

EDELVINA MARIA DE CARVALHO GONÇALVES NUNES

MICROBIOTA FÚNGICA NOS INGREDIENTES E EM RAÇÃO PARA
PISCICULTURA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TERESINA-PIAUÍ
2009

N972 Nunes, Etelvina Maria de Carvalho Gonçalves
 Micobiota fúngica nos ingredientes e em ração
 comercial para piscicultura. [manuscrito] / Etelvina
 Maria de Carvalho Gonçalves Nunes – 2009.

32f. il.

Cópia de computador (printout)

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal, Teresina, 2009.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Maria Christina Sanches
Muratori

1.Micobiota fúngica 2.Micotoxinas 3.Piscicultu-
ra. I. Título.

CDD 576.165

E TELVINA MARIA DE CARVALHO GONÇALVES NUNES

MICROBIOTA FÚNGICA NOS INGREDIENTES E EM RAÇÃO PARA
PISCICULTURA

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciência
Animal da Universidade Federal do Piauí
como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Maria Christina Sanches Muratori

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
TERESINA-PIAUI

2009

MICROBIOTA NOS INGREDIENTES E EM RAÇÃO PARA PISCICULTURA

Etelvina Maria de Carvalho Gonçalves Nunes

Dissertação aprovada em 04/12/2009

Banca examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Maria Christina Sanches Muratori – DMV/CCA-UFPI

Prof.^a. Dr.^a. Lucília Silva Crispim – FATEC

Prof.^a. Dr.^a. Maria Marlúcia Gomes Pereira – DMV/CCA-UFPI

Dedico,

Aos meus pais Anete e Nunes, exemplos de honestidade e trabalho, por terem me dado oportunidade de estudar, mostrando a importância da educação na formação pessoal e profissional.

Aos meus irmãos e irmãs, em especial Elisa Rosa, Anna Augusta e Ceiza, pelos conselhos e incentivos ao estudo.

Ao Luciano, pela compreensão e apoio nesta caminhada e pela presença em minha vida.

Agradecimentos

A realização deste trabalho em muito se deve à colaboração e apoio de diversas pessoas, as quais transmito os mais sinceros agradecimentos:

A Deus por ter me conduzido nesta longa jornada;

A Universidade Federal do Piauí pela oportunidade de realização do curso;

A Prof^a Dr^a Maria Christina Sanches Muratori, pela (s) orientação, disponibilidade, dedicação, oportunidades, discussões construtivas e pelo aprendizado nestes anos de convivência;

A Prof^a Dr^a Maria Marlúcia Gomes Pereira, “prof”, amiga e mãe, pelos conselhos, pela disponibilidade, paciência, pelo aprendizado e contribuição para elaboração deste estudo;

A Prof^a Dr^a Lucília Silva Crispim, pelos ensinamentos durante a graduação, contribuindo para realização deste trabalho e por ter aceitado o convite de participar da banca examinadora;

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pelos conhecimentos repassados, em especial aos Prof^o Dr^o Ivan Sampaio e Dr^o João Batista Lopes, pelas sugestões para elaboração da pesquisa;

As queridas Lucilene Santos, Érica Diana e Mercilane Mota, sempre presentes, pelo incentivo e amizade;

Aos novos amigos que fiz nesta caminhada: Rodrigo Maciel Calvet – “Chefinho”, pela disponibilidade, positividade, ajuda e pelos ensinamentos “fúngicos”;

Ana Luísa Alves Marques, pela amizade, dedicação e ajuda prestada, sendo fundamentais para realização e concretização deste sonho;

Ao Domingos Urquiza, companheiro do mestrado e do estágio a docência;

E ainda aos colegas: Francisco Cardoso Filho; Ygor Flávio de Moraes Santos, Átylla Peeter Batista Veloso; Flávio e Sinevaldo pela ajuda prestada, principalmente durante estadia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ); a Aline Marques Monte, pelas análises no laboratório de Controle Físico-Químico de Alimentos; Aline Dourado; Pollyanna e Cristiane;

Aos funcionários do Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento dos Alimentos (NUEPPA); George Emanuel, pela ajuda fundamental no Laboratório de Controle Microbiológico dos Alimentos; Sr. Antônio Fernandes; Sr. José, Sr. Francisco e Sr. Amintas pela presteza;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro através da concessão de bolsa de estudos;

Ao proprietário da fábrica de ração, pela colaboração prestada, disponibilizando o objeto de estudo da pesquisa e sendo ponto chave para a realização deste trabalho;

Aos funcionários da fábrica de ração, pela disposição durante as coletas, principalmente: Nazaré, Daniela e Márcio;

Ao Profº Drº Carlos Alberto da Rocha Rosa, pela oportunidade de realização de estágio na UFRRJ, contribuindo para troca de saberes entre estudantes e pesquisadores desta linha de pesquisa;

A Kelly Keller, pela paciência e apoio durante o estágio na UFRRJ;

Aos integrantes da equipe de pesquisa em Micologia e Micotoxicologia da UFRRJ: Águida, pela paciência e ensinamentos; Carla, presteza durante minha estadia;

Luís; Michele; Ana; Tati, pela identificação das espécies de *Fusarim*; Francine; Lucila; Renata; Tayane; Bia Monteiro; Bia Queiroz; a todos pela ajuda prestada;

As colegas de São Luís: Priscila, Elka e Iderlane, pela colaboração prestada;

A amiga Fabrícia Gonçalves de Oliveira, pelo apoio e disponibilidade durante minha estadia no Rio de Janeiro;

A Lidiana Siqueira Ramos, pelo (s) conselhos, incentivo e apoio nesta caminhada;

Aos funcionários da Pós-Graduação em Ciência Animal, MSc Luís Gomes da Silva, pela disponibilidade e presteza

A todos aqueles que mesmo não sendo citados, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 CAPÍTULO	16
Resumo.....	17
Abstract.....	18
Introdução.....	18
Material e Métodos.....	20
Resultado e Discussão.....	23
Considerações Finais.....	28
Referência Bibliográfica.....	30

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO

	Página
Tabela 1. Médias das contagens de fungos filamentosos e leveduras (ufc/g em \log_{10}) em rações para peixes e seus ingredientes coletadas.....	23
Tabela 2 Gênero de fungos isolados de ingredientes e de rações utilizadas na piscicultura.....	25
Tabela 3 Número de espécies fúngicas isoladas de ingredientes e rações utilizadas em piscicultura.....	26

MICROBIOTA FÚNGICA NOS INGREDIENTES E EM RAÇÃO PARA PISCICULTURA

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi pesquisar a microbiota toxígena na ração comercial para peixes e nos seus ingredientes utilizados. Para contagem de fungos filamentosos e leveduras nas rações e seus ingredientes, foi utilizada a metodologia decimal seriada (10^{-1} a 10^{-3}) recomendada por PITT; HOCKING (1999). As colônias fúngicas pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram identificadas utilizando as chaves de identificação descritas por KLICH; PITT (2002), baseadas na semeadura os meios básicos: Czapek yeast extract agar (CYA); malt extract agar (MEA); Czapek yeast extract agar 20% sucrose (CY20S) para *Aspergillus* e CYA, MEA e Agar 25% Glicerol Nitrate (G25N) para *Penicillium*. Para identificação da espécie das colônias de *Fusarium* spp seguiu-se a chave recomendada por NELSON et al. (1983). As contagens fúngicas do farelo de soja, do farelo de milho e da ração para peixes foram semelhantes em todas as coletas. A ração formulada com estes ingredientes apresentou valores inferiores a 7,0 ufc/g em \log_{10} . Foram isoladas 116 cepas de oito gêneros de fungos filamentosos e também cepas da ordem Mucorales. Os fungos prevalentes nos ingredientes e nas rações utilizados para piscicultura pertenciam aos gêneros *Penicillium* (50,9%) e *Aspergillus* e seus teleomorfos (29,3 %).

Palavras-chave: Fungos, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, Micotoxinas, Alimento para peixes

MYCOBIOTA FUNGUS IN AND FEED INGREDIENTS FOR FISH

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the toxigenic mycoflora the commercial feed for fish and ingredients used. To count of filamentous fungi and yeast in the diets and ingredients, we used the methodology serial decimal (10⁻¹ to 10⁻³) recommended by PITT, HOCKING (1999). The fungal colonies belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium* were identified using identification keys described by KLICH; PITT (2002), based on seeding the basic means: Czapek yeast extract agar (CYA), malt extract agar (MEA), Czapek yeast extract 20% sucrose agar (CY20S) for *Aspergillus* and CYA, MEA and 25% Glycerol Agar Nitrate (G25N) for *Penicillium*. For species identification of colonies of *Fusarium* spp followed by the key recommended by NELSON et al. (1983). Fungal counts of soybean meal, corn bran and feed for fish were similar in all samples. The ration formulated with these ingredients had values less than 7,0 ufc / g in log₁₀. We isolated 116 strains of eight genera of filamentous fungi and also strains of Mucorales. Fungi prevalent in the diets and ingredients used for fish belonged to the genus *Penicillium* (50.9%) and *Aspergillus* and its toxigenic (29.3%).

Keywords: Fungi, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, Mycotoxins, Fish food

INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se por possuir imenso potencial para o desenvolvimento da piscicultura por meio dos 8,5 mil km de litoral e 5,5 milhões hectares de reservatórios de águas doces, representando aproximadamente 8,0 % da água doce disponível no planeta (DUARTE, 2009).

A produção da aquicultura brasileira tem crescido em média 27,5 % ao ano nos últimos cinco anos. Enquanto isso, a aquicultura mundial tem desenvolvido aproximadamente 7,0 % ao ano no mesmo período. Há, portanto, uma evolução em curso no setor aquícola do país. A produção extrativa marinha, apesar de não ter crescido substancialmente em quantidade, tem evoluído em qualidade, sendo que mais peixes nobres passaram a ser capturados. Não obstante, o país é hoje o 27º produtor mundial de pescados (BRASIL, 2009). A piscicultura no Estado do Piauí ainda é pouco desenvolvida, contudo, pelo aumento crescente do interesse dos consumidores por peixes, esta atividade tende a ser mais valorizada.

Segundo a Organização para a Agricultura e a Alimentação em 2003 no Brasil foram consumidos 6,0 kg/pessoa/ano de pescado marinho e 2,0 kg/pessoa/ano de pescado de água continental (FAO, 2009). No Piauí, a média de consumo de peixe é de 3,0 kg/pessoa/ano (FREITAS, 2008). Estes valores foram inferiores ao recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a qual indica que o ideal seria a ingestão, por pessoa, de 12 quilos por ano (MENEGAZZO, 2008).

Os piscicultores dispõem de rações comerciais formuladas especialmente para atender às necessidades nutricionais dos peixes nas diversas fases do ciclo produtivo. Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal (SINDIRAÇÕES),

no ano de 2001 foram produzidas 162 mil toneladas de ração para organismos aquáticos, passando para 202,3 mil toneladas em 2002, com uma projeção de 247,5 mil toneladas para 2003 (FREITAS, 2008).

A ração representa o principal custo operacional em piscicultura e na sua formulação são empregados diversos ingredientes balanceados que garantem bom desempenho na produtividade animal. Estes nutrientes constituem-se substratos ideais para o desenvolvimento de fungos, que são microorganismos multicelulares e filamentosos, que ao contaminarem os grãos ou alimentos podem produzir substâncias tóxicas tais como micotoxinas, às vezes carcinogênicos aos animais (DETROY, 1971; TRABULSI et al, 2002). Portanto, a contaminação de alimentos com fungos e a consequente produção de micotoxinas representam perdas econômicas bastante significativas na produção de animais (PEREIRA et al, 2005).

A contaminação das rações pode ser decorrente dos fungos presentes no ambiente, nas instalações da fábrica, durante o transporte e armazenamento inadequado em galpões com umidade elevada em seu interior (GIMENO, 2000).

As micotoxinas são produtos tóxicos do metabolismo secundário de algumas espécies de fungos quando estes são privados de um ou mais nutrientes importantes, em presença de umidade e temperatura adequadas (ROSA, 2002). São conhecidas mais de 80 espécies fúngicas que produzem mais de 300 diferentes tipos de micotoxinas em quase todos os tipos de produtos alimentícios, como: arroz, milho, feijão, trigo, cevada, soja, castanha do Brasil, farinha de peixe, frutas, presunto, queijo, leite, e até vinho (BATISTA; FREITAS, 2000).

Fungos produtores de micotoxinas podem ser classificados, de acordo com o habitat e o substrato oferecido para o seu desenvolvimento, em três grupos: fungos de

campo, que geralmente contaminam plantas, antes mesmo que se realizem as colheitas; fungos de armazenamento, que se desenvolvem durante o armazenamento do alimento; e fungos de decomposição, tornando o alimento impróprio para o consumo devido à deterioração e produção de micotoxinas (CONCON, 1998 apud MÍDIO; MARTINS, 2000; GIMENO, 2000).

Os principais fungos toxígenos pertencem aos gêneros: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicilium*. São os de maior importância para o alimento e ração, por serem os mais encontrados e os maiores produtores de micotoxinas (BATISTA; FREITAS, 2000; GIMENO, 2000; PEREIRA, 2003;). Espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicilium* e *Fusarium* foram isoladas no litoral piauiense em rações para camarões (SANTOS, 2006; CALVET, 2008).

A ingestão de alimentos contaminados por micotoxinas, dependendo da concentração, pode causar redução no crescimento, alteração macroscópica no fígado (coloração pálida e áreas esbranquiçadas, com uma vesícula biliar bem desenvolvida e amarelada) de peixes, bem como deposição residual no fígado e na carcaça (LOPES et al, 2005).

A pesquisa de fungos toxígenos em rações assume um papel importante, já que os alimentos fornecidos aos peixes são susceptíveis a contaminação por fungos e suas micotoxinas, podendo acarretar perdas econômicas consideráveis na criação de peixes, interferindo no crescimento, desenvolvimento e reprodução desses animais.

Baseado nestes dados foi formulada a seguinte hipótese: o controle sanitário da matéria-prima incorporada na formulação influencia na presença e desenvolvimento de fungos toxígenos nas rações utilizadas em piscicultura.

Para testar a hipótese, o objetivo do presente trabalho foi: pesquisar a micobiota

toxígena na ração comercial para peixes e nos seus ingredientes utilizados.

O capítulo foi apresentado na forma de artigo científico, obedecendo às normas do periódico **Aquaculture Research**, o qual será submetido à publicação.

CAPÍTULO

MICROBIOTA FÚNGICA NOS INGREDIENTES E EM RAÇÃO PARA
PISCICULTURA

MYCOBIOTA FUNGUS IN AND FEED INGREDIENTS FOR FISH

**E M C G Nunes¹; M C S Muratori²; M M G Pereira²; A P R Costa²; R M Calvet³; A
L A Marques⁴; F C Cardoso Filho⁵; K M Keller⁶; C A R Rosa⁷**

¹ Médica Veterinária, Mestre em Ciência Animal-CCA/Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, Brasil.

² Docentes do Departamento de Morfofisiologia Veterinária- CCA/Universidade Federal do Piauí;

³ Médico Veterinário, Doutorando em Ciência Animal-CCA/Universidade Federal do Piauí;

⁴ Graduanda do Curso de Medicina Veterinária- CCA/Universidade Federal do Piauí;

⁵ Médico Veterinário, Mestrando em Ciência Animal-CCA/Universidade Federal do Piauí

⁶ Médica Veterinária, Doutoranda em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

⁷ Professor Titular de Micologia e Micotoxicologia-DMIV/IV/ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Correspondência: E. M. C. G. Nunes, Universidade Federal do Piauí. Teresina, Brasil.

E-mail: etelnunes@yahoo.com.br

RESUMO

A pesquisa da microbiota fúngica em rações assume um papel importante, já que os alimentos fornecidos aos peixes são susceptíveis a contaminação por fungos e suas micotoxinas, podendo acarretar perdas econômicas consideráveis na criação de peixes, interferindo no crescimento, desenvolvimento e reprodução desses animais. Foram

avaliadas as condições das rações para peixes e dos ingredientes utilizadas para sua fabricação em relação à micobiota fúngica. A contagem de fungos filamentosos e leveduras (ufc/g) foi realizada através da metodologia decimal seriada (10^{-1} a 10^{-3}) em Agar Dichloran Bengal Clorafenicol, a 25,0°C por cinco a sete dias. As colônias fúngicas pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram identificadas utilizando as chaves de identificação descritas por KLICH; PITT (2002). Para identificação da espécie das colônias de *Fusarium* spp seguiu-se a chave recomendada por NELSON et al. (1983). As contagens fúngicas do farelo de soja, do farelo de milho e da ração para peixes foram semelhantes em todas as coletas. A ração formulada com estes ingredientes apresentou valor médio de 4,38 ufc/g em \log_{10} . Foram isoladas 116 cepas de oito gêneros de fungos filamentosos e também cepas da ordem Mucorales. Os fungos prevalentes nos ingredientes e nas rações utilizados para piscicultura pertenciam aos gêneros *Penicillium* (50,9%) e *Aspergillus* e seus teleomorfos (29,3 %).

Palavras-chave: Micobiota fúngica, Micotoxinas, Piscicultura, Ração

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the toxigenic mycoflora the commercial feed for fish and ingredients used. To count of filamentous fungi and yeast in the diets and ingredients, we used the methodology serial decimal (10^{-1} to 10^{-3}) recommended by PITT, HOCKING (1999). The fungal colonies belonging to the genera *Aspergillus* and *Penicillium* were identified using identification keys described by KLICH; PITT (2002), based on seeding the basic means: Czapek yeast extract agar (CYA), malt

extract agar (MEA), Czapek yeast extract 20% sucrose agar (CY20S) for *Aspergillus* and CYA, MEA and 25% Glycerol Agar Nitrate (G25N) for *Penicillium*. For species identification of colonies of *Fusarium* spp followed by the key recommended by NELSON et al. (1983). Fungal counts of soybean meal, corn bran and feed for fish were similar in all samples. The ration formulated with these ingredients had values less than $7,0 \text{ ufc} / \text{g}$ in \log_{10} . We isolated 116 strains of eight genera of filamentous fungi and also strains of Mucorales. Fungi prevalent in the diets and ingredients used for fish belonged to the genus *Penicillium* (50.9%) and *Aspergillus* and its toxigenic (29.3%).

Keywords: Mycobiota toxigenicity, Mycotoxins, Pisciculture, Ration

INTRODUÇÃO

Os cereais pertencem, desde épocas remotas, à categoria dos nutrientes essenciais à humanidade e constituem a base da alimentação, não só do homem, mas também das diferentes espécies animais (KELLER, 2009). No preparo de rações os principais cereais utilizados nas formulações para peixes são: milho, soja e trigo. Além destes cereais também são utilizados outros ingredientes, dentre eles as farinhas de carne e de peixe.

Deste modo, os ingredientes citados possuem nutrientes adequados ao crescimento celular e quando são estocadas em ambientes com umidade elevada tornam-se suscetíveis ao desenvolvimento dos fungos adquiridos durante a pré e pós-colheita, no armazenamento, na manufatura e no processamento (GIMENO, 2000).

Muitas espécies podem desenvolver-se utilizando os grãos como substrato, no entanto *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., e *Fusarium* spp. são as mais encontradas. Sob condições de armazenagem, com temperatura e atividade de água adequadas, as

espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são as que mais proliferam, enquanto que as espécies de *Fusarium* são capazes de crescer e produzir suas toxinas ainda no campo (PEREIRA, 2003; CONCON, 1998 apud MÍDIO e MARTINS, 2000).

O gênero *Aspergillus* possui aproximadamente 150 espécies reconhecidas, ocorrendo em ampla variedade de habitat e encontra-se em maior abundância nas regiões de clima tropical e subtropical (PITT; HOCKING, 1997; SAMSON et al., 2001). Muitas espécies são capazes de crescer e produzir metabólitos em baixas atividades de água e elevadas temperaturas (MOSS, 1991).

O gênero *Penicillium* possui o maior número de espécies, sendo encontrado em quase todos os substratos e considerado ubíquo e saprófito oportunista. A maioria das espécies é de solo e ocorre acidentalmente em alimentos, algumas são patogênicas para frutos e cereais e podem crescer em baixos teores de oxigênio e atividade de água em torno de 0,80. (PITT; HOCKING, 1999, SAMSON et al., 2001).

A característica que define o gênero *Fusarium* é a produção de conídio crescente, fusiforme, afilado e septado, chamados de macroconídeos e com base celular afilada. Algumas espécies de *Fusarium* produzem também pequenas células microconídias de várias formas sendo um instrumento importante na identificação das espécies. São comumente isolados em cereais e são os principais causadores de deterioração em frutos e vegetais (PITT; HOCKING, 1999, SAMSON et al, 2001).

A legislação brasileira não estabelece limites para contagem de fungos em ração (BRASIL, 1991), entretanto, fungos filamentosos e leveduras são degradadores e podem produzir micotoxinas em alimentos (ICMSF, 1996), portanto, é necessário estabelecer padrão para contagens fúngicas, para que as rações favoreçam a produção de animais saudáveis. Ressalta-se que a presença de fungos em alimentos e rações não implica na

ocorrência de micotoxinas e que na ausência fúngica pode ocorrer micotoxinas produzidas previamente por fungos inativados, durante o processamento da ração (HUSSEIN E BRASEL, 2001).

SMITH; MOSS (1985) apud MARTINS; MARTINS (2001) indicam que rações de boa qualidade microbiológica e seus ingredientes devem ter no máximo $5,0 \log_{10}$ ufc/g de fungos, e rações com valores superiores a $7,0 \log_{10}$ ufc/g conferem odor de mofo, e podem conter substâncias zootóxicas.

Deste modo o objetivo deste trabalho foi pesquisar a micobiota fúngica na ração comercial para peixes e nos seus ingredientes utilizados.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram adquiridas em uma fábrica de ração da cidade de Teresina, Piauí ($5 5'20''S$, $42^{\circ}48'7''W$). Esta fábrica foi escolhida após pesquisa dentre as demais localizadas na cidade, por ser a única que processava ração para piscicultura, objeto desta pesquisa. Foram coletadas e avaliadas as condições das rações para peixes e dos ingredientes utilizados para sua fabricação, quanto à micobiota fúngica.

A contagem, isolamento e identificação da micobiota fúngica foi desenvolvida no Núcleo de Estudos, Pesquisas e Processamento de Alimentos (NUEPPA) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí e no Núcleo de Pesquisas Micológicas e Micotoxicológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

As amostras foram coletadas em sacos plásticos individuais e para tal seguiu-se o fluxo de processamento normal da fábrica. As amostras de ingrediente e de ração foram

coletadas em quantidades aproximadas de 1,0 kg. Após a coleta as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos do NUEPPA. Para contagem de fungos e leveduras nas rações e seus ingredientes, foi utilizada a metodologia decimal seriada (10^{-1} a 10^{-3}) recomendada por PITT; HOCKING (1999).

Foram pesadas assepticamente 25g das amostras diretamente nos frascos contendo 225,0 mL de água peptonada tamponada estéril a 0,1% para a obtenção da diluição 10^{-1} . Em seguida foram preparadas diluições decimais até 10^{-3} . De cada diluição, transferiram-se alíquotas de 0,1 mL para placas de Petri contendo o Agar Dichloran Rose Bengal Cloranfenicol (DRBC), já solidificado. As placas foram incubadas em estufa a 25,0° C por cinco a sete dias. Após este período, foi realizada a contagem e foram selecionadas as placas que apresentaram entre 10 a 100 unidades formadoras de colônias por grama (ufc/g), de acordo com DALCERO et al., (1997).

As colônias fúngicas pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram identificadas utilizando as chaves de identificação descritas por KLICH; PITT (2002), baseadas na semeadura os meios básicos: Czapek yeast extract agar (CYA); malt extract agar (MEA); Czapek yeast extract agar 20% sucrose (CY20S) para *Aspergillus* e CYA, MEA e Agar 25% Glicerol Nitrate (G25N) para *Penicillium*.

Das cepas isoladas, foi preparada uma suspensão de conídios em 0,5 mL de meio constituído de 0,2% de agar-agar e 0,05% de Tween 80TM, distribuído em tubos de hemólise e previamente esterilizados a 121,0 °C por 15 minutos (PITT; HOCKING, 1999). A seguir, foi introduzida a agulha de platina na suspensão de conídios que foram transferidos para três pontos equidistantes nas placas contendo os meios CYA, MEA, CY20S e G25N. Estas placas foram incubadas por sete dias a 5,0 °C (CYA), 25,0 °C (CYA, MEA, CY20S e G25N) e 37,0 °C (CYA).

Para identificação da espécie das colônias de *Fusarium* spp seguiu-se a chave recomendada por NELSON et al. (1983). As colônias isoladas foram semeadas para cultivo monospóric nos meios agar folhas de bananeira (BLA), modificando a metodologia original recomendada por KELLER et. al (2009) que utiliza o meio agar folhas de cravo (CLA) e no meio agar batata dextrose (PDA), em tubo inclinado. As colônias foram incubadas por sete dias a 25°C, obedecendo fotoperíodo de 12 horas de luz branca e 12 horas de luz negra. O cultivo monospóric consiste em recolher pequena quantidade de micélio da colônia subcultivada e agitá-lo em tubo com cerca de 10 mL de água a 2,0 % e homogeneizado em movimentos em forma de “oito” sobre a bancada. O sobrenadante é descartado e a placa é incubada a temperatura ambiente inclinada em ângulo aproximado de 45,0 °C. Após período aproximado de 12 horas, as placas são examinadas através de lupa em busca de conídios germinados isolados. Um único conídio por vez é então recortado e transferido para os meios indicados.

Após a incubação, realizou-se à identificação das espécies, por meio das estruturas micromorfológicas e das características macroscópicas das colônias (diâmetro, textura, forma, aspecto da superfície e do reverso, pigmentação dos conídios e pigmento solúvel, produção e cor de exsudato).

Os resultados das contagens foram transformados em \log_{10} , correlacionados e submetidos à análise de variância e aplicação do teste de Student-Newman-Keuls (SNK) para comparação das médias utilizando o Pacote Estatístico SIGMA STAT (1994).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados referentes às contagens de fungos filamentosos e leveduras em ração para peixe e seus ingredientes estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 Médias das contagens de fungos filamentosos e leveduras (ufc/g em \log_{10}) em rações para peixes e seus ingredientes coletadas

Coletas	Amostras						
	Farel o de Soja	Farel o de Milho	Farinh a de peixe	Farinh a de carne	Farelo de Trigo	Refinazi l	Ração
1	4,75	5,39	4,54	-	-	-	4,33
2	4,67	5,07	-	4,31	-	-	4,78
3	4,63	5,05	3,85	-	-	-	3,65
4	3,97	4,33	-	-	-	0,0	4,59
5	4,65	5,01	-	4,32	-	-	5,01
6	4,40	4,19	-	-	4,40	-	3,94
Média	4,51 ^a	4,84 ^a	-	-	-	-	4,38 ^a
Desvio padrão	0,29	0,47					0,52

^a= letras iguais representam resultados semelhantes na mesma linha ($p > 0,05\%$); - = amostra não disponível no dia da coleta; ufc/g em \log_{10} = unidades formadoras de colônias por grama em números logarítmicos de base 10.

As contagens fúngicas do farelo de soja, do farelo de milho e da ração para peixes foram semelhantes em todas as coletas (Tabela 1). A maioria das amostras de farelo de milho apresentou valores superiores a 5,0 ufc/g em \log_{10} (Tabelas 1),

indicando qualidade microbiológica indesejável conforme a recomendação de SMITH; MOSS (1985) apud MARTINS; MARTINS (2001). Contudo, a ração formulada apresentou valor médio de 4,38 ufc/g em \log_{10} estando de acordo com o estabelecido para consumo. A legislação vigente (BRASIL, 1991) não contempla parâmetros para fungos em ração.

O tratamento térmico utilizado no processamento da fábrica atingia aproximadamente 95 a 110,0 C° no condicionador e 95 a 130,0 C° no secador (dados fornecidos pelo fabricante). Apesar das temperaturas elevadas utilizadas durante o processamento, as contagens fúngicas encontradas na ração foram semelhantes as dos ingredientes (Tabela 1), não sendo eficiente para reduzir em valores seguros para estocagem por tempo prolongado.

Foram isoladas 116 cepas de oito gêneros de fungos filamentosos e também cepas da ordem Mucorales (Tabela 2). Os fungos prevalentes nos ingredientes e nas rações utilizados para piscicultura pertenciam aos gêneros *Penicillium* (50,9%) e *Aspergillus* e seus teleomorfos (29,3 %). Estes gêneros englobam a grande maioria das espécies citadas na literatura como produtoras de micotoxinas. Embora não sejam descritos como micotoxígenos, os demais gêneros também têm importância para a qualidade da ração pela ação potencial que têm para decompor os nutrientes, diminuindo, portanto, o seu valor nutricional e representando um prejuízo econômico de grande relevância.

Tabela 2 Gêneros de fungos isolados de ingredientes e de rações utilizadas na

piscicultura

Gênero Fúngico	Número de Isolados	Ocorrência (%)
<i>Penicillium spp</i>	59 ^a	50,9
<i>Aspergillus spp</i> e teleomorfos	34 ^b	29,3
<i>Fusarium spp</i>	01 ^d	0,9
<i>Cladosporium spp</i>	07 ^c	6,0
<i>Paecilomyces spp</i>	02 ^d	1,7
<i>Acremonium spp</i>	01 ^d	0,9
<i>Byssochlamys spp</i>	01 ^d	0,9
<i>Geotrichum spp</i>	01 ^d	0,9
Mucorales	10 ^c	8,6
Total	116	100,0

$\chi^2 = 287,9$ ($P < 0,0001$); ^{abcd} = letras diferentes representam resultados diferentes na mesma coluna.

Foram identificadas 59 cepas de *Penicillium*, dentre estas, a maior prevalência foi de *P. citrinum*, com 42 (71,2 %) isolamentos em todos os ingredientes, exceto o Refinazil e também na ração (Tabela 3).

Tabela 3 Número de espécies fúngicas isoladas de ingredientes e rações utilizadas em

piscicultura

Espécie Fúngica	Farelo							Total
	Farelo de soja	Farelo de milho	Farinha de peixe	Farinha de carne	Farelo de trigo	Refinazil	Ração	
<i>A. flavus</i>	8	6	1	1	2	0	3	21
<i>A. parasiticus</i>	1	3	0	0	1	0	0	5
<i>A. versicolor</i>	1	1	0	0	0	0	0	2
<i>A. fumigatus</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>A. terreus</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>A. carbonarius</i>	1	0	1	0	0	0	0	2
<i>Agregado niger*</i>	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>P. citrinum</i>	9	7	1	4	5	0	16	42
<i>P. purpurogenum</i>	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>P. pinophyllum</i>	0	7	0	0	0	0	0	7
<i>P. funiculosum</i>	1	4	0	0	0	0	0	5
<i>P. corylophilum</i>	0	0	0	0	1	0	0	1
<i>P. miczynskii</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>P. implicatum</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>P. variable</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>F. verticillioides</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
Total	24	33	3	5	9	0	20	94

* *Aspergillus niger*; *A. awamori*

Na ração, os fungos isolados foram *P. citrinum*, *Aspergillus flavus* e *P. purpurogenum*, com os seguintes valores 16 (80,0 %), três (15,0 %) e um (5,0 %), respectivamente (Tabela 3). Os fungos encontrados na ração podem ser decorrentes da utilização de matéria-prima contaminada (Tabelas 1 e 3) ou ainda, durante sua fabricação (GIMENO, 2000). A alta incidência de *P. citrinum* observada indica a possível presença de citrinina e a ingestão de alimentos contaminados por esta micotoxina, pode causar redução no crescimento e alteração macroscópica em órgãos (PITT, 2004).

Embora tenham sido isoladas nove espécies de *Aspergillus* nos ingredientes (Tabela 3) apenas o *A. flavus* foi encontrado na ração, provavelmente pela ação do tratamento térmico utilizado durante a produção. Algumas espécies de *Aspergillus* são produtoras de alfatoxina B1, ácido ciclopiazônico e ácido 3-nitropropiónico, dentre

outras (KLICH, 2002). A aflatoxina é considerada como carcinogênica (KLICH, 2002) e pode causar alterações em peixes, tais como deposição residual no fígado e na carcaça como afirma LOPES et al. (2005).

O *Penicillium purpurogenum* também foi isolado na ração (Tabela 3), é um fungo de solo, com distribuição mundial em todos os ambientes, principalmente ambientes úmidos, se caracteriza como um fungo não produtor de micotoxinas (PITT, 2004). Contudo sua importância deve-se a capacidade deteriorante.

SANTOS (2006) ao pesquisar fungos em rações utilizadas para carcinicultura piauiense evidenciou os seguintes gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Absidia*, *Cladosporium*, *Rhizopus* e *Mucor*. KELLER et al. (2009) avaliaram rações para eqüinos e constataram uma prevalência de 36% de *A. flavus*, sugerindo que seja realizado um monitoramento micotoxicológico rotineiro das rações. PEREIRA (2003) ao analisar rações utilizadas para vacas leiteiras evidenciou 31 cepas de *A. flavus* das quais 38,71% eram produtoras de aflatoxina B₁ e de aflatoxina B₂. A presença de *Aspergillus flavus* e de outras espécies produtoras de micotoxinas em rações tem sido evidenciada com frequência, o que torna imprescindível os cuidados no armazenamento da ração e dos ingredientes utilizados para sua formulação.

É fundamental que os fabricantes de ração façam controle sobre os índices de contaminação fúngica da matéria-prima a ser utilizada na formulação, pois os ingredientes possuem níveis elevados, o tratamento térmico pode ser insuficiente para eliminar completamente a microbiota da ração. Além destes fatores, os fungos podem desenvolver-se nos ingredientes e produzir micotoxinas que são termoestáveis, portanto permanecem na ração podendo causar problemas carenciais crônicos ou agudos, ocasionando enfermidades, que em casos extremos levam a morte dos animais.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A piscicultura no Estado do Piauí tem tido um aumento crescente e o interesse dos consumidores por peixes, tende a valorizar esta atividade, possibilitando a geração de emprego e renda.

A pesquisa de fungos toxígenos em rações assume um papel importante, já que os alimentos fornecidos aos peixes são susceptíveis a contaminação por fungos e suas micotoxinas, podem acarretar perdas econômicas consideráveis na criação de peixes, interferindo no crescimento, desenvolvimento e reprodução desses animais.

Os resultados apresentados neste estudo vêm acrescentar informações importantes para o desenvolvimento da piscicultura no Piauí e no mundo, portanto algumas sugestões são recomendadas:

I Realizar um controle sobre os índices de contaminação fúngica e micotoxicológicas, periodicamente nas rações e nos ingredientes utilizados para sua formulação ;

II Os piscicultores devem adquirir rações de empresas reconhecidas e legalizadas por órgãos fiscais;

III As empresas que processam e fornecem rações para piscicultura, devem implantar no fluxograma de fabricação de rações o sistema de Boas Práticas de Fabricação e o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, bem como adquirir matéria-prima de procedência segura.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BATISTA, L. R.; FREITAS, R. F. de. Avaliação da produção de aflatoxinas por espécies do fungo *Aspergillus* associados ao café. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, Especial- (1): p. 44-49, 2000.

Brasil, Ministério da Pesca e Aquicultura - MPA. **O diagnóstico da pesca extrativa no Brasil**. Disponível em <http://200.198.202.145/seap/html/diagnostico.htm> consultado em [06/10/2009](#)

BRASIL. Leis, decretos, etc. Portaria nº108 de 04 de setembro de 1991. Aprova os métodos analíticos para controle de alimentos para uso animal: métodos físicos, químicos e microbiológicos. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, seção 1, p. 19813 de 17 de setembro de 1991.

CALVET, R.M. **Isolamento e identificação de fungos toxígenos em carcinicultura marinha**. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.

DALCERO, A. et al. Mycoflora and incidence of aflatoxin B1, zearalenone and deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 137, n. 3, p 179-184, 1997.

DETROY, R. W. ; LILLEHOJ, E.B. ; CIEGLER, A. Aflatoxina and related compounds. **In: - Microbial toxins**, v. 6, A. CIEGLER; S. KADS; S. J. AJL, New York, Academic press, p. 3-178, 1971.

DUARTE, M. **Aquicultura no Brasil**. Disponível em: <http://www.infoescola.com/zootecnia/aquicultura-no-brasil/> consultado em 20/11/2009.

FAO. Food consumption quantity (kg/capita/yr). (Kg) Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/610/DesktopDefault.aspx?PageID=610#ancor>> consultado em 06/10/2009

FREITAS, M. V. M. **Iniciada a V Semana do Peixe**. Governo do Estado do Piauí 01/09/08. Disponível em <<http://www.piaui.pi.gov.br/materia.php?id=31679&pes=piscicultura>> acesso em 18/10/2009

GIMENO, A. **Revision genérica del problema de los hongos y de las micotoxinas en al alimentacion animal**. Disponível em: <http://www.micotoxinas.com.br/boletim4.htm>.> Acesso em 02/04/2000.

HUSSEIN, H. H. ; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of micotoxins on humans and animals. **Toxicology**, Clare, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

ICMSF. INTERNACIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microrganismos de los alimentos**: características de los patógenos microbiano. Zaragoza: Acribia, 1996. p. 403-428.

KELLER, K. M. et al. Isolamento e identificação de fungos toxígenos isolados de amostras de rações destinadas à alimentação de equinos no estado do Rio de Janeiro. **Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Vida**. Seropédica, RJ, EDUR, v. 25, n. 1, Jan.-Jun., p.93-96, 2009.

KLICH, M. A. **Identification of common *Aspergillus* species**. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002. 116p.

KLICH, M.A.; PITT, J.I. *A laboratory guide to the common Aspergillus species and their teleomorphs*. **CSIRO** - Division of Food Processing, Australia, 2002, 116p.

LOPES, P. R. S. et al . Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 40, n.0, Oct.2005 Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2005001000012&lng=en&nrm=iso>. access on 17 Oct. 2009. doi: 10.1590/S0100-204X2005001000012.

MARTINS, H. M. ; MARTINS, M. L. Qualidade micológica de rações para bovinos (Portugal: 1996-1999). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 37, n. 538, p. 85-88, 2001.

MENEGAZZO, V. **Piauiense como pouco peixe**: No Piauí o consumo de pescado é de somente 2,5kg por ano. *Jornal Meio Norte eletrônico* 28/08/2008. Disponível em <<http://www.meionorte.com/noticias, piauiense-como-pouco-peixe,56370.html>> acesso em 06/10/2009)

MÍDIO, A. F. ; MARTINS, D. I. **Toxicologia de alimentos**. São Paulo: Varela, 2000. p.295.

MOSS, M.O. Mycology of cereal grain and cereal products. In: CHELKOWSKI, J. (Ed.). **Cereal Grain, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying an Storage**. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 23-51.

NELSON, P. E. BURGESS, L. W. ; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F.O. **Fusarium species an illustrated manual for identification**. Pennsylvania: The Pennsylvania Satate University Press. 1983, 193 p.

PEREIRA, M. M. G et al. Aflotoxinas em alimentos destinados a bovinos e em amostras de leite da região de Lavras, Minas Gerais, Brasil. **Ciência e agrotecnologia**,

Lavras, v. 29, n. 1, p. 106-112, jan./fev. 2005.

PEREIRA, M. M. G. **Pesquisa de fungos produtores de micotoxinas e aflatoxinas em alimento animal e aflatoxina M₁ em leite.** 2003. 172 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, MG, 2003.

PITT, J. I. **Guía de laboratorio para la identificación de especies comunes de *Penicillium*.** Madrid: s.n.e. (ISBN 0 643 04837 5), 2004. 199 p.

PITT, J. I.; HOCKING, A. D. **Fungi and spoilage.** 2 ed. London: Blackie academic and Professional, 1999. 593p.

ROSA, C. A. R. **Micobiota toxígena e ochratoxinas em rações destinadas à alimentação de aves, bovinos, suínos e importância em saúde animal.** Seropédica, Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2002. Tese de Doutorado. (Ciências Veterinárias). 147p.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal.** Belo Horizonte. Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p

SAMSON, A. R. et al. **Introduction to food-and airborne fungi.** Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, Netherlands: Utrecht, 2001. p.389p.

SANTOS, F. C. F. **Pesquisa de fungos micotoxígenos em rações e de micotoxina em camarões cultivados no litoral do Piauí.** 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2006.

TRABULSI, L. R. Et al. **Microbiologia médica.** São Paulo: Atheneu. 2002. p. 586.