Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Ágar” (DRBC), “Sabouraud Dextrose a 4% Ágar” selecionados da primeira fase. Novas coletas foram realizadas amostrando cinco repetições em cada um dos pontos, que permaneceram os mesmos da primeira fase. Em paralelo foram utilizadas culturas puras de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium verticilloides*, *Histoplasma capsulatum* e *Stachybotrys chartarum*, inoculando os dois meios selecionados e avaliando o desenvolvimento desses fungos ao longo do período de incubação de sete dias, a 28°C, para servir de parâmetro de comparação com as coletas de ar realizadas no mesmo período, a fim de se verificar se algum desses fungos indesejáveis estaria presente nas amostras de ar. De acordo com os resultados obtidos, os meios DRBC e Sabouraud Dextrose a 4% Ágar, foram, estatisticamente, melhores que os demais meios testados, apresentando um maior número de unidades formadoras de colônias/m³. O meio de Extrato de Malte diferenciou estatisticamente dos demais e teve o menor desempenho para a quantificação desses microrganismos no ar. A recomendação do melhor meio para identificação de fungos no ar de indústrias alimentícias não foi conclusiva, com exceção do PCA-Chloranfenicol que apresentou baixa diversidade de gêneros, sendo considerado reprovado. No geral foi observado um número elevado de unidades formadoras de colônias de fungos e bactérias/m³ durante as amostragens. A avaliação quali-quantitativa dos ambientes estudados sugere que esses não se encontram em condições adequadas, sendo necessária a elaboração de um padrão referencial para o monitoramento da indústria alimentícia em nosso país. O amostrador utilizado nas coletas

promoveu rapidez nas coletas e proporcionou a expressão dos resultados em medidas confiáveis, por ser um equipamento que permite calibração em seu sistema de aspiração de ar.

PERFORMANCE OF DIFFERENT CULTURE MEDIA USED IN THE EVALUATION OF FUNGI FOUND IN FOOD PRODUCTION ENVIRONMENTS

Author: MÁRCIO ADRIANI GAVA

Adviser: Prof.Dr.CLÁUDIO ROSA GALLO

SUMMARY

The present study consisted of two phases. The first one aimed at evaluating the performance of different culture media for fungi found in the air of food production environments, through the results of counting and identifying genders that may contain undesirable species. The environmental condition was also evaluated along with a total bacteria counting. The present work took place in two different places, an industry which produces sweets made from milk or peanuts, in Ribeirao Preto city (SP) and, in the packing and production sections of a meat encased products industry located in Piracicaba region (SP). The culture media used were: "Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)", "Sabouraud Dextrose 4% Agar (MA)", "Malt Extract Agar – Yeast and Molds (MEAYM)", "Plate Count Agar – Chloramphenicol (PCA-Chloramphenicol)", "Dichloran 18% Glycerol Agar (DG 18)", "Potato Dextrose Agar (BDA)" and

“Oxytetracycline Glucose Yeast Agar (OGY)”. The medium used for the bacteria counting was “Plate Count Agar (PCA)”. Three replicates of each sampled spot were obtained by using a linear impacting sampler. The second phase of this project evaluated the following culture media, selected during the first phase of this study: “Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar (DRBC)” and “Sabouraud Dextrose 4% Agar”. New sample collections (five replicates) were carried out for each of the spots selected. The sampled spots were the same for both phases. In a parallel manner, pure cultures of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium verticilloides*, *Histoplasma capsulatum* and *Stachybotrys chartarum* were employed to inoculate the two selected media. The development of these fungi was evaluated throughout a 7-day-incubation period, at 28°C, to function as a comparative reference for the air samples obtained in the same period in order to verify if any of these undesirable fungi was present in the air samples. According to the results obtained, DRBC and Sabouraud Dextrose 4% Agar media were statistically superior than the others, presenting a higher number of colony forming units/m³. The Malt Extract medium was statistically different from the others and showed the worse performance as to the quantification of microorganisms present in the air. There was no conclusive recommendation as to the best medium for the identification of fungi found in the air of food industries, except for PCA-Chloramphenicol, which showed low diversity of genders and was discarded. In general, a high number of fungi and bacteria colony forming units/m³ was observed during the sampling procedures. The qualitative-quantitative evaluation of the environments studied suggests that they do not present adequate conditions, evidencing the need for the establishment of a referential standard in order to monitor food industries in our country. The sampler used in this work allowed a quick sample

collection and a reliable expression of results, as this equipment enables the calibration of its air intake system.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação microbiológica do ar tem sido pouco enfatizada na comunidade científica brasileira. O falecimento do Sr. Ministro Sérgio Motta, em abril de 1998, despertou discussão sobre o assunto, uma vez que se suspeitou de infecção generalizada induzida por microrganismos de risco à saúde, presentes no ar de seu gabinete.

Considerando a preocupação mundial com a qualidade do ar de ambientes climatizados e a ampla e crescente utilização de sistemas de ar condicionado no país, em função das condições climáticas, o Ministério da Saúde propõe, através da portaria nº 3.523/GM de 28 de agosto de 1998, que sejam determinados padrões de qualidade do ar em ambientes climatizados, bem como, o seu monitoramento.

Recentemente, a Resolução RE nº 176 de 24 de outubro de 2000, estabeleceu critérios para monitoramento sobre a qualidade do ar interior em ambientes climatizados artificialmente, definindo a identificação das fontes poluentes de natureza biológica, química e física, e métodos analíticos, além de recomendações para controle. Para padrões biológicos é estabelecido um limite máximo de 750 unidades formadoras de colônias por m³ (ufc/m³) para fungos, desde que não ocorram espécies patogênicas e toxigênicas. Para coleta foi adotado um amostrador de ar de impactação com acelerador linear, e indicado os seguintes meios de cultivo: Ágar Extrato de Malte, Ágar Sabouraud Dextrose a 4%, Ágar Batata Dextrose ou outro, desde que cientificamente validado.

Observa-se que em termos de meios de cultura indicados a resolução é inconsistente, pelo fato de não haver uma especificação de um meio padrão, o que poderia ocasionar interpretações distintas das condições de um mesmo ambiente. Estudos quanto à comparação dos meios de cultura recomendados para contagem e identificação de fungos citados acima e outros meios de importância tornam-se necessários.

A World Health Organization (1988) discutindo sobre a qualidade do ar de ambiente interno, relata que a contaminação microbiológica, em ambientes interiores de edifícios, é tida como responsável substancial nas faltas ao trabalho. Relata, ainda, que na população em geral, verifica-se uma média normal de 5 a 10 dias/ano de restrição de atividade per capita, devida à infecções agudas e episódios alérgicos, os quais poderiam ser reduzidos, significativamente, com o controle dos contaminantes. Alguns fatores referentes à arquitetura das edificações, como lotação e recirculação de ar podem, também, promover a dissiminação de patógenos pelo ar, quando emitidos pelos ocupantes que sofrem de tuberculose, sarampo, varicela e outras doenças.

Componentes dos sistemas de ventilação como torres de refrigeração, aparelhos de ar condicionado, umidificadores e desumidificadores podem promover o crescimento de fungos, bactérias e outros microrganismos. Estes microrganismos podem atingir patamares elevados de crescimento quando o ambiente proporciona condições de umidade e temperatura ideais. Além de reações de irritações e alergias aos ocupantes, nos casos de ambientes de manipulação de alimentos, podem interferir na qualidade do produto final.

A preocupação com a sanidade dos alimentos tem sido cada vez mais colocada em destaque. A manipulação de alimentos em ambientes sem controle dos contaminantes pode se tornar potencial de risco, devido à contaminação propagar-se através dos produtos.

Baseado em especificações de monitoramento de áreas comuns, esta pesquisa visa contribuir para o controle de contaminantes microbiológicos do ar na área alimentícia.

Os objetivos desta pesquisa foram:

- a) aferir o desempenho de diversos meios de cultura para o crescimento de fungos, em relação à resposta de contagem e identificação dos gêneros que podem conter espécies indesejáveis, incluindo os meios recomendados pela Resolução do Ministério da Saúde;
- b) expressar dentro de um campo amostral, as condições ambientais onde ocorre a manipulação de alimentos nas indústrias, tendo como produtos-base derivados do leite, do amendoim e embutidos cárneos da indústria frigorífica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Qualidade microbiológica do ar em ambientes interiores

Os efeitos na saúde associados aos microrganismos presentes nos ambientes interiores têm mostrado a necessidade de monitoramento do ar de interiores e motivado as pesquisas de métodos de detecção e identificação de microrganismos.

Lacaz (1970) cita que, em 1924, Van Leewen estudou as relações clínicas entre asma e clima na Holanda, atribuindo grande importância etiológica aos esporos de fungos e bactérias do ar como agentes extrínsecos causadores da chamada “asma climática”. O autor revisando sobre os contaminantes biológicos do ar verificou que numerosos fungos na poeira e no ar desempenham papel importante como elementos alergizantes. De acordo com Feldman (1995), um programa de monitoramento para contaminantes do ar como poeira, esporos de *Aspergillus fumigatus* e endotoxinas pode ser um instrumento valioso na saúde pública e ambiental.

Segundo Pelczar et al. (1981) o grau de contaminação do ar interno é influenciado por fatores, tais como as taxas de ventilação, o número de pessoas que ocupam o ambiente, a natureza e o grau de atividade exercida por esses indivíduos.

Como componentes biológicos do ar em ambientes internos, aclimatados artificialmente, Kulcsar Neto & Siqueira (1998) citam os microrganismos como cohabitantes, apresentando-se em curva

exponencial de crescimento. Os autores mostram que há prevalência de bactérias, como: *Legionella pneumophila*, *Bacillus* sp, *Flavobacterium* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Actinomyces thermophila*, e de fungos, como: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Cephalosporium* sp, *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Cladosporium* sp e *Fusarium* sp.

Segundo Brickus & Aquino Neto (1999) a baixa qualidade do ar de interiores tem sido relacionada com efeitos adversos à saúde humana, levando a Organização Mundial de Saúde (OMS) a classificar a Síndrome do Edifício Doente (SED) como um problema de saúde pública. Os sintomas decorrentes da síndrome podem estar ligados a poluentes de origem química ou biológica, sendo eles: irritação e obstrução nasal, desidratação e irritação da pele, irritação e secura na garganta, irritação e sensação de secura nas membranas dos olhos, dor de cabeça, letargia e cansaço generalizado, levando à perda de concentração.

Kulcsar Neto & Siqueira (1998) citam que os padrões referenciais para analisar os resultados de qualidade microbiológica do ar de interiores são classificados em relativos, qualitativos, quantitativos, qualitativos/quantitativos e ocupacionais. Com base nesta extensa revisão e considerando a necessidade de serem implantados procedimentos que visem minimizar o risco potencial à saúde dos ocupantes, que têm permanência prolongada nestes ambientes, os autores recomendam a adoção de parâmetros qualitativos e quantitativos que permitam uma interpretação científica sobre a qualidade do ar de ambientes interiores e a correta tomada de decisão quanto à intervenção, mais especificamente, com relação a sistemas de ar condicionado, ventilação e aquecimento.

Segundo Padrão Referencial Brasileiro Microbiológico (1998), o Conselho Científico da Brasindoor (Sociedade Brasileira de Meio Ambiente

e de Qualidade do Ar de Interiores) aprovou, em 1998, o seguinte referencial brasileiro para ambientes:

a) Qualitativo: não são admitidos nos ambientes interiores:

-Fungos - *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus parasiticus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Stachybotrys atra* e *Fusarium moniliforme*.

-Bactérias – *Legionella pneumophila*

b)Quantitativo: Valor Máximo Aceitável=750ufc/m³ de ar.

c)Relativo: Classificação dos ambientes dentro dos valores máximos aceitáveis. O valor máximo relativo é dado pela seguinte expressão:

Ar ambiental Interior(I) = Ar ambiental Exterior(E).1,5; então os ambientes são classificados em: a) Ambientes em boas condições I/E < 1,5; b) Ambientes em regulares condições I/E = 1,5-2,0; e c) Ambiente em más condições I/E > 2,0.

Ezeonu et al.(1994) colonizaram com fungo, em laboratório, materiais de isolamento acústica e fibra de vidro térmica usados no aquecimento, ventilação e sistemas de ar condicionados. A mistura de fungos, principalmente *Aspergillus versicolor*, *Acremonium obclavatum* e *Cladosporium herbarum* produziu odores voláteis, incluindo 2-etil hexanol, ciclohexano, e benzeno. Segundo o autor, o benzeno é classificado como um composto químico perigoso pela “Environmental Protection Agency e “Occupational Safety and Health Administration”, o ciclohexano e 2-etil hexanol são conhecidos como irritantes dos olhos e da pele. Este estudo demonstrou que fungos nos sistemas de aquecimento, ventilação e ar condicionado podem desempenhar um papel significativo nos problemas de saúde nos ocupantes de edifícios com essas características.

Macneil et al.(1995) revisam métodos moleculares na detecção de fungos e bactérias comuns no ar de interiores. Segundo os autores as técnicas moleculares para detecção e identificação de bactérias estão

desenvolvidas e disponíveis para uma variedade de espécies. Para a detecção e identificação de fungos tem sido tratada com limites, pois vários gêneros comuns no ar de interiores não são detectados por essas técnicas.

Angulo-Romero et al.(1996) estudaram a presença de fungos no ar interno de doze escolas na Espanha durante dois anos. Foram coletadas 456 amostras usando um aspirador de pó e analisadas para cultura de fungos. Das colônias isoladas 38% pertenciam a patogênicos capazes de causar infecções ou doenças de hipersensibilidade. Dos 91 gêneros identificados, os mais freqüentes foram *Alternaria*, *Aspergillus* e várias espécies de *Penicillium*. Os autores observaram também que a maioria destes fungos apresentou variações sazonais na concentração, a qual foi mais abundante entre os meses de abril e outubro.

Poucos estudos sobre o monitoramento microbiológico do ambiente de indústrias alimentícias têm sido observados na literatura.

Ligugnana e Fung (1990) desenvolveram um programa de amostragem para mostrar o impacto das atividades dos trabalhadores e da higiene do local na qualidade microbiana do ar e superfícies no ambiente de trabalho na indústria de alimentos. Foram utilizados o amostrador de ar "SAS" e o método Agar contact plate. Foram avaliados: o efeito da limpeza das mãos e utensílios na carga microbiológica nas superfícies de trabalho, efeito de desinfetantes aerossóis nos microrganismos transportados pelo ar nos ambientes fechados, efeito da fumigação na redução de fungos, nível de higiene do ar em ambientes críticos como enchimento estéril e empacotamento de yogurt, detecção de microrganismos específicos pelo meio seletivo, e efeito da variação da umidade relativa na qualidade microbiana do ar. Os autores observaram que, para obter melhores resultados é importante que os empregados tenham boa vontade e entendam as razões dos procedimentos específicos de higiene.

Sveum et al (1992) citam que o ar ambiente em áreas de empacotamento de alimentos é tido como um ponto crítico de controle.

Kurata (1994) cita que a qualidade do ar em áreas de empacotamento é um fator crítico no processamento de alimentos deterioráveis e, portanto, métodos de monitoramento do ar deverão ser estabelecidos com limites apropriados de níveis viáveis de microrganismos. O autor apresenta um plano de monitoramento de microrganismos transportados pelo ar em ambientes interiores de empacotamento na indústria alimentícia. Os amostradores do ar são “Brotest RCS” e o “RCS Plus”, e os meios de cultura agar HS (rose bengal agar) e DG18 (dichloran 18% glycerol). O autor propõe a seguinte classificação para a qualidade do ar em áreas de processamento e empacotamento de alimentos de acordo com o número de unidades formadoras de colônias de fungos (ufc/m³):

Categoria	ufc/m ³
I - condição microbiológica limpa	0 - 10
II - condição microbiológica sub-limpa	11 - 50
III - condição normal do ambiente interior	51 - 100
IV – condição ruim do ambiente interior	> 100

Padrões brasileiros para qualidade microbiológica do ambiente de indústrias alimentícias não existem em legislação. O trabalho de Kurata (1994) define padrões que podem servir de base para elaboração de padrões nacionais, entretanto, devemos considerar nossas condições ambientais tropicais, o que torna estudos em nossas condições ambientais indispensáveis.

2.2 Métodos para avaliar a qualidade do ar

Segundo Flannigan & Miller (1994), muitos trabalhos têm sido publicados sobre a presença de fungos no ar de interiores e relatam o número de “unidades formadoras de colônias” (cfu/m³ de ar), alguns relatam sobre gêneros e poucos sobre a identificação de espécies, especialmente de gêneros mais complexos como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Os autores ressaltam que atenção insuficiente tem sido dada com relação ao desempenho do amostrador, tempo de permanência dos esporos no ar entre as coletas, meio de cultura utilizado e a identificação dos fungos.

Os microrganismos viáveis do ar podem ser determinados por uma série de métodos como: sedimentação, impactação em superfícies sólidas, filtração, centrifugação e precipitação eletrostática (Pelczar et al., 1981; Sveum et al., 1992). Dentre estes, os mais utilizados são os de sedimentação e impactação em superfícies sólidas. Os métodos de sedimentação possuem várias desvantagens, incluindo a quantificação de microrganismos no ar, ou seja, o número de partículas viáveis/m³ de ar, com baixa correlação, quando comparada com outros métodos quantitativos. Já o método de impactação, permite que sejam coletados volumes conhecidos de amostras, possibilitando a quantificação por m³.

A World Health Organization (1988), no que se refere à qualidade do ar de ambiente interno, ressalta que os métodos de amostragem para pólen, bactérias específicas e vírus estão próximos da padronização, o que não ocorre para fungos, micotoxinas e outros materiais biológicos. Este fato permanece nos dias atuais.

Pitt & Hocking (1997) citam que o método mais simples para amostragem do ar é o da sedimentação. Entretanto, os autores ressaltam que a amostragem volumétrica do ar, através de um equipamento de impactação, é um indicador mais confiável da qualidade do ar.

Visando estabelecer padronização na amostragem de microrganismos transportados pelo ar, Buttner & Stetzenbach (1993), conduziram um experimento em laboratório para determinar a recuperação desses microrganismos utilizando um marcador biológico como controle. Quantidades conhecidas de esporos de *Penicillium chrysogenum* foram produzidas e inoculadas em uma área fechada, seguido de coletas com diferentes equipamentos impactadores, como: “Andersen six –stage”, “Surface Air System”, “Burkart” e “Depositional”. Os amostradores “Andersen” e “Burkart” recuperaram o mais alto número de esporos comparados com a medida padrão de *P. chrysogenum*.

A importância do método de amostragem, seja para buscar padrões ambientais ou selecionar meios de cultivo, é que o mesmo permita reduzir ao mínimo as variáveis da coleta, como: volume amostrado e tempo de coleta. Dentre os métodos mais utilizados o de impactação proporciona coletas pontuais e rápidas com volumes definidos, elevando a confiança dos dados obtidos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Amostrador microbiológico de ar

Empregou-se um amostrador microbiológico de ar da marca MERCK denominado MAS-100 (Figura 1), um instrumento do tipo impactador, que aspira o ar através de uma placa perfurada. O ar aspirado, que contém as partículas presentes no ar ambiente, atinge diretamente a superfície de uma placa de Petri de 90 mm, que após o ciclo de coleta ter-se completado é incubada e as colônias são contadas e expressas como unidades formadoras de colônias (ufc/m³).

Características do equipamento: taxa nominal do fluxo de ar = 100 L/min ± 2,5%; níveis de volumes de amostras de ar pré-definidos: 10, 20, 50, 100, 200, 250, 500, 750 e 1000 litros; níveis de volumes de amostras de ar usados nas coletas: variaram de 100 a 500L, sendo que a maioria das coletas foi efetuada em 250L. A escolha esteve em função da contaminação esperada nos ambientes estudados. De qualquer forma, as coletas por amostrador de ar tipo impactador não devem exceder 10 minutos sob pena de secagem do meio de cultura. O equipamento compensa para os fatores que podem interferir no fluxo de ar escolhido tais como, o volume de ágar na placa de Petri ou variação no diâmetro da mesma.

3.1.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura foram elaborados conforme especificado a seguir:

A) “Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar” (DRBC) (Food and drug administration, 1998; Pitt & Hocking, 1997)

Glicose.....	10,0 g
Peptona Bacteriológica.....	5,0 g
Fosfato de Potássio, monobásico.....	1,0 g
Sulfato de Magnésio, heptahidratado.....	0,5 g
Rosa bengala (solução 5%., p/v).....	0,5 mL
Dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina) (solução 0,2%,p/v, em etanol).....	1,0 mL
Cloranfenicol.....	0,1 g
Água destilada.....	1 L
Ágar.....	15,0 g
pH final 5,6	

Os ingredientes foram misturados, o meio foi aquecido até dissolução do ágar, completando o volume para 1000mL e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos; esfriado em banho maria a 50°C e distribuído em placa (15 a 20 mL por placa) sob condições assépticas.

O DRBC é um meio especialmente indicado para analisar amostras contendo fungos que se espalham como *Mucor* e *Rhizopus*, pois, o dichloran e a rosa bengala, efetivamente, diminuem o crescimento dos fungos de crescimento rápido e, propiciam a detecção de outros propágulos de fungos e leveduras, que têm menor taxa de crescimento.

B) “Dichloran 18% Glycerol Agar” (DG18) (Food and drug administration, 1998; Pitt & Hocking, 1997)

Glicerol.....	220,0 g
Glicose.....	10,0 g
Peptona.....	5,0 g
Fosfato de potássio monobásico.....	1,0 g
Sulfato de magnésio heptahidratado.....	0,5 g
Dicloran (0,2%, p/v, em etanol).....	1,0 mL
Ágar.....	15,0 g
Cloranfenicol.....	0,1 g
Água destilada.....	1 L

pH final 5,6

Os ingredientes acima foram misturados e fervidos até dissolução do ágar, e em seguida o volume acertado para 1000 mL com água destilada. Adicionou-se 220 g de glicerol e o meio foi esterilizado a 121°C por 15 min. Foi submetido a resfriamento a 50°C e distribuído em placas de Petri sob condições assépticas. A baixa atividade de água desse meio reduz interferência de bactérias e fungos de crescimento rápido.

C) “Plate Count Agar” (PCA) (Food and drug administration, 1998; Pitt & Hocking, 1997)

Triptona.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	2,5 g
Dextrose.....	1,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 L

pH final $7,0 \pm 0,2$

Os ingredientes foram dissolvidos e o meio aquecido até dissolução do ágar, resfriado e adicionado de 100 mg de cloranfenicol por

litro, para detecção de fungos e leveduras, e, sem antibiótico para contagem de bactérias mesófilas aeróbias. Em seguida foi autoclavado a 121°C por 15 minutos, resfriado a 50°C e distribuído em placas de Petri sob condições assépticas.

D) “Malt Agar” (MA) (Food and drug administration, 1998; Pitt & Hocking, 1997)

Extrato de malte, em pó.....	20,0 g
Ágar.....	20,0 g
Água destilada.....	1 L

Os ingredientes foram misturados, fervidos para dissolução do ágar e o meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. Em seguida foi esfriado a 50°C e distribuído em placas de Petri sob condições assépticas.

E) “Malt Extract Agar - Yeast and Molds” (MEAYM) (Food and drug administration, 1998; Pitt & Hocking, 1997)

Extrato de malte, em pó.....	20,0 g
Glicose.....	20,0 g
Peptona.....	1,0 g
Ágar.....	20,0 g
Água destilada.....	1 L

pH final 5,4

Os ingredientes foram misturados, fervidos para dissolução do ágar e o meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. Em seguida foi resfriado a 50°C e distribuído em placas de Petri sob condições assépticas. (Esse meio é recomendado para *Aspergillus* e *Penicillium*).

F) “Batata Dextrose Agar” (BDA) (Food and drug administration, 1998; Pitt & Hocking, 1997)

Infusão de batata.....	4,0 g
Dextrose.....	20,0 g
Ágar.....	20,0 g
Água destilada.....	1 L

pH final 4,0 – 4,5 ± 0,2

O meio foi preparado e esterilizado conforme indicação do fabricante. Após esterilização foi adicionado cerca de 1 mL de solução de ácido tartárico a 10%, para cada 100 mL de meio, a fim de se obter pH 4,0-4,5.

G) “Sabouraud Dextrose a 4% Agar” (Food and drug administration, 1998)

Polipeptona ou neopeptona.....	10,0 g
Dextrose.....	40,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 L

pH final 5,6 ± 0,2

Meio normalmente indicado no cultivo e identificação de fungos patogênicos (Lacaz et al., 1998).

H) “Oxytetracycline Glucose Yeast Agar” (OGY) (Pitt & Hocking, 1997)

Glucose.....	20,0 g
Extrato de Levedura.....	5,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1 L

Os ingredientes foram misturados, fervidos para dissolução do ágar e o meio foi esterilizado a 121°C por 15 minutos. Esfriado a 50°C, foi adicionado de 10 mL de oxitetraciclina esterilizada por filtração e, em seguida distribuído em placas de Petri sob condições assépticas.

3.2 Métodos

A metodologia descrita está distribuída em duas fases de execução. A primeira fase propôs avaliar o desempenho dos meios de cultura, através de parâmetros utilizados para a escolha de um meio potencialmente melhor, a ser utilizado na enumeração total e a presença de interferentes (fungos de crescimento rápido).

Também foi avaliada a presença de bactérias totais mesófilas aeróbias, em Plate Count Agar (PCA), visando conhecer as condições do ambiente em relação a esse grupo de microrganismos e, ainda, fornecer dados para uma possível relação com o desenvolvimento de fungos nos meios estudados.

A segunda fase foi realizada utilizando os dois meios estatisticamente eleitos como os melhores. Em paralelo foi avaliado nesses meios o crescimento de algumas espécies patogênicas e toxigênicas durante a fase de incubação estipulada de cinco a sete dias.

De acordo com Padrão Referencial Brasileiro Microbiológico (1998), entre os fungos patogênicos não admitidos nos ambientes estão: *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis*. Entre os fungos toxigênicos não admitidos nos ambientes estão: *Aspergillus fumigatus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *Stachybotrys atra* e *Fusarium moniliforme*.

3.2.1 Coleta das Amostras

A amostragem foi realizada em dois locais distintos de processamento de alimentos, a saber: indústria de doces (produção de doce de leite e de doce de amendoim) e frigorífico (empacotamento e produção de embutidos cárneos). Na primeira fase foram realizadas

coletas periódicas em diferentes épocas: indústria de doces entre maio de 2000 e janeiro de 2001; frigorífico entre setembro de 2000 e janeiro de 2001. Coletou-se de cada ambiente três placas para cada meio de cultura mencionado no item 3.1.2. Já na segunda fase foram realizadas coletas entre junho e julho de 2001 nos mesmos locais da primeira fase, porém utilizando-se somente os dois meios selecionados, Sabouraud e DRBC, coletando-se cinco placas para cada meio de cultura em cada um dos pontos amostrados.

3.2.2 Incubação

Após as coletas, as placas foram incubadas em estufa tipo BOD. Para a contagem total de fungos e a avaliação do crescimento de espécies toxigênicas e patogênicas empregou-se a temperatura de $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ por cinco a sete dias; na contagem total de bactérias mesófilas a temperatura de $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas.

3.2.3 Contagem de unidades formadoras de colônias de fungos e bactérias

O número de unidades formadoras de colônias foi contado em cada placa e o resultado foi corrigido com a ajuda de uma tabela de correção estatística "Feller" (Quadro 19) e, em seguida calculou-se o número de ufc/m³.

O método de correção estatística baseia-se no seguinte princípio: quanto maior a quantidade de microrganismos em cada amostragem, maior a probabilidade de que vários microrganismos entrem pelo mesmo orifício da placa perfurada. Foi utilizada uma tabela de conversão para cálculo, aplicando-se a fórmula Feller citado por MERCK (s.d.).

3.2.4 Avaliação estatística dos resultados de contagem

Os dados de ufc/m³ (unidades formadoras de colônias por m³) foram submetidos a teste diagnóstico, visando verificar a homogeneidade de variância, segundo Nogueira (1991). Diante dos resultados obtidos nesta análise, os dados foram transformados em $\sqrt{ufc/m^3}$. A análise da variância foi realizada no esquema do delineamento inteiramente casualizado, por ambiente avaliado, e considerando todos os ambientes, segundo o modelo matemático:

$$Y_{ij} = u + \tau_i + e_{ij}, \text{ sendo:}$$

Y_{ij} = é o valor observado no i-ésimo meio de cultura da j-ésima repetição;

u = é a média geral dos valores observados;

τ_i = é o efeito do i-ésimo tratamento;

e_{ij} = erro aleatório atribuído à observação Y_{ij} .

Detectada a significância do Teste F, as médias dos tratamentos foram comparadas através do Teste de Tukey (5% de significância).

As análises foram realizadas através dos procedimentos estatísticos SAS (Statistical Analysis System).

3.2.5 Avaliação qualitativa dos resultados

3.2.5.1 Identificação dos fungos presentes

Seguiu-se a identificação direta nos meios utilizados, após o período de incubação estabelecido. As colônias foram observadas em estereomicroscópio para observação do tipo e local das estruturas

esporulantes. Para o exame microscópico foram preparadas lâminas em água e/ou coradas com lactofenol com pequenos pedaços das bordas das colônias, levando parte do micélio e das estruturas de frutificação, para observação das características morfológicas: tipo de micélio (septado ou não); estrutura (tamanho, cor e textura) do conidióforo e conídios/ esporângios e esporangióforos e estruturas de resistência (clamidosporos) ou estruturas contendo esporos como clestotécio.

Esses dados foram comparados às chaves de classificação dadas por Barnett & Hunter (1972), Pitt & Hocking (1997), Lacaz et al. (1998).

3.2.5.2 Avaliação dos meios de cultivo e identificação dos fungos patogênicos e toxigênicos e estudo de bactérias

Foram adquiridas culturas puras das espécies de fungos patogênicas e toxigênicas.

Durante as coletas da segunda fase foi conduzida, em paralelo, a inoculação das placas contendo os meios DRBC e Sabouraud com culturas puras de *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *Fusarium moniliforme*, *F. verticilloides*, *Histoplasma capsulatum* e *Stachybotrys chartarum*. As placas foram incubadas durante sete dias em estufas separadas daquelas das coletas e monitoradas com relação ao crescimento e características morfológicas dos fungos durante o período de incubação. Esse acompanhamento teve como objetivos facilitar a identificação de uma possível presença destes fungos nos ambientes avaliados e certificar o crescimento dos mesmos nos meios DRBC e Sabouraud.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação quantitativa

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que houve diferença significativa na maioria dos locais amostrados entre os meios utilizados (Quadros 1 e 2), com exceção dos pontos produção de doce de leite da terceira coleta (Quadro 1) e empacotamento de embutidos da primeira coleta (Quadro 2). A primeira amostragem aponta o meio DRBC com melhor desempenho na indústria de doces nos dois pontos amostrados, área de produção de leite e amendoim (Quadro 1), tendo como meio de menor contagem de fungos o Extrato de Malte.

Na necessidade de trabalhar com um número maior de meios de cultura, optou-se por utilizar meios reconhecidos na área de alimentos. Desta forma foram conduzidas amostragens com os seguintes meios: DRBC, DG18, PCA-Cloranfenicol, BDA, MA e MEAYM. Duas amostragens foram conduzidas com os meios acima, uma correspondente à primeira coleta da área frigorífica (Quadro 2) e uma outra representando a segunda, da indústria de doces (Quadro 1). Na indústria de doces, o meio DRBC foi o que apresentou melhor desempenho, porém não houve diferença estatística com o DG18 na área de produção de doce de amendoim. Os meios MA, MEAYM e BDA aparecem significativamente, como os de menor performance quando testados em ambientes de produção de doces em geral (Quadro 1).

Quando a Resolução – RE nº 176 de 24 de outubro de 2000 do Ministério da Saúde do Brasil foi publicada, concluiu-se que era importante a inclusão do meio Sabouraud Dextrose a 4% Ágar, indicado juntamente com BDA e MA, como os principais meios para amostragem de ar. Portanto, aquele meio foi incorporado nas demais coletas. O comportamento desses meios na indústria de doces apresentou diferença significativa apenas na área de amendoim, indicando o meio de MA e BDA como os de menor desempenho (Quadro 1). Já nas coletas da área frigorífica, o meio DRBC, embora apareça como o melhor na segunda coleta na área de empacotamento de embutidos, não difere estatisticamente do meio Sabouraud Dextrose a 4% Ágar na área de produção de embutidos, sendo os de menor desempenho o PCA-Cloranfenicol, BDA, MA e MEAYM (Quadro 2).

Data De coleta	Ambiente	Meio de Cultura	ufc/m ³		
Mai/00	Produção de Doce de Leite	DRBC	1170 a ¹		
		BDA	680 b		
		OGY	652 b		
		MA	440 b		
	Produção de Doce de Amendoim	DRBC	1030 a		
		BDA	872 ab		
		OGY	860 ab		
		MA	536 b		
Ago/00	Produção de Doce de Leite	DRBC	6926		
		DG18	4611 b		
		PCA-Clor	4315 b		
		BDA	3510 bc		
		MA	2961 bc		
		MEAYM	2385 c		
	Produção de Doce de Amendoim	DRBC	5080 a		
		DG18	4238 ab		
		PCA-Clor	3696 abc		
		BDA	2698 bcd		
		MEAYM	2141 cd		
		MA	1931 d		
		Jan/01	Produção de Doce de Leite	SABOURAUD	1196 a
				PCA-Clor	1033 a
DRBC	883 a				
MEAYM	770 a				
BDA	740 a				
DG18	673 a				
MA	613 a				
Produção de Doce de Amendoim	DRBC		1270 a		
	SABOURAUD		1106 a		
	PCA-Clor		1070 a		
	DG18		1036 ab		
	MEAYM		893 ab		
	MA		596 bc		
	BDA		380 c		

Quadro 1 – Unidades formadoras de colônias/m³ (valores médios) em diferentes meios de cultura, nos ambientes de produção de doce de leite e de amendoim.

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância)

Data De coleta	Ambiente	Meio de cultura	ufc/m ³
Set/00	Empacotamento de Embutidos	MEAYM	563 a ¹
		DG18	530 a
		DRBC	523 a
		PCA-Clor	470 a
		BDA	383 a
	Produção de Embutidos	MA	230 a
		MEAYM	2300 a
		BDA	1573 ab
		PCA-Clor	1210 b
		DRBC	1003 b
Dez/00	Empacotamento de Embutidos	DG18	910 b
		MA	390 c
		DRBC	2246 a
		DG18	1130 b
		SABOURAUD	1126 b
	Produção de Embutidos	BDA	1106 b
		MEAYM	906 b
		MA	656 b
		PCA-Clor	623 b
		SABOURAUD	5703 a
Jan/01	Empacotamento de Embutidos	DRBC	5696 ab
		DG18	3040 bc
		MEAYM	2456 c
		MA	2143 c
		BDA	1876 c
	Produção de Embutidos	PCA-Clor	1503 c
		SABOURAUD	1410 a
		DRBC	510 b
		PCA-Clor	473 b
		MA	453 b
Produção de Embutidos	MEAYM	366 b	
	BDA	336 b	
	DG18	300 b	
	SABOURAUD	2550 a	
	DRBC	1023 ab	
	MEAYM	866 b	
	PCA-Clor	796 b	
MA	730 b		
BDA	523 b		
DG18	490 b		

Quadro 2 - Unidades formadoras de colônias/m³ (valores médios) em diferentes meios de cultura, nos ambientes de empacotamento e de produção de embutidos.

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância)

O Quadro 3 apresenta as contagens obtidas para os diferentes meios de cultura, em ufc/m³, envolvendo todos os ambientes e épocas de coleta, podendo observar que os meios DRBC e Sabouraud Dextrose a 4% Ágar se apresentam como os melhores para a realização de contagem de fungos no ar. Por outro lado, o meio de Malte mostrou-se, significativamente, como o menos indicado para o mesmo propósito.

Meio de Cultura	Número de repetições	Média em ufc/m ³	
DRBC	36	2280	a ¹
SABOURAUD	18	2182	a
DG18	30	1696	ab
PCA-Clor	30	1519	ab
MEAYM	30	1365	ab
BDA	36	1223	ab
MA	36	973	b
Média Geral		1564	
Coeficiente de Variação em %		43,92	
Teste F		3,54**	

Quadro 3 - Contagem em ufc/m³, de fungos, em diferentes meios de cultura envolvendo todos os ambientes e épocas de coleta.

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância)

O meio DRBC teve o mesmo desempenho em outros estudos, como nos desenvolvidos por King et al.(1979), motivo pelo qual este meio foi adotado pelos principais guias de microbiologia de alimentos (Acuff, 1992; Tournas et al.,1998). Estes resultados eram esperados devido à sua composição, que tem como inibidores a Rosa Bengala e o Dichloran, restringindo o tamanho das colônias e o Chloramphenicol como inibidor de bactérias. Esses fatos podem estar justificando que, em termos numéricos, o meio MA tenha tido o menor desempenho, uma vez que certos gêneros como, *Crysonilia*, *Mucor* e *Rhizopus* microrganismos que têm crescimento rápido, estiveram presentes, crescendo descontroladamente e dificultando o desenvolvimento de outros gêneros presentes.

Os resultados obtidos na segunda fase do projeto com os meios DRBC e Sabouraud estão apresentados nos Quadros 4 e 5. De modo geral os meios não diferiram estatisticamente durante as amostragens nas indústrias de doces e frigorífico. O meio DRBC apresentou melhor desempenho em duas coletas na área de empacotamento de embutidos e em uma coleta na área de produção de doce de leite. Tal fato pode estar relacionado com a peculiaridade do meio em restringir o crescimento de bactérias, proporcionando melhor desenvolvimento dos fungos, uma vez que uma alta incidência de bactérias principalmente na área de produção de embutidos, foi verificada durante a primeira fase do projeto (Quadro 18).

Data de Coleta	Ambiente	Meio de cultura	ufc/m ³
20/06/01	Produção de doce de amendoim	DRBC	370 a ¹
		SABOURAUD	408 a
	Produção de doce de leite	DRBC	412 a
		SABOURAUD	432 a
27/06/01	Produção de doce de amendoim	DRBC	440 a
		SABOURAUD	452 a
	Produção de doce de leite	DRBC	658 a
		SABOURAUD	460 b
04/07/01	Produção de doce de amendoim	DRBC	1210 a
		SABOURAUD	903 a
	Produção de doce de leite	DRBC	688 a
		SABOURAUD	588 a

Quadro 4 - Unidades formadoras de colônias/m³ (valores médios de cinco repetições) nos meios de cultura DRBC e Sabouraud, nos ambientes de produção de doce de leite e de amendoim.

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância)

Data de Coleta	Ambiente	Meio de Cultura	ufc/m ³
20/06/01	Empacotamento de Embutidos	DRBC	442 a ¹
		SABOURAUD	282 b
	Produção de Embutidos	DRBC	512 a
		SABOURAUD	518 a
27/06/01	Empacotamento de Embutidos	DRBC	498 a
		SABOURAUD	466 a
	Produção de Embutidos	DRBC	722 a
		SABOURAUD	475 a
04/07/01	Empacotamento de Embutidos	DRBC	1654 a
		SABOURAUD	828 b
	Produção de Embutidos	DRBC	1454 a
		SABOURAUD	1068 a

Quadro 5 - Unidades formadoras de colônias/m³ (valores médios de cinco repetições) nos meios de cultura DRBC e Sabouraud, nos ambientes de empacotamento e de produção de embutidos.

¹ Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (5% de significância)

4.2 Avaliação qualitativa

A avaliação qualitativa visou na primeira fase, identificar os gêneros de maior ocorrência e presentes no período estipulado de incubação, isto é, foram identificados somente aqueles que apresentaram suas estruturas de frutificação necessárias para sua identificação.

Assim, os Quadros de 6 a 9 apresentam os gêneros de fungos encontrados nos meios avaliados. O gênero *Cladosporium*, comum em ambientes interiores que não apresentam problemas de saúde (Lacaz, 1970; Padrão Referencial Brasileiro Microbiológico, 1998), foi encontrado nos ambientes avaliados crescendo em 100% dos meios testados. Dos gêneros encontrados nos períodos de avaliação, apenas dois deles podem conter espécies toxigênicas indesejáveis para qualquer ambiente (Padrão Referencial Brasileiro Microbiológico, 1998), a saber: *Aspergillus* e *Fusarium*. Quanto ao outro gênero toxigênico citado, o *Stachybotrys* e os patogênicos dos gêneros *Histoplasma*, *Cryptococcus* e *Paracoccidioides*, esses não puderam ser detectados em nenhum dos meios empregados no período de avaliação considerado, porque se estiveram presentes, não apresentaram as características morfológicas necessárias à sua identificação.

GÊNEROS	MEIOS DE CULTURA							% M/G ¹	%C/TC ²
	MA	MEAYM	BDA	DRBC	DG18	PCA-Clor	SABOURAUD		
<i>Aspergillus</i>	2	2	3	2	1	1	1	100	75
<i>Cladosporium</i>	2	2	2	3	2	2	1	100	87
<i>Chrysonilia</i>	1	1	1	3	2	1	0	86	56
<i>Trichoderma</i>	1	2	2	1	1	0	1	86	50
<i>Mucor</i>	2	1	2	0	0	0	0	43	31
<i>Penicillium</i>	0	2	2	1	2	1	1	86	56
<i>Paecilomyces</i>	0	0	1	0	0	0	0	14	6
<i>Rhizopus</i>	0	0	1	0	0	0	0	14	6
Total de Coleta/Meio	3	2	3	3	2	2	1		

Quadro 6 - Gêneros de fungos desenvolvidos em diferentes meios de cultura no ambiente de produção de doce de leite.

¹ %M/G = % de meios de cultura que permitiu o crescimento do gênero em relação ao número total de meios de cultura testados.

² %C/TC = % de coletas onde ocorreu a presença do gênero em relação ao número total de coletas realizadas.

GÊNEROS	MEIOS DE CULTURA							% M/G ¹	%C/TC ²
	MA	MEYAM	BDA	DRBC	DG18	PCA-Clor	SABOURAUD		
<i>Aspergillus</i>	3	2	3	2	2	1	1	100	88
<i>Cladosporium</i>	3	2	3	3	2	2	1	100	100
<i>Chrysonilia</i>	1	0	1	1	2	0	0	57	31
<i>Trichoderma</i>	3	1	1	0	2	0	1	71	50
<i>Mucor</i>	1	1	1	0	1	1	0	71	31
<i>Penicillium</i>	2	2	3	2	1	0	0	71	62
<i>Paecilomyces</i>	0	0	0	1	0	0	0	14	6
<i>Rhizopus</i>	1	1	1	1	0	0	1	71	31
<i>Fusarium</i>	0	0	1	0	0	0	0	14	6
<i>Aerobasidium</i>	0	0	1	0	0	0	0	14	6
Total de Coleta/Meio	3	2	3	3	2	2	1		

Quadro 7 - Gêneros de fungos desenvolvidos em diferentes meios de cultura no ambiente de produção de doce de amendoim.

¹ %M/G = % de meios de cultura que permitiu o crescimento do gênero em relação ao número total de meios de cultura testados.

² %C/TC = % de coletas onde ocorreu a presença do gênero em relação ao número total de coletas realizadas.

GÊNEROS	MEIOS DE CULTURA								
	MA	MEAYM	BDA	DRBC	DG18	PCA-Clor	SABOURAUD	% M/G ¹	%C/TC ²
<i>Aspergillus</i>	0	1	1	0	0	2	0	43	22
<i>Cladosporium</i>	3	3	2	3	3	3	1	100	100
<i>Chrysonilia</i>	2	1	0	2	1	1	0	71	39
<i>Trichoderma</i>	1	1	0	0	0	0	0	28	11
<i>Alternaria</i>	1	1	0	0	0	0	0	28	11
<i>Mucor</i>	1	0	0	0	1	0	0	28	11
<i>Penicillium</i>	1	1	2	1	3	0	1	86	50
<i>Paecilomyces</i>	0	0	0	0	1	0	0	14	5
<i>Rhizopus</i>	0	0	0	1	0	0	0	14	5
<i>Curvularia</i>	2	0	0	1	0	1	0	43	22
Total de Coleta/Meio	3	3	2	3	3	3	1		

Quadro 8 - Gêneros de fungos desenvolvidos em diferentes meios de cultura no ambiente de empacotamento de embutidos.

¹%M/G = % de meios de cultura que permitiu o crescimento do gênero em relação ao número total de meios de cultura testados.

²%C/TC = % de coletas onde ocorreu a presença do gênero em relação ao número total de coletas realizadas.

GÊNEROS	MEIOS DE CULTURA								% M/G ¹	%C/TC ²
	MA	MEAYM	BDA	DRBC	DG18	PCA-Clor	SABOURAUD			
<i>Aspergillus</i>	1	2	1	0	1	0	0	57	28	
<i>Cladosporium</i>	3	3	2	3	3	3	1	100	100	
<i>Chrysonilia</i>	0	0	0	2	0	0	1	28	17	
<i>Trichoderma</i>	0	1	0	0	1	0	0	28	11	
<i>Alternaria</i>	1	1	1	0	1	0	0	57	22	
<i>Mucor</i>	0	0	0	1	0	0	0	14	5	
<i>Penicillium</i>	2	3	2	1	3	1	1	100	72	
<i>Paecilomyces</i>	1	1	0	1	1	0	0	57	22	
<i>Rhizopus</i>	0	1	0	0	0	0	0	14	5	
<i>Curvularia</i>	1	1	0	1	0	1	0	57	22	
Total de Coleta/Meio	3	3	2	3	3	3	1			

Quadro 9 - Gêneros de fungos desenvolvidos em diferentes meios de cultura no ambiente de produção de embutidos.

¹ %M/G = % de meios de cultura que permitiu o crescimento do gênero em relação ao número total de meios de cultura testados.

² %C/TC = % de coletas onde ocorreu a presença do gênero em relação ao número total de coletas realizadas.

Face à diversidade de gêneros identificados em cada um dos meios utilizados, torna-se difícil afirmar qual meio seria o mais indicado para o isolamento de determinado gênero de fungo. Somente em termos quantitativos é que este trabalho permite identificar meios melhores para o isolamento de fungos.

Os Quadros de 10 a 17 mostram que espécies indesejáveis como *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *Fusarium moniliforme*, *F. verticilloides*, *Histoplasma capsulatum* e *Stachybotrys chartarum* podem crescer nos meios Sabourand e DRBC, isto quando inoculadas sem a presença de outros gêneros de fungos. Para a identificação de fungos, é de grande importância se conhecer a ocorrência de diferentes cores e tonalidades das colônias em cada meio de cultivo, devido ao grande valor das características morfológicas/culturais na identificação dos mesmos.

Na segunda fase, a espécie *Aspergillus flavus* foi isolada a partir do meio Sabouraud no ambiente da indústria de alimentos, na área de processamento de doces de amendoim, sendo identificada no meio *Aspergillus Flavus Parasiticus* Ágar (Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

Espécie	<i>Aspergillus parasiticus</i>						
Meio de Cultura	DRBC						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	4,2mm	1,51cm	2,1cm	2,8cm	3,0cm	3,83cm	4,12cm
cor	branco	branco	amarelo claro	amarelo claro	amarelo	amarelo	marrom
Meio de Cultura	SABOURAUD						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	8,8mm	2,63cm	4,43cm	5,33cm	tomou a placa		
cor	branco	branco	branco	branco	branco	amarelo	amarelo

Quadro 10 - Diâmetro e cor das colônias de *Aspergillus parasiticus* ao longo do período de incubação.

Espécie	<i>Aspergillus fumigatus</i>						
Meio de Cultura	DRBC						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	0	0	5,5mm	1,08cm	2,16cm	2,8cm	3,0cm
cor	.	.	rosa	branco	branco	branco	branco
Meio de Cultura	SABOURAUD						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	0	8,0mm	2,1cm	3,33cm	5,41cm	6,6cm	tomou a placa
cor	.	branco	branco	branco	branco	branco	branco

Quadro 11 - Diâmetro e cor das colônias de *Aspergillus fumigatus* ao longo do período de incubação.

Espécie	<i>Aspergillus niger</i>						
Meio de Cultura	DRBC						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	5,7mm	1,25cm	2,52cm	3,74cm	5,0cm	tomou a placa	
cor	branco	amarelo claro	amarelo claro	amarelo claro	preto	preto	preto
Meio de Cultura	SABOURAUD						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	9,0mm	3,1cm	6,0cm	7,71cm	tomou a placa		
cor	branco	amarelo claro	centro amarelo com pontos pretos e borda branca	centro amarelo com pontos pretos e borda branca	preto	preto	preto

Quadro 12 - Diâmetro e cor das colônias de *Aspergillus niger* ao longo do período de incubação.

Espécie	<i>Aspergillus flavus</i>						
Meio de Cultura	DRBC						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	3,1mm	8,5mm	1,35cm	2,1cm	3,17cm	4,06cm	4,06cm
cor	branco	amarelo claro	amarelo claro	amarelo claro	amarelo	marrom	marrom
Meio de Cultura	SABOURAUD						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	5,5mm	1,64cm	2,45cm	3,48cm	4,0cm	4,95cm	4,95cm
cor	branco	branco	amarelo claro	amarelo claro	amarelo	marrom	marrom

Quadro 13 - Diâmetro e cor das colônias de *Aspergillus flavus* ao longo do período de incubação.

Espécie	<i>Fusarium verticilloides</i>						
Meio de Cultura	DRBC						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	3,0mm	6,7mm	1,2cm	1,76cm	2,04cm	2,55cm	3,43cm
cor	branco	branco	rosa claro	rosa claro	rosa claro	lilás	lilás
Meio de Cultura	SABOURAUD						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	3,0mm	1,67cm	2,89cm	3,91cm	4,45cm	4,72cm	tomou a placa
cor	branco	branco	rosa claro	rosa claro	rosa claro	lilás	lilás

Quadro 14 - Diâmetro e cor das colônias de *Fusarium verticilloides* ao longo do período de incubação.

Espécie	<i>Fusarium moniliforme</i>						
Meio de Cultura	DRBC						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	3,0mm	1,1cm	1,84cm	2,37cm	2,52cm	3,31cm	3,93cm
cor	branco	branco	centro branco e borda rosa	centro branco e borda rosa	centro branco e borda rosa	amarelo claro	amarelo
Meio de Cultura	SABOURAUD						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	4,2mm	2,47cm	4,1cm	5,76cm	6,95cm	7,52cm	tomou a placa
cor	branco	branco	branco	branco	branco	amarelo claro	amarelo claro

Quadro 15 - Diâmetro e cor das colônias de *Fusarium moniliforme* ao longo do período de incubação.

Espécie	<i>Stachybotrys chartarum</i>						
Meio de Cultura	DRBC						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	1,6mm	4,3mm	6,1mm	6,5mm	6,5mm	8,87mm	8,87mm
cor	levemente marrom	levemente marrom	marrom claro	marrom claro	marrom claro	marrom	marrom
Meio de Cultura	SABOURAUD						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	1,6mm	4,0mm	6,4mm	7,9mm	7,9mm	10,17mm	10,17mm
cor	levemente marrom	levemente marrom	marrom claro	marrom claro	marrom claro	marrom	marrom

Quadro 16 - Diâmetro e cor das colônias de *Stachybotrys chartarum* ao longo do período de incubação.

Espécie	<i>Histoplasma capsulatum</i>						
Meio de Cultura	DRBC						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	1,9mm	6,1mm	1,4cm	1,59cm	1,89cm	1,89cm	2,0cm
cor	branco	branco	branco	branco	branco	levemente verde	levemente verde
Meio de Cultura	SABOURAUD						
Incubação em dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
diâmetro da colônia	3,4mm	6,85mm	1,15cm	2cm	2,31cm	2,31cm	2,7cm
cor	branco	branco	branco	branco	branco	levemente verde	levemente verde

Quadro 17- Diâmetro e cor das colônias de *Histoplasma capsulatum* ao longo do período de incubação.

4.3 Avaliação da contagem total de bactérias

Tendo em vista, que poucos pesquisadores no mundo sugeriram padrões referenciais em relação à qualidade microbiológica do ar, para estruturas bacterianas, a presente pesquisa, coletou dados que podem vir a ser úteis, por ocasião de estudos para estabelecimento de padrões nacionais.

Segundo Padrão Referencial Brasileiro Microbiológico (1998), os ambientes não apresentam situações problemáticas, quando bactérias Gram-positivas, como *Micrococcus* sp, *Streptococcus* sp e *Staphylococcus* sp predominarem no ambiente, em populações abaixo de 200 ufc/ m³. Apesar de não ter sido realizado o teste Gram, os ambientes avaliados apresentaram populações de bactérias que merecem atenção especial pelos altos valores observados.

No Quadro 18 são apresentadas as contagens de bactérias (ufc/m³) nos ambientes estudados.

Data de coleta	Ambientes	
	Doce de leite	Doce de amendoim
Mai/00	622	645
Ago/00	331	223
Jan/01	426	446
Data de coleta	Ambientes	
	Produção de Embutidos	Empacotamento de Embutidos
Set/00	820	906
Dez/00	2380	2926
Jan/01	3946	2456

Quadro 18 - Unidades formadoras de colônias/m³ (valores médios) de bactérias nos diferentes ambientes amostrados (médias de três repetições).

Nos ambientes estudados foram encontrados médias, entre as três coletas, de 449 e 2239 ufc de bactérias/m³, para indústria de doces e frigorífico, respectivamente. Os dados encontrados sugerem que novos estudos sejam realizados, no sentido de caminhar para um padrão referencial que possa ser utilizado no monitoramento dos ambientes de processamento de alimentos.

4.4 Avaliação ambiental das instalações amostradas

O parâmetro empregado na avaliação ambiental restringiu-se aos resultados de contagem de propágulos de fungos, em valores absolutos, considerando-se que um ambiente está em boas condições, se apresentar valor de contagem igual ou menor que 750 ufc/m³ e não houver espécies toxigênicas e ou patogênicas (Resolução nº 176).

Partindo deste princípio, os meios de cultura que apresentaram baixa contagem estariam na maioria dos casos avaliando os ambientes amostrados como em boas condições (Quadros 1 e 2), o que de fato não é o real, pois quando se consideram as contagens em DRBC e Sabouraud Dextrose a 4% Agar, esses mesmos ambientes tornam-se passíveis de avaliação quanto à fonte de contaminação e preocupação quanto à possibilidade de ocorrência de patógenos indesejáveis.

Devido ao fato destes ambientes não serem totalmente climatizados, a relação ambiental externo/interno não foi considerada.

As altas contagens de fungos encontradas constituem-se em fato preocupante, pois, apesar de muitos não pertencerem a gêneros com potencial de patogenicidade e/ou toxicidade, a ocorrência de *A. flavus* torna o ambiente de risco para os produtos e manipuladores, e a preocupação ainda mais relevante. A presença do gênero *Aspergillus* na área de produção de doces, principalmente na área de produção do doce

de amendoim, onde a espécie toxigênica *A. flavus* esteve presente, torna-se preocupante pelo fato de que os esporos e fragmentos de micélio podem conter altas concentrações de toxinas, sendo a inalação desses na colheita do milho e do amendoim, ou no trabalho em plantas de processamento, relatada na indução do câncer de fígado, além de toxicidade aguda (World Health Organization, 1988).

De acordo com os padrões de Kurata (1994) os ambientes estudados estariam altamente comprometidos, pois classificou os ambientes de processamento e empacotamento de alimento como ruins acima de 100 ufc/m³. As contagens de fungos no presente trabalho variaram de 230 a 6926 ufc/m³, encontradas nos meios MA e DRBC, respectivamente.

Considerando as condições dos ambientes estudados no presente trabalho, torna-se necessário que padrões brasileiros de contaminação biológica em ambientes industriais sejam estabelecidos para seu monitoramento. Além disso, a arquitetura das instalações deve ser revista, com soluções principalmente para pequenas e médias empresas dentro da realidade do nosso país, visando minimizar tanto os efeitos nocivos à saúde, como econômicos que este quadro pode representar.

Os ambientes estudados não apresentam um fluxograma que proporcione condições satisfatórias no processamento e empacotamento dos produtos, tanto na indústria de doces como no frigorífico. Na indústria de doces o recebimento da matéria-prima para o doce de amendoim, ou seja, o amendoim em grãos é recebido e processado na mesma planta em que os doces são processados e empacotados. Ainda, circuladores de ar ajudam a dispersar as fontes poluentes por toda a fábrica. Já no frigorífico, a alta umidade faz desenvolver fontes de contaminação microbiana pelo teto e parte das paredes que não possuem revestimento apropriado.

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que entre os meios utilizados para quantificação de fungos no ar, ‘Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar’ (DRBC) e ‘Sabouraud Dextrose a 4% Agar’ devem ser recomendados para a avaliação quantitativa de fungos, no ar, de ambientes interiores. Sugere-se que a Resolução 176 de 28 de outubro de 2000 seja revista quanto à recomendação do meio de Malte para coletas ambientais, pois o mesmo se apresentou como o de menor desempenho dentre todos os meios avaliados.

Dentre os meios estudados não foi possível concluir sobre o melhor para a identificação de fungos, no entanto, pode-se recomendar o meio DRBC, principalmente em situações de alta concentração de bactérias e fungos de crescimento rápido que podem comprometer a avaliação. Ainda, reprova-se o PCA- cloranfenicol que apresentou a mais baixa diversidade de gêneros.

A dificuldade na identificação dos gêneros e espécies presentes em tempo reduzido é problemática, uma vez que, respostas para medidas corretivas de controle devem ser imediatas. Assim, estudos na área molecular, como desenvolvimento de primers específicos para a identificação de fungos de interesse à saúde, tornam-se uma ferramenta indispensável para auxiliar o monitoramento dos ambientes.

A necessidade de caminhar para um padrão referencial nacional para monitoramento microbiológico de ambientes de processamento e

empacotamento de alimentos é indispensável e urgente, uma vez que a avaliação quali-quantitativa dos ambientes estudados mostrou que estes não se encontram em boas condições ambientais, quanto à contaminação microbiana.

No geral, as instalações estudadas devem ajustar o fluxograma do processo industrial, como separar as áreas de recebimento de matéria-prima, processamento e empacotamento, pois não apresentam condições satisfatórias que permitam evitar a contaminação cruzada. A arquitetura destes ambientes deve ser revista, principalmente nas áreas de produção e empacotamento que não apresentam nenhum tipo de barreira física e revestimento de paredes e pisos que promovam a melhoria na qualidade microbiológica do ar.

O amostrador de impactação utilizado promoveu rapidez e proporcionou a expressão dos resultados em medidas confiáveis, por ser um equipamento que permite calibração em seu sistema de aspiração de ar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUFF, G.R. Media, reagents, and stains. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F.(Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: Edwards Brothers, 1992. chap.62, p.1093-1208.

ANGULO-ROMERO, J.; INFANTE-GARCÍA-PANTALEÓN, F.; DOMÍNGUEZ-VILCHES, E.; MEDIAVILLA-MOLINA, A.; CARIDAD-OCERÍN, J.M. Pathogenic and antigenic fungi in school dust of the south of Spain. In: MUILENBERG, M.; BURGE, H. (Ed.). **Aerobiology**. Tokyo: Lewis Publishers, 1996. chap.5, p.49-66.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.H. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1972. 241p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº3.523/GM de 28 de agosto de 1998. **Diário Oficial**, 31 ago. 1998. Seção 1, p. 41- 42. Dispõe sobre orientação de medidas para controle do ar de interiores em ambientes climatizados. <http://www.anvisa.gov.com.br>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº176 de 24 de outubro de 2000. **Diário Oficial**, 25 out. 2000. Dispõe-se sobre normas de controle da qualidade do ar de interiores em ambientes climatizados. <http://www.anvisa.gov.com.br>.

BRICKUS, L.S.R.; AQUINO NETO, F.R. de. A qualidade do ar de interiores e a química. **Química Nova**, v.22, n.1, p.1-10, 1999.

BUTTNER, M.P.; STETZENBACH, L.D. Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.1, p.219-226, 1993.

EZEONU I.M.; PRICE, D.L.; SIMMONS, R.B.; CROW, S.A.; AHEARN, D.G. Fungal production of volatiles during growth on fiberglass. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.11, p.4172-4173, nov.1994.

FOOD and drug administration: bacteriological analytical manual. 8.ed. Gaithersburg: AOAC International, 1998. 1.01-28.09p.

FELDMAN, K. Sampling for airborne contaminants. **Biocycle**, v.36, n.8, p.84-86, Aug.1995.

FLANNIGAN, B.; MILLER, J.D. Health implications of fungi in indoor environments – an overview. In: SAMSON, R.A.; FLANNIGAN, B.; FLANNIGAN, M.E.; VERHOEFF, A.P.; ADAN, O.C.G.; HOEKSTRA, E.A.(Ed). **Health implications of fungi in indoor environments**. Tokyo: Elsevier, 1994. chap.1, p.3-38. (Air Quality Monographs, 2)

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

KULCSAR NETO, F.; SIQUEIRA, L.F. de G. Padrões referenciais para análise de resultados de qualidade microbiológica em interiores visando a saúde pública no Brasil. **Revista Brasindoor**, v.2, n.10, p.4-20, jul./ago./set. 1998.

KURATA, H. Mycological monitoring for sanitary evaluation in the Japanese food industry. In: SAMSON, R.A.; FLANNIGAN, B.; FLANNIGAN, M.E.; VERHOEFF, A.P.; ADAN, O.C.G.; HOEKSTRA, E.A.(Ed.). **Health implications of fungi in indoor environments**. Tokyo: Elsevier, 1994. chap.2, p.31-37: Current methodology on isolation and detection of molds. (Air Quality Monographs, 2)

LACAZ, C. da S. **O grande mundo dos fungos**. São Paulo: Polígono AS, 1970. 255p.

LACAZ, C. da S; PORTO, E.; VACCARI, E.M.H.; MELO, N. T. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998. 445p.

LIGUGNANA, R.; FUNG, D.Y.C. Training of food and dairy staff for microbiological air and surface hygiene. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, v.10, n.3, p.130-135, Mar.1990.

- MACNEIL, L.; KAURI, T.; ROBERTSON, W. Molecular techniques and their potential application in monitoring the microbiological quality of indoor air. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.657-665, 1995.
- MERCK. **Air MAS-100**: microbiological air sample-operator's manual. Darmstadt, s.d. 47p.
- NOGUEIRA, M.C.S. **Curso de estatística experimental aplicada à experimentação agrônômica**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1991. 236p.
- PADRÃO referencial brasileiro microbiológico. **Revista Brasindoor**, v.2, n.10, p.21, jul./ago./set./1998.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1981. 1072p.
- PITT, J.I; HOCKING, A D. **Fungi and food spoilage**. 2.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 593p.
- SVEUM, W.H.; MOBERG, L.J.; RUDE, R.A.; FRANK, J.F. Microbiological monitoring of the food processing environmental. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F.(Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: Edwards Brothers, 1992. chap.3, p.51-74.

TOURNAS, V.; STACK, M.E.; MISLIVEC, P.B.; KOCH, H.A.; BANDLER, R. Yeasts, molds and mycotoxins. In: Food and drug administration: bacteriological analytical manual. 8.ed. Gaithersburg: AOAC International, 1998. chap.18, p.18.01-18.09.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington: Edwards Brothers, 1992. 1219p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Indoor air quality**: biological contaminants: Rautavaara: WHO Regional Publications, 1988. 67p. (European Series, 31)

APÊNDICES

APÊNDICE 1

R	Pr	R	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	R	Pr	r	Pr
1	1	51	54	101	116	151	189	201	279	251	394	301	557	351	836
2	2	52	56	102	118	152	191	202	281	252	397	302	561	352	844
3	3	53	57	103	119	153	193	203	283	253	400	303	565	353	853
4	4	54	58	104	120	154	194	204	285	254	402	304	569	354	861
5	5	55	59	105	122	155	196	205	287	255	405	305	573	355	870
6	6	56	60	106	123	156	197	206	289	256	408	306	578	356	879
7	7	57	61	107	124	157	199	207	291	257	411	307	582	357	888
8	8	58	63	108	126	158	201	208	293	258	413	308	586	358	897
9	9	59	64	109	127	159	202	209	295	259	416	309	591	359	907
10	10	60	65	110	128	160	204	210	297	260	419	310	595	360	917
11	11	61	66	111	130	161	206	211	299	261	422	311	599	361	927
12	12	62	67	112	131	162	207	212	301	262	425	312	604	362	937
13	13	63	68	113	133	163	209	213	304	263	428	313	608	363	947
14	14	64	70	114	134	164	211	214	306	264	431	314	613	364	958
15	15	65	71	115	135	165	212	215	308	265	433	315	618	365	969
16	16	66	72	116	137	166	214	216	310	266	436	316	622	366	981
17	17	67	73	117	138	167	216	217	312	267	439	317	627	367	992
18	18	68	74	118	140	168	218	218	314	268	442	318	636	368	1005
19	19	69	76	119	141	169	219	219	317	269	445	319	637	369	1017
20	20	70	77	120	142	170	221	220	319	270	449	320	642	370	1030
21	22	71	78	121	144	171	223	221	321	271	452	321	647	371	1043
22	23	72	79	122	145	172	224	222	323	272	455	322	652	372	1057
23	24	73	80	123	147	173	226	223	325	273	458	323	657	373	1071
24	25	74	82	124	148	174	228	224	328	274	461	324	662	374	1086
25	26	75	83	125	150	175	230	225	330	275	464	325	667	375	1102
26	27	76	84	126	151	176	232	226	332	276	467	326	673	376	1118
27	28	77	85	127	153	177	233	227	335	277	471	327	678	377	1134
28	29	78	87	128	154	178	235	228	337	278	474	328	684	378	1152
29	30	79	88	129	156	179	237	229	339	279	477	329	689	379	1170
30	31	80	89	130	157	180	239	230	342	280	480	330	695	380	1189
31	32	81	90	131	158	181	241	231	344	281	484	331	701	381	1209
32	33	82	92	132	160	182	242	232	346	282	487	332	706	382	1230
33	34	83	93	133	161	183	244	233	349	283	491	33	712	383	1252
34	35	84	94	134	163	184	246	234	351	284	494	334	718	384	1276
35	37	85	95	135	164	185	248	235	353	285	497	335	724	385	1301
36	38	86	97	136	166	186	250	236	356	286	501	336	730	386	1327
37	39	87	98	137	167	187	252	237	358	287	504	337	737	387	1356
38	40	88	99	138	169	188	254	238	361	288	508	338	743	388	1387
39	41	89	101	139	171	189	255	239	363	289	511	339	749	389	1420
40	42	90	102	140	172	190	257	240	366	290	515	340	756	390	1456
41	43	91	103	141	174	191	259	241	368	291	519	341	763	391	1496

Quadro 19 – Correção estatística “Feller”.

r = Número de unidades formadoras de colônias em 90 mm Petridish.

Pr = Probabilidade estatística total.

42	44	92	104	142	175	192	261	242	371	292	522	342	769	392	1541
43	45	93	106	143	177	193	263	243	373	293	526	343	776	393	1591
44	47	94	107	144	178	194	265	244	376	294	530	344	783	394	1648
45	48	95	108	145	180	195	267	245	378	295	534	345	791	395	1715
46	49	96	110	146	181	196	269	246	381	296	537	346	798	396	1795
47	50	97	111	147	183	197	271	247	384	297	541	347	805	397	1895
48	51	98	112	148	185	198	273	248	386	298	545	348	813	398	2028
49	52	99	114	149	149	199	275	249	389	299	549	349	820	399	2228
50	53	100	115	150	188	200	277	250	391	300	553	350	828	400	2628

Quadro 19 – Correção estatística “Feller”.

r = Número de unidades formadoras de colônias em 90 mm Petridish.

Pr = Probabilidade estatística total.

APÊNDICE 2



Figura 1 - Amostrador microbiológico de ar da marca MERCK denominado MAS-100.