

Dorit Elisabeth Schuller

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA
SELECTIVO/DIFERENCIAL PARA A LEVEDURA
DE CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR
*ZYGOSACCHAROMYCES BAILII***



UNIVERSIDADE DO MINHO
Departamento de Biologia
1998

DECLARAÇÃO

É autorizada a reprodução integral desta tese, apenas para efeitos de investigação.

Dorit Elisabeth Schuller

Dorit Elisabeth Schuller

**DESENVOLVIMENTO DE UM MEIO DE CULTURA
SELECTIVO/DIFERENCIAL PARA A LEVEDURA
DE CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR
*ZYGOSACCHAROMYCES BAILII***

Dissertação apresentada à Universidade do Minho,
para a obtenção do grau de Mestre, no âmbito do
Curso de Mestrado em Ciências do Ambiente
(Especialização em Qualidade Ambiental)



UNIVERSIDADE DO MINHO

Departamento de Biologia

1998

O presente trabalho foi desenvolvido no Departamento de Biologia da Universidade do Minho, no âmbito do projecto europeu "Spoilage Yeasts in Foods and Beverages - Characterization and Ecology for Improved Diagnosis and Control" (AIR Project CT 93/830). Gostaria de, neste momento, expressar o meu reconhecimento a todos aqueles que, de forma directa ou indirecta, contribuíram para a sua realização.

À Professora Doutora Cecília Leão a minha gratidão pela orientação e facilidades concedidas no desenvolvimento do trabalho. Agradeço também a amizade que sempre me dedicou e todo o apoio que me dispensou quanto à minha integração profissional em Portugal.

À Professora Doutora Manuela Côrte-Real um agradecimento pela orientação, os conhecimentos que me transmitiu e as sugestões sempre oportunas, formuladas durante a realização e revisão deste trabalho.

Aos meus colegas de trabalho e a todos os elementos do Departamento de Biologia da Universidade do Minho, agradeço o interesse e apoio que sempre me dedicaram. Em particular, à Margarida Casal e Helena Cardoso pela forma amiga como me acompanharam ao longo deste tempo, e também pela ajuda que me dispensaram no sentido de aperfeiçoar o meu Português.

À Steffi e Jürgen Althoff, Sr. Oliveira e D. Madalena pelo carinho com que me rodearam e pela amizade que sempre demonstraram.

Em especial, gostaria de agradecer à minha família, todo o apoio que sempre me dedicaram, embora de longe, mas que muito contribuiu para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

		página
	RESUMO	<i>vii</i>
	ABSTRACT	<i>ix</i>
	ENQUADRAMENTO E PLANO GERAL DA TESE	1
	1 INTRODUÇÃO GERAL	4
1.1	Leveduras e alimentos	4
1.2	As leveduras como contaminantes na indústria alimentar - o caso particular de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	8
1.2.1	Características fisiológicas mais relevantes	10
1.2.2	Alimentos descritos como mais susceptíveis de contaminação e/ou deterioração por <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	14
1.3	Meios de cultura utilizados na detecção e enumeração de leveduras	20
1.3.1	Meios de cultura gerais	20
1.3.2	Meios de cultura selectivos e/ou diferenciais	24
1.3.3	Meios de cultura utilizados para a detecção e enumeração de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	26
1.3.4	Controlo de qualidade de meios de cultura - conceitos gerais	28
1.4	Identificação e caracterização de leveduras	30
1.4.1	Métodos simplificados e miniaturizados	31
1.4.2	Análise de constituintes celulares	32

1.5	Procedimentos experimentais e Normas Portuguesas para a pesquisa de leveduras em alimentos	34
1.5.1	Procedimentos experimentais	34
1.5.2	Normas Portuguesas	36
1.6	Qualidade microbiológica de alimentos	38
1.6.1	O conceito HACCP	38
1.6.2	Cr�terios de aprecia�o da qualidade microbiol�gica	40
1.6.3	Caracter�sticas microbiol�gicas	42

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1	Microrganismos	45
2.2	Meios de cultura	47
2.2.1	Meios de cultura gerais	47
2.2.2	Meios de cultura selectivos	49
2.3	Prepara�o de suspens�es de c�lulas	55
2.4	Condi�es de inocula�o e de crescimento	55
2.5	Condi�es de incuba�o	57
2.6	Registo de resultados	57
2.7	Tratamento estat�stico dos resultados	58

	3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1	Formulação de um possível meio de cultura com substratos simples ou misto selectivo/diferencial para <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	59
3.1.1	Introdução	59
3.1.2	Meios de cultura com um açúcar e ácido acético	61
3.1.3	Meios de cultura com glucose e um ácido mono- ou dicarboxílico	62
3.1.4	Meios simples com um ácido carboxílico	65
3.2	Formulação e optimização de um meio de cultura misto com glucose e ácido fórmico como diferencial para <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	66
3.2.1	Meio mineral com glucose e ácido fórmico, pH4,0	66
3.2.2	Meio mineral com glucose e ácido fórmico, pH4,5	76
3.3	Validação do meio de cultura com glucose e ácido fórmico como diferencial para <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	94
3.3.1	Seleção do meio de referência mais adequado ao cálculo da percentagem de recuperação de <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	95
3.3.2	Reformulação do meio de cultura contendo glucose e ácido fórmico para efeitos de validação	96
3.3.3	Ensaio de validação do meio desenvolvido em comparação com outros descritos na literatura para <i>Zygosaccharomyces bailii</i>	100
3.4	O caso concreto da aplicação do meio de cultura desenvolvido a amostras de vinho contaminado	114
	4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	118
	5 BIBLIOGRAFIA	121

RESUMO

Zygosaccharomyces bailii é uma levedura frequentemente associada a problemas de contaminação alimentar dada a sua capacidade de sobreviver em ambientes ácidos na presença de ácidos orgânicos fracos normalmente utilizados como conservantes químicos na indústria alimentar. Com vista a desenvolver um meio diferencial para *Z. bailii* recorreu-se a uma colecção de leveduras isoladas preferencialmente de vinhos contaminados. Assim, as estirpes seleccionadas para este estudo diferiram na sua origem e resistência a preservativos ácidos e pertenceram às espécies de *Pichia membranaefaciens*, *Pichia anomala*, *Torulaspota delbrueckii*, *Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Issatchenkia orientalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kloeckera apiculata*, *Lodderomyces elongisporus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces bayanus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces florentinus* e *Zygosaccharomyces bailii*.

O desenho do meio de cultura baseou-se na diferente capacidade de crescimento, que as diferentes espécies de levedura apresentam em meio mineral com substrato simples (ácido carboxílico fraco) ou com substratos misto (açúcar e ácido carboxílico fraco) como únicas fontes de carbono e energia. Quando os ensaios foram conduzidos num meio líquido com substrato simples, a maior parte das estirpes apresentou capacidade de utilizar pelo menos um dos vários ácidos carboxílicos testados. A natureza do ácido e a sua concentração bem como a manipulação do pH do meio, associada à incorporação de um indicador ácido-base, permitiu seleccionar condições em que somente as estirpes de *Z. bailii* originavam variação de cor do meio (resposta positiva). Contudo, esta resposta só foi observada após 115 a 168 h. Quando se utilizou o meio com substratos misto (glucose 0,1 %, p/v e ácido fórmico 0,3 %, v/v),

em todas as estirpes de *Z. bailii* observou-se resposta positiva após um período de tempo consideravelmente mais reduzido (cerca de 48 h) quando comparado com o meio com substrato simples para a mesma densidade de inóculo e para as mesmas condições de incubação.

Utilizando quer microplacas, quer meio sólido, procedeu-se de seguida à avaliação do comportamento deste meio com substratos misto para as outras espécies da colecção. Em ambos os casos somente as espécies de *Z. bailii* apresentaram resposta positiva durante as primeiras 48 h de incubação. No entanto a estirpe IGC 4194 de *Z. rouxii* apresentou uma resposta falso-positiva.

O aumento da concentração do ácido fórmico no meio com substratos misto a pH 4,5 (glucose 0,1 %, p/v e ácido fórmico 0,4 ou 0,5 %, v/v) traduziu-se de uma forma geral num aumento do tempo de resposta para algumas estirpes. Nestes ensaios incluíram-se também estirpes de *Z. bisporus*, algumas das quais evidenciaram uma resposta positiva. Considera-se assim os meios desenvolvidos como diferenciais/selectivos para estas duas espécies.

A validação do meio com substratos misto revelou a sua equivalência a outros meios de cultura, já descritos na literatura, no que respeita à percentagem de recuperação de *Z. bailii*. No entanto, a vantagem da utilização do meio de cultura desenvolvido no presente trabalho, em contraste com os restantes meios, consiste na capacidade de diferenciação de *Z. bailii* de outras leveduras pela cor das colónias.

A análise microbiológica de duas amostras de Vinho Verde contaminado permitiu concluir, que o meio com substratos misto apresentou-se como um meio diferencial adequado para distinguir *Z. bailii* de outras leveduras de contaminação, com aplicação prática no controlo microbiológico de vinho e potencialmente de outras bebidas e alimentos

ABSTRACT

Zygosaccharomyces bailii is a frequent food and beverage spoilage yeast, which is able to survive in acidic environments, in the presence of weak organic acids used as chemical preservatives. A collection of yeasts, isolated mostly from spoiled wines, was used in order to develop a differential medium for *Z. bailii*. The selected strains differed in their origin and resistance to acid preservatives, belonging to the species *Pichia membranaefaciens*, *Pichia anomala*, *Torulasporea delbrueckii*, *Dekkera anomala*, *Dekkera bruxellensis*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces ludwigii*, *Issatchenkia orientalis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kloeckera apiculata*, *Lodderomyces elongisporus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces bayanus*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Zygosaccharomyces bisporus*, *Zygosaccharomyces florentinus* and *Zygosaccharomyces bailii*.

The design of the culture media was based on the different ability of the various yeast species to grow in a mineral medium containing a single substrate (weak carboxylic acid) or mixed substrate (a sugar plus a weak carboxylic acid) as the only carbon and energy sources. When the assays were carried out in liquid medium with single substrate, most of the strains displayed ability to utilize at least one of the several weak carboxylic acids tested. The nature of the acid and its concentration as well as the manipulation of the pH of the medium, associated to the incorporation of an acid-base indicator, allowed to select conditions where only *Z. bailii* strains gave rise to change in colour of the medium (positive response). However, these positive responses were only obtained after about 115 to 168 h. When the mixed substrate medium (glucose, 0,1%, p/v and formic acid 0,3 %, v/v) was used, all the *Z. bailii* strains gave positive response after a considerably lower time (about 48 h) when compared with the single substrate medium for the same inoculum density and incubation conditions.

Following these results, the mixed substrate medium was tested for the other species of the yeast collection, using either microplate wells or solid medium. In both cases, only the *Z. bailii* strains gave positive response during the first 48 h of incubation, and only one false positive response has been observed (*Z. rouxii* IGC 4194).

The increase of the formic acid concentration in the mixed substrate medium at pH 4,5 (glucose, 0,1%, p/v and formic acid 0,4 or 0,5 % v/v, respectively) was associated to a prolonged response time, displayed by several *Z. bailii* strains. In these assays we included also strains of *Z. bisporus*, some of them exhibiting a positive response. Thus, the developed medium can be considered as differential/selective for both species.

The validation of the culture medium developed in the present work revealed its equivalence to other culture media previously described, concerning the percentage of recovery of *Z. bailii*. However, the major advantage of the developed medium, in contrast to other culture media, is its capability to differentiate *Z. bailii* from other yeasts by the color of the colonies.

The microbiological analysis of two samples of contaminated "Vinho Verde" ("Green Wine") allowed to conclude, that the mixed substrate medium can be considered as a differential medium to distinguish *Z. bailii* from other contamination yeasts, with potential application in the microbiological control of wines and probably other beverages and foods.

Enquadramento e Plano Geral da Tese

A detecção de microrganismos ao longo do processo de fabrico de alimentos é uma área da microbiologia alimentar que tem merecido particular atenção, dada as possíveis repercussões a nível da preservação de alimentos e de saúde pública. Neste sentido, a implementação de programas que englobam a avaliação de riscos de contaminações e a detecção de pontos críticos (HACCP, "Hazard Analysis Critical Control Point") em linhas de produção contribuiu para uma melhoria significativa da qualidade microbiológica dos alimentos.

A deterioração de alimentos por microrganismos não patogénicos, como por exemplo fungos e leveduras, foi sempre considerado como um "inconveniente" desagradável. Devido ao considerável aumento da produção de alimentos e bebidas nas últimas décadas, a sua deterioração tornou-se num problema económico de grande preocupação para a indústria alimentar. Esta é actualmente confrontada com um consumidor cada vez mais exigente, preferindo produtos frescos, com melhores qualidades organolépticas, menos conservantes, sal ou açúcar. Este facto tem também contribuído para uma maior preocupação por parte da indústria alimentar dado os maiores riscos de degradação dos alimentos por acção de microrganismos.

Actualmente, a indústria alimentar necessita de técnicas de análise microbiológica que permitam o isolamento de contaminantes, bem como a sua identificação com rapidez e segurança. Deste modo, o desenho de meios diferenciais/selectivos para a detecção de leveduras resistentes a conservantes químicos é uma preocupação actual no controlo da qualidade de alimentos e bebidas.

A levedura *Zygosaccharomyces bailii* figura entre as mais perigosas em tecnologia alimentar, dada a sua aptidão para sobreviver em ambientes extremos,

nomeadamente em meios ácidos com etanol. Esta espécie é ainda reconhecida como resistente à maioria dos conservantes químicos geralmente utilizados na indústria alimentar. Em particular na indústria do vinho esta levedura é responsável por perdas económicas importantes devido à sua capacidade de refermentação de vinhos doces e de crescimento e formação de sedimentos em vinhos secos.

O trabalho experimental que constitui o tema desta tese teve como objectivo o desenvolvimento de um meio selectivo/diferencial para a detecção da levedura de contaminação alimentar *Z. bailii*.

De acordo com o referido anteriormente, começamos por apresentar no primeiro capítulo uma breve revisão bibliográfica sobre os aspectos mais importantes interligados com a deterioração de alimentos e bebidas por leveduras, incluindo a descrição de (i) meios de cultura actualmente utilizados para a detecção e a enumeração de leveduras, (ii) metodologias recentemente desenvolvidas para a identificação de leveduras (por exemplo métodos moleculares), (iii) metodologias mais frequentemente utilizadas na pesquisa de leveduras em alimentos, (iv) informação sobre legislação actualmente em vigor, que determina os teores de leveduras permissíveis nestes produtos. Deu-se ênfase ao caso particular da levedura *Z. bailii* tendo-se referido meios de cultura, já desenvolvidos ou otimizados por outros autores, para a detecção desta espécie.

No segundo capítulo procedeu-se à descrição dos materiais biológicos e das metodologias utilizadas, para a realização do trabalho experimental. A colecção de leveduras utilizada incluiu espécies preferencialmente isoladas de vinhos contaminados.

O terceiro capítulo inclui a apresentação e discussão dos resultados obtidos. A estratégia utilizada baseou-se na diferente capacidade de crescimento, que várias espécies de levedura apresentam em meio mineral com um substrato simples (ácido carboxílico fraco) ou com substratos mistos (ácido carboxílico fraco e açúcar) como única(s) fonte(s) de carbono e energia. Procurou-se ainda visualizar padrões distintos de utilização por diferentes espécies de leveduras pela incorporação de um indicador ácido-base no meio de cultura. Assim, a utilização de um ácido traduzir-se-ia numa alcalinização mais rápida do meio de cultura (resposta positiva).

Nesta perspectiva, o trabalho iniciou-se com o teste de meios de cultura contendo diferentes combinações de um açúcar e um ácido mono- ou dicarboxílico a vários valores de pH (4,0, 5,5 e 6,0).

Numa segunda fase, o meio de cultura seleccionado foi testado com uma bateria de leveduras mais alargada (67 estirpes, 13 dos quais pertencentes à espécie *Z. bailii*). Dado que algumas estirpes de *Z. bailii* exibiram respostas falso negativas e outras, não pertencentes a esta espécie, exibiram respostas falso positivas houve necessidade de ajustar a composição/pH do meio de modo a diminuir tais respostas.

O comportamento do meio diferencial desenvolvido foi testado utilizando diferentes metodologias experimentais (inoculação de suspensões celulares em meio líquido, utilizando tubos de ensaio ou microplacas, e aplicação das referidas suspensões na superfície de meios sólidos).

Numa fase final procedeu-se à validação do meio de cultura desenvolvido. Esta parte do trabalho contemplou estudos comparativos respeitantes à recuperação de leveduras frequentemente associadas à contaminação de vinhos, no meio de cultura desenvolvido, e nos já descritos na literatura para este efeito.

Por último, avaliou-se a possível utilização do meio desenvolvido na detecção e enumeração de *Z. bailii* em duas amostras contaminadas de Vinho Verde.

Na parte final do trabalho apresentam-se considerações gerais sobre o trabalho realizado e principais resultados obtidos. São ainda mencionadas abordagens complementares que surgiram no decurso da realização do presente trabalho e que poderão ser desenvolvidas no futuro.

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Leveduras e alimentos

Na maioria dos casos, os compostos dos alimentos constituem uma fonte de carbono e/ou energia para o crescimento microbiano, permitindo a proliferação dos microrganismos presentes. Este processo provoca alterações do próprio alimento, nomeadamente a produção de maus sabores devido à degradação ou síntese de novos compostos. O alimento assim alterado considera-se como degradado ou deteriorado, frequentemente impróprio para consumo humano. Por este motivo, torna-se necessário conhecer não só a flora indígena do produto alimentar, mas também a flora contaminante específica para cada tipo de alimento ou bebida com capacidade de provocar alterações.

Muitas espécies de fungos e leveduras são conhecidas na indústria alimentar como microrganismos indesejáveis, que podem ser detectados em ingredientes utilizados no fabrico de alimentos e bebidas, na superfície de equipamentos, nos produtos finais e em locais de armazenamento. A presença destes microrganismos em tais ambientes está particularmente associada à sua versatilidade nutricional e capacidade de sobrevivência em ambientes extremos de temperatura, pH, actividade de água e outros. Segue-se uma breve revisão sobre os factores físico-químicos considerados relevantes na indústria alimentar e suas interacções com leveduras.

Cada microrganismo possui um pH mínimo e máximo de crescimento. Em geral, as leveduras toleram valores de pH mais baixos do que as bactérias. Para a grande maioria dos produtos alimentares, o pH situa-se na gama neutra ou ácida, e os alimentos que apresentam um valor de pH inferior a 4,5 são preferencialmente deteriorados por leveduras e fungos. As leveduras, em geral, conseguem iniciar o seu

crescimento na gama de pH entre 2 e 9. Durante o crescimento podem alterar o pH inicial do substrato para um valor favorável ao seu crescimento (em geral 4-6,5) (Mislivec *et al.*, 1992). A utilização de pH ácidos constitui uma prática de conservação para inibir ou eliminar o desenvolvimento de microrganismos, em particular de bactérias. Para tal recorre-se à utilização de ácidos orgânicos, como por exemplo o ácido acético, láctico, benzóico, ou cítrico, como conservantes químicos. Os produtos fermentados, nomeadamente iogurte ou chocrute, apresentam valores baixos de pH devido à formação de ácido láctico durante a fermentação, e são deste modo menos susceptíveis à deterioração por bactérias.

A quantidade de água necessária para o crescimento varia conforme o microrganismo. Na ausência de água verifica-se a redução do metabolismo microbiano e a paragem do crescimento. Somente os organismos formadores de esporos são capazes de sobreviver por períodos prolongados na ausência de água. A actividade de água (a_w) é o parâmetro físico-químico que exprime o teor de água disponível no alimento consoante a equação (Jay, 1992):

$$a_w = p/p_0$$

p pressão de vapor da água em solução
 p_0 pressão de vapor da água pura

O crescimento microbiano varia consoante o valor de a_w , conforme resumido na tabela 1.1.

Tabela 1.1 Crescimento microbiano para diferentes valores de a_w (adaptado de Pichardt, 1993).

Valores de a_w	Crescimento microbiano
1,0 - 0,98	sem inibição
0,98 - 0,90	ligeira inibição da maioria dos microrganismos
0,90 - 0,60	crescimento muito lento de um número reduzido de microrganismos
< 0,60	não observável

A diminuição do valor da a_w , num dado produto alimentar tem servido de base a diferentes processos de conservação de alimentos. Tal pode ser conseguido de diferentes formas conforme se refere seguidamente (Frazier e Westhoff, 1988):

- Adição de sal ou açúcar aos alimentos que conduz a um aumento de concentração de solutos no meio extracelular, provocando uma desidratação das células microbianas;
- Incorporação de geles ou de outros colóides hidrofílicos em alimentos que conduz igualmente a uma diminuição do teor de água disponível. Por exemplo, a adição de agar, na concentração de 3 a 4%, pode evitar o crescimento microbiano;
- Diminuição da temperatura para valores abaixo de 0°C, originando misturas de água-gelo. Quanto maior for a concentração de gelo no alimento, maior será a concentração de solutos e portanto menor o valor de a_w . O valor de a_w da água por exemplo a -5°C é de 0,91 e a -20°C é de 0,82.

Na tabela 1.2 apresentamos alguns exemplos de alimentos e os respectivos valores de a_w .

Tabela 1.2 Principais grupos de alimentos e os respectivos valores de a_w (adaptado de Frazier e Westhoff, 1988).

Valor de a_w	Alimento
1,0 - 0,98	Carne e peixe fresco Legumes e frutas frescas Leite e a maioria de bebidas
0,98 - 0,93	Pão Queijo Frutas enlatadas
0,93 - 0,85	Salsicha seca ou fermentada Presunto Queijo curado
0,85 - 0,60	Cereais Farinha Nozes Doces e geleias de fruta

< 0,60	Chocolate Mel Bolachas
--------	------------------------------

A grande maioria das bactérias necessitam para o seu crescimento de um meio com uma elevada actividade da água (0,995 - 0,998), contendo uma baixa concentração de açúcar e/ou sal, conforme resumido na tabela 1.3. Deste modo, os meios de cultura utilizados para o isolamento de bactérias não contêm mais do que 1% de açúcar e 0,85% de sal. No caso de fungos, os valores mínimos de a_w são mais baixos. As leveduras capazes de crescer em ambientes com baixos valores de a_w (< 0,85) ou elevadas concentrações de açúcares (50-60% de glucose) são designadas como xerotolerantes ou osmotolerantes, respectivamente.

Zygosaccharomyces rouxii, *Z. bailii*, e algumas estirpes de *Debaryomyces hansenii* e *Torulaspora delbrueckii* são exemplos deste tipo de leveduras (Jermine *et al.*, 1987a). As espécies mencionadas podem contribuir para a deterioração de alimentos secos e/ou doces como por exemplo mel, chocolate, polpas, leite condensado e frutos secos (Baumgart, 1993). Na tabela 1.3 apresentamos valores mínimos da actividade da água para alguns grupos de microrganismos. Abaixo destes valores não se verifica crescimento.

Tabela 1.3 Valores mínimos de a_w para os diferentes grupos de microrganismos (adaptado de Frazier e Westhoff, 1988).

Microrganismos	Valor mínimo de a_w
Maioria de bactérias	0,91
Maioria de leveduras	0,88
Maioria de fungos	0,80
Bactérias halofílicas	0,75
Fungos xerofílicos	0,65
Leveduras osmotolerantes	0,60

Os hidratos de carbono, como por exemplo açúcares presentes em alimentos, são frequentemente utilizados como fonte de carbono e energia, mas outros compostos

mais complexos como por exemplo ésteres, alcoóis, aminoácidos, péptidos ou ácidos orgânicos também podem ser metabolizados. Hidratos de carbono mais complexos, como por exemplo celulose ou amido podem ser utilizados somente por um número mais restrito de microrganismos. A grande maioria de microrganismos pode metabolizar a glucose, mas existem diferenças respeitantes à capacidade de utilização de outros açúcares como por exemplo maltose ou lactose. A metabolização de gorduras pode ser realizada por microrganismos lipolíticos e ocorre na ausência de açúcar. Os produtos alimentares com um elevado teor de proteínas, como por exemplo carnes, são degradados por microrganismos proteolíticos como *Pseudomonas aeruginosa* (Frazier e Westhoff, 1988).

Substâncias inibidoras que fazem parte do próprio alimento, ou que foram adicionadas durante o processo de fabrico, podem evitar o crescimento de toda a flora microbiana ou de certas espécies particulares. Por exemplo o etanol, formado durante a fermentação do mosto de uva, pode actuar como inibidor do crescimento de microrganismos contaminantes.

Embora a flora microbiana que se desenvolve num determinado alimento dependa significativamente dos seus parâmetros físico-químicos, existem no entanto interacções entre estes parâmetros. Um microrganismo que se encontre num ambiente correspondente ao seu pH óptimo de crescimento será menos sensível perante variações de a_w do que um microrganismo num ambiente de pH desfavorável (Frazier e Westhoff, 1988).

1.2 As leveduras como microrganismos contaminantes na indústria alimentar - o caso particular de *Zygosaccharomyces bailii*

Tradicionalmente, e também do ponto de vista económico, as leveduras são os microrganismos mais importantes explorados pelo homem. A sua utilização estende-se desde a produção do pão, vinho e outras bebidas alcoólicas, até à produção de etanol como combustível. Actualmente, as tecnologias de DNA recombinante permitiram a

construção de estirpes produtoras de proteínas fisiologicamente activas, como a insulina. Actualmente é de realçar a utilização em processos de fermentação industriais, de estirpes de leveduras manipuladas geneticamente (Hammond, 1995).

As leveduras devido à sua versatilidade nutricional podem ser encontradas em "habitats" ecológicos muito variados. A versatilidade fisiológica das leveduras bem como a sua capacidade em tolerar condições adversas ao crescimento, conforme mencionado no ponto 1.1, tornam algumas espécies "especialistas" em termos de "habitats" ecológicos, que seriam no caso presente, os alimentos. Na tabela 1.4 apresenta-se uma lista das principais espécies de leveduras e dos respectivos alimentos onde geralmente surgem como microrganismos contaminantes. As alterações provocadas são, por exemplo, a produção de sedimentos, gás, turvação, sabores desagradáveis, bem como alterações da cor ou da textura do produto alimentar ou o crescimento superficial no caso do pão (Tudor e Board, 1993).

Tabela 1.4 As principais leveduras conhecidas como contaminantes alimentares, bem como os alimentos afectados (adaptado de: Tudor e Board, 1993).

Levedura	Exemplos de alimentos afectados
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Carnes fermentadas e maturadas Sumo de laranja Leite Natas Gelado Queijo Iogurte Pão Marisco
<i>Issatchenkia orientalis</i>	Produtos com elevado teor de açúcar Fruta e legumes Leites e produtos lácteos Produtos à base de cereais Carnes
<i>Kloeckera apiculata</i>	Iogurte Figos Tomates
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Produtos com elevado teor de açúcar Fruta e legumes Leites e produtos lácteos Marisco
<i>Pichia membranaefaciens</i>	Salmouras de azeitonas Produtos preservados com ácido acético Molho de tomate Queijo Carne
<i>Rhodotorula sp.</i>	Molho de maçã tratado com calor Natas, manteiga e iogurte Pão Carnes Mariscos
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Sumos de fruta Queijo e iogurte Pão
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	Fruta e legumes

<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Xaropes
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Produtos com elevado teor de açúcar Fruta e legumes Leites e produtos lácteos Produtos a base de cereais Carnes Mariscos
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	Xaropes de fruta Concentrados de sumos de fruta Vinhos Molho de tomate Maionese
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	Agente causador de deterioração alimentar semelhante a <i>Z. bailii</i>
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	Produtos com elevado teor de açúcar
<i>Zygosaccharomyces microellipsoides</i>	Fruta e legumes
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	Xaropes Produtos com elevado teor de açúcar Sumos de fruta Maionese

1.2.1 Características fisiológicas mais relevantes

A levedura *Z. bailii* é considerada como uma levedura de deterioração que apresenta uma elevada tolerância a factores ambientais adversos associada a uma elevada capacidade fermentativa (ver por exemplo, revisão em Estevinho, 1995). Independentemente do grau de contaminação, a sua presença em alimentos e bebidas é inaceitável, e pode ser responsável por elevados prejuízos na indústria alimentar.

Dado que o presente trabalho se centra no caso particular da levedura *Zygosaccharomyces bailii* como contaminante alimentar, apresenta-se de seguida uma breve revisão bibliográfica sobre as suas principais características fisiológicas, bem como sobre a contaminação por esta espécie de alguns tipos de alimentos, nomeadamente: vinhos, produtos com elevado teor de açúcar, maioneses e molhos de saladas.

- *Resistência a conservantes químicos*

Os conservantes químicos constituem uma classe de substâncias capazes de retardar ou impedir o crescimento de microrganismos ou a manifestação de qualquer deterioração resultante da presença de microrganismos (Adams e Moss, 1995). Conforme referido anteriormente, o ácido acético, benzóico ou sórbico são os ácidos mais utilizados na conservação de alimentos e bebidas. A levedura *Z. bailii* sendo conhecida pela sua elevada resistência a ácidos carboxílicos, e em particular ao ácido sórbico e benzóico, apresenta-se como uma levedura de contaminação alimentar perigosa. Estes ácidos, na concentração de 600 ppm não inibem o crescimento desta levedura na presença de 10% (p/v) de glucose a pH 3,5 (Pitt, 1974). Num rastreio (Neves *et al.*, 1994), foi testada a capacidade de crescimento em concentrações crescentes de ácido sórbico de 100 estirpes de leveduras isoladas de bebidas e alimentos deteriorados. As estirpes que toleraram a concentração mais elevada deste ácido (800 ppm), na presença de glucose (2% p/v), a pH 3,5, pertenceram à espécie *Z. bailii*. Esta levedura possui também uma maior resistência aos ácidos acético, propiónico, butírico e benzóico comparativamente com *S. cerevisiae* (Estevinho, 1995; Malfeito-Ferreira *et al.*, 1997). A tabela 1.5 mostra exemplos de leveduras contaminantes

de bebidas, bem como a respectiva concentração mínima de ácido sórbico ou ácido benzóico necessária para eliminar o seu crescimento.

Tabela 1.5 Concentrações mínimas inibitórias para o crescimento de várias leveduras em bebidas (adaptado de Thomas, 1993).

Levedura	Ácido sórbico (mg/l)	Ácido benzóico (mg/l)
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	300-600	300-600
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	-	330
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	-	500
<i>Kloeckera apiculata</i>	150	200
<i>Hansenula anomala</i>	160	100
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	160-300	60-100
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	420	300
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	630	610
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	-	580
<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	170
<i>Rhodotorula sp.</i>	-	60

Z. bailii é uma das poucas leveduras que evidencia crescimento na presença de 1% ácido acético (Barnett *et al.*, 1990), característica que pode ser utilizada para o isolamento preliminar desta levedura. Mesmo a concentração de 2% (v/v) de ácido acético, utilizada para a preservação de molho de tomate, não é suficiente para evitar a deterioração deste alimento por *Z. bailii* (Pitt, 1974). Vários estudos têm sido realizados com o objectivo de contribuir para a elucidação de possíveis mecanismos subjacentes à resistência de *Z. bailii* a ambientes extremos. Ácidos orgânicos fracos (ácido acético, propiónico, pentanóico e sórbico) induziram efeitos inibitórios na taxa específica do crescimento de *Z. bailii* (Estevinho, 1995) e *S. cerevisiae* (Cardoso, 1994). As concentrações mínimas necessárias para induzir efeitos inibitórios foram mais elevadas para *Z. bailii* do que para *S. cerevisiae*. Os compostos mencionados, quando presentes no meio extracelular, induziram também morte celular, sendo os valores das concentrações mínimas estimuladoras de morte para *Z. bailii* superiores aos valores descritos para *S. cerevisiae*. Em várias espécies de leveduras, incluindo *S. cerevisiae*, o transporte e metabolismo de ácidos fracos estão sujeitos a repressão catabólica pela glucose (Gancedo e Serrano, 1989). Pelo contrário, a levedura *Z. bailii*, num meio contendo uma mistura de glucose e ácido acético apresenta capacidade de consumo

simultâneo do açúcar e do ácido. A respectiva curva de crescimento apresenta duas fases exponenciais distintas. Durante a primeira fase, observa-se um consumo simultâneo do açúcar e do ácido, sendo a segunda fase correspondente ao esgotamento do ácido acético (Estevinho, 1995). Na continuação destes trabalhos, foi descrito um sistema de transporte mediado, específico para o ácido acético em células de *Z. bailii* crescidas na presença de glucose ou num meio contendo uma mistura de glucose e ácido acético. O transportador está sujeito a um mecanismo de regulação, sendo a sua actividade reduzida quando a concentração de ácido acético no meio extracelular for elevada. A enzima acetil-CoA sintetase, em células crescidas na presença de ácido acético e glucose, não está sujeita à repressão pela glucose, e assim o ácido pode ser utilizado como uma fonte adicional de energia e/ou carbono (Rodrigues, 1998). Estes resultados indicam que a regulação tanto do transporte membranar, como também da actividade da enzima acetil-CoA sintetase, são factores cruciais que contribuem para a elevada resistência de *Z. bailii* em meios contendo misturas de ácido acético e glucose, como se verifica no caso da fermentação de mostos (Sousa *et al.*, 1996 e 1998).

A maior sensibilidade de *S. cerevisiae* ao ácido acético está aparentemente associada à ausência de um transportador operacional para o acetato em células crescidas em glucose e a uma maior permeabilidade da membrana plasmática ao ácido na forma não dissociada comparativamente com *Z. bailii*. A valores de pH extracelular inferiores ao pH intracelular, o ácido no interior de célula dissocia-se, contribuindo assim para a acidificação do citosol, com possíveis efeitos tóxicos ao nível celular. Estes factores associados à incapacidade de *S. cerevisiae* de metabolizar o ácido acético podem contribuir para a sua reduzida tolerância a ambientes ácidos (Casal *et al.*, 1996 e 1998).

Z. bisporus, e algumas espécies de *Debaryomyces* e *Pichia* apresentam igualmente uma elevada resistência ao ácido acético (Kunkee e Bisson, 1993).

A sensibilidade de leveduras a ácidos fracos utilizados na conservação de alimentos depende também de outros factores como por exemplo da temperatura, pH e presença de elevadas concentrações de açúcar (30 a 50% p/v) no meio extracelular. Estes factores combinados podem actuar de um modo sinérgico ou antagónico na inibição do crescimento destes microrganismos (Beuchat, 1982 e 1993 b; Golden e Beuchat, 1992; Restaino *et al.*, 1985).

O dióxido de enxofre é outro composto antimicrobiano utilizado na produção de vinhos. Para valores de pH inferiores a 1,8 predomina a forma molecular (SO_2), que constitui a forma com maior actividade antimicrobiana. As formas iónicas encontram-se para valores de pH intermédios (HSO_3^-) e a partir do pH 7,2 predomina a forma SO_3^{2-} . A levedura *Z. bailii* apresenta maior resistência ao dióxido de enxofre do que *S. cerevisiae* (Malfeito-Ferreira *et al.*, 1990). Estirpes de *Z. bailii*, *S. cerevisiae*, *Brettanomyces* sp. e *Saccharomyces ludwigii* toleram concentrações de SO_2 várias vezes superiores aos permitidos pela legislação. Nas concentrações utilizadas em vinhos, o SO_2 actua apenas como agente microbiostático, inibindo as leveduras formadoras de véu, tais como *Pichia membranaefaciens*, *Candida* sp. e *Kloeckera apiculata* (Thomas, 1993).

- *Tolerância ao etanol*

Z. bailii a par com *S. cerevisiae* e *S. ludwigii* foram as espécies que, quando comparadas com *Schizosaccharomyces pombe*, *Brettanomyces lambicus* e *Kluyveromyces thermotolerans*, revelaram capacidade de crescimento em meios acidificados com ácidos mono- ou dicarboxílicos na presença de 10% de etanol. Com a utilização destas condições de crescimento pretendeu-se simular as condições ambientais presentes nos vinhos e bebidas e assim avaliar as potenciais leveduras com capacidade de contaminação deste tipo de produto alimentar (Kalathenos *et al.*, 1995).

O etanol induz efeitos inibidores sobre a taxa específica de crescimento na levedura *Z. bailii* e efeitos estimuladores na morte celular, de modo análogo ao observado para os ácidos orgânicos fracos (Estevinho, 1995). Verificou-se também que o etanol nesta levedura inibe o transporte de ácido acético, exercendo assim efeitos protectores contra possíveis efeitos negativos do ácido e contribuindo para uma elevada resistência a ambientes ácidos na presença de etanol (Sousa *et al.*, 1996). Em *S. cerevisiae*, quando crescida na presença de glucose, a passagem do ácido acético através da membrana ocorre por difusão da forma não iónica como já foi mencionado. Neste caso, o etanol aumentou, de forma exponencial, o influxo de ácido acético para o interior da célula e conseqüentemente os efeitos tóxicos do ácido (Casal *et al.*, 1998).

- *Outras características fisiológicas*

A principal característica de leveduras associadas à deterioração de bebidas é a sua tolerância a valores de pH ácido. *Z. bailii* tolera valores de pH de 2,2, na presença de ácido cítrico (Pitt, 1974). Esta levedura, bem como *Pichia membranaefaciens*, *Candida parapsilosis* e *Trichosporon pullulans* foram isoladas de bebidas refrigerantes (à base de citrinos) com valores de pH de 2,4, contendo 900 mg/l de ácido sórbico (Deák *et al.*, 1992).

Z. bailii apresenta capacidade de crescimento em produtos com concentrações de açúcares superiores a 70% (Thomas e Davenport, 1985), incluindo-se assim no grupo de leveduras osmotolerantes. Este grupo engloba espécies com capacidade de se desenvolver em produtos com 50% de glucose (p/v), correspondente a um valor de a_w de 0,909 (Jermini *et al.*, 1987 b).

Saccharomyces bailii, actualmente identificada como *Z. bailii* é conhecida como uma espécie frutofílica, dado que fermenta preferencialmente a frutose quando crescida num meio de cultura contendo glucose e frutose (Emmerich e Radler, 1983). A utilização preferencial da frutose é consistente com a cinética e a regulação do transporte da glucose e da frutose nesta espécie. Com efeito, no meio com frutose como única fonte de carbono e energia, a frutose é transportada por um sistema de baixa afinidade, mas de elevada capacidade de transporte ($K_m = 65,6$ mM; $V_{max} = 6,7$ mmol g⁻¹ h⁻¹). Em células crescidas no meio com glucose, o transportador apresenta um K_m de 7 mM e V_{max} de 1,7 mmol g⁻¹ h⁻¹. O transportador de glucose, que também aceita frutose como substrato, é inactivado pela presença de frutose (Sousa-Dias *et al.*, 1996). Estes resultados, no seu conjunto, são consistentes com a utilização preferencial da frutose.

1.2.2 Alimentos descritos como mais susceptíveis de contaminação e/ou deterioração por *Z. bailii*

- *Vinhos*

Desde há milénios que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizada intencionalmente ou inadvertidamente na produção de vinhos. No entanto, a flora

microbiana na superfície das uvas é muito diversificada (Martini *et al.*, 1996), e no mosto é variável ao longo da fermentação alcoólica. Observa-se uma sucessão de populações cujo crescimento e eliminação é promovido pela alteração das condições físico-químicas associadas à conversão do mosto em vinho.

Em geral, as leveduras isoladas de vinhos são designadas como “leveduras de contaminação” que podem ser divididas nos seguintes grupos:

- leveduras “acidentais ou inocentes” que se desenvolvem no vinho sem o alterar;
- leveduras de “deterioração” cuja presença está associada a alterações nas características organolépticas do vinho.

Segundo Loureiro e Malfeito-Ferreira (1993) podem ser distinguidos dois grupos de leveduras de deterioração:

- o grupo *senso lato* onde são incluídas as leveduras capazes de alterar as características organolépticas do vinho, independentemente da sua resistência a conservantes e aos processos tecnológicos de estabilização usados na indústria;
- o grupo *senso stricto* engloba leveduras consideradas perigosas que apresentam mecanismos de resistência às condições de “stress” e tornam possível a contaminação, mesmo de vinhos fabricados consoante as “boas práticas de produção”. Estas leveduras apresentam resistência muito elevada ao etanol, dióxido de enxofre ou outros conservantes.

As leveduras contaminantes podem conduzir à formação de aromas desagradáveis no vinho, como é o caso do acetato de etilo ou de outros ésteres voláteis. O sabor também pode sofrer alterações, devido à utilização de ácido láctico ou ácido cítrico pela levedura, com o concomitante aumento do pH, criando assim condições favoráveis para o desenvolvimento de bactérias (Thomas, 1993).

As leveduras contaminantes estão fisiologicamente bem adaptadas às condições ambientais presentes em bebidas alcoólicas e apresentam, de um modo geral, as seguintes características (Thomas, 1993):

- Capacidade de crescimento a valores de pH baixos (cerca 1,5)
- Capacidade de crescimento em produtos com elevadas concentrações de açúcar (até 68%, p/v)
 - Tolerância ao calor (até 70°C)
 - Tolerância a conservantes:
 - Ácido benzóico (> 1,0 mg/ml)
 - Ácido sórbico (> 0,8 mg/ml)
 - Dióxido de enxofre molecular (> 3 ppm SO₂)
 - Tolerância ao álcool (até 22%, v/v)
 - Tolerância a temperaturas baixas (até -2,2°C)
 - Crescimento a baixa concentração de oxigénio
 - Utilização de uma grande variedade de açúcares

Muitos dos vinhos actualmente comercializados contêm quantidades residuais de açúcares. No caso dos vinhos adamados adiciona-se sumo de uva concentrado como agente adoçante. Mesmo se o vinho engarrafado apresentar um teor de glucose ou frutose de 0,1% (p/v) pode ocorrer a formação de sedimentos que provocam a turvação do vinho ou formação de gás (Kunkee e Bisson, 1993). As leveduras associadas a este tipo de situações são *S. cerevisiae* e *Z. bailii*. A turvação pode ser registada quando o número de células atingir valores de 10⁵/ml, e a refermentação é aparente quando a densidade populacional atinge valores de 10⁶ a 10⁷ células por ml. Associado a estes elevados números encontra-se em geral um sedimento arenoso no fundo da garrafa. Considera-se que 1 a 5 células de *S. cerevisiae* ou *Z. bailii* por garrafa de um vinho seria suficiente para provocar a turvação e/ou refermentação. Desde que a qualidade organoléptica do vinho não esteja significativamente afectada, as garrafas podem ser esvaziadas e o vinho pode ser novamente filtrado e engarrafado (Thomas, 1993).

Durante o armazenamento do vinho, pode ocorrer o crescimento de leveduras e bactérias aeróbias na superfície, formando uma película, geralmente designada por véu. Neste "microclima", mas também no próprio vinho, podem ser encontradas várias leveduras contaminantes. *Pichia anomala* é uma espécie cuja capacidade de deterioração de vinho está associada à produção de altas concentrações de acetato de

etilo e outros ésteres voláteis. Certas estirpes de *Saccharomyces malidevorans* são capazes de produzir quantidades inaceitáveis de sulfureto de hidrogénio. *Saccharomyces ludwigii*, altamente tolerante a elevadas concentrações de dióxido de enxofre, é conhecida como produtora de elevadas concentrações de acetaldeído e só dificilmente pode ser eliminada de uma adega. Infecções pelas leveduras *Dekkera/Brettanomyces* podem conferir ao vinho sabores muito desagradáveis que foram descritos como sendo parecidos ao cheiro de terra, cães molhados, urina de rato ou suor de cavalo (Thomas, 1993, Loureiro, 1994).

Em resumo, podemos concluir que o cumprimento rigoroso das normas de higiene durante o processo de fabrico é um factor crucial para a produção de um vinho em boas condições microbiológicas. Esta afirmação é fundamentada no facto de a utilização das concentrações máximas permitidas de compostos antimicrobianos não ser suficiente para inibir o crescimento da levedura *Z. bailii*, e de bastar um pequeno número de células para originar problemas de deterioração. Considera-se assim que a estratégia mais adequada para obviar estes problemas assenta na implementação de medidas de prevenção que podem passar pela remoção completa de leveduras por filtração, engarrafamento em condições assépticas ou pelo aquecimento do vinho (Stewart, 1987; Kunkee e Bisson, 1993).

- *Produtos com elevado teor em açúcar*

O adoçante natural mais utilizado é o açúcar, proveniente da cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) ou da beterraba (*Beta vulgaris*). Outros adoçantes como o mel ou o melaço são também utilizados como aromatizantes na indústria alimentar. O açúcar na sua forma cristalina, ou em forma de pó, pode ser considerado como produto microbiologicamente estável, devido ao baixo teor de humidade. Por outro lado, os xaropes estão mais sujeitos a deteriorações microbianas devido ao teor de humidade mais elevado.

Os microrganismos encontrados em xaropes de açúcar são provenientes da matéria-prima ou podem ser introduzidos durante o processo de fabrico. A cana de açúcar, por exemplo, pode apresentar cerca de 10^2 a 10^4 de leveduras por grama. No caso do mel, as leveduras presentes provêm do néctar das flores e do conteúdo

intestinal das abelhas (Frazier e Westhoff, 1988). Os produtos doces apresentando um valor baixo de a_w (em geral inferior a 0,85) são conseqüentemente um excelente meio de crescimento para microrganismos osmotolerantes, em especial para as leveduras, principais responsáveis pela degradação deste tipo de alimentos. Entre as leveduras mais representativas encontram-se espécies pertencentes ao género *Zygosaccharomyces*, sendo *Z. rouxii* a espécie dominante (Tokuoka *et al.*, 1985), mas também outras pretencentes aos géneros *Pichia*, *Candida* e *Schizosaccharomyces* (Smittle *et al.*, 1992).

Num estudo sobre isolamento de leveduras de produtos com elevado teor de açúcar, como por exemplo mel, sumo de maçã, sumo de laranja concentrado, maçapão, xarope de açúcar e figos enlatados, foram isoladas 28 estirpes de leveduras osmotolerantes, 24 das quais foram identificadas como *Z. rouxii*, 2 como *Z. bailii*, uma estirpe de *Torulaspora delbrueckii* e outra de *Debaryomyces hansenii* (Jermini *et al.*, 1987 b).

As leveduras osmotolerantes, em concentrações que podem variar de 1 a 10^6 unidades formadoras de colónias por grama de mel, provocam a fermentação deste produto alimentar. Entre as leveduras presentes no mel predominam espécies do género *Saccharomyces*, tendo sido também detectadas espécies do género *Zygosaccharomyces*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lipomyces* ou *Pichia* (Snowdon e Cliver, 1996). A fermentação, favorecida por temperaturas moderadas e a presença de azoto, é lenta e pode demorar alguns meses. Em geral ocorre na superfície do contentor que apresenta um micro-clima com maior humidade. Os produtos da fermentação, dióxido de carbono, etanol, e ácidos não-voláteis, conferem um sabor desagradável ao mel. A fermentação é geralmente acompanhada pelo escurecimento e cristalização do mel (Frazier e Westhoff, 1988).

Para efeitos de conservação é habitual adicionar aos xaropes benzoato de sódio ou sorbato de potássio ou efectuar a sua pasteurização, como é usual no caso do mel. Os valores recomendados pela National Soft Drink Association para a utilização de xaropes de açúcar destinadas ao fabrico de bebidas é de 10 leveduras por 10 g de xarope (Smittle *et al.*, 1992). No caso do mel industrial, o teor de leveduras no produto acabado não excede algumas centenas de unidades formadoras de colónias por grama (Snowdon e Cliver, 1996).

- *Maioneses e molhos de salada*

As maioneses podem ser definidas como emulsões semi-sólidas contendo óleo vegetal (mínimo 50%), gema de ovo, vinagre e/ou sumo de limão e outros ingredientes como sal, temperos e glucose. O pH situa-se na gama de 3,6 a 4,0, o teor de ácido acético varia entre 0,3 a 0,5% e a a_w apresenta um valor de 0,925. Os molhos de salada possuem uma composição semelhante, com um teor em óleo mínimo de 30% e um teor de ácido acético variável entre 0,9 e 1,2%. A composição nutricional deste tipo de produtos constitui teoricamente um meio óptimo para o crescimento para um grande número de microrganismos. No entanto, verifica-se que o valor de pH reduzido, o teor de ácidos orgânicos e o baixo valor de a_w limita o crescimento de um número considerável de microrganismos. Apenas algumas bactérias, fungos filamentosos e leveduras como *Z. bailii* são capazes de crescer nestas condições (Smittle e Flowers, 1982). A maionese e molhos de salada quando deteriorados podem conter gás produzido por fermentação. A separação da emulsão e a formação de ácido butírico, acompanhada de formação de um cheiro rançoso desagradável, são outras características de maioneses alteradas microbiologicamente. O crescimento de bactérias lipolíticas e proteolíticas é inibido pelo baixo valor de pH (Jay, 1992).

Wind e Restaino (1995) mostraram que o sorbato de potássio, em concentrações de 0,3% (p/v) permitiram o crescimento de *Z. bailii* em maioneses. Concentrações mais elevadas de conservantes não podem ser aplicadas, devido a limitações legislativas e alterações do sabor do produto. Estes estudos indicam que a utilização de ingredientes de elevada qualidade em termos microbiológicos e o fabrico consoante as normas de HACCP (ver 1.6.1). são critérios fundamentais para evitar a proliferação de leveduras de contaminação.

1.3 Meios de cultura utilizados na detecção e enumeração de leveduras

Os meios de cultura para o isolamento de microrganismos podem ser classificados da seguinte maneira:

- meios de cultura gerais que permitem o desenvolvimento da maior parte dos principais grupos de microrganismos. No entanto, é importante salientar que não se dispõe de um meio "universal", que permita a recuperação de qualquer tipo de microrganismo com elevada eficiência. A composição do meio a utilizar deverá ser, sempre que possível, o mais parecida com as características do "habitat" natural dos microrganismos em estudo.
- meios de cultura selectivos permitem a proliferação de grupos específicos de microrganismos, enquanto inibem o crescimento de outros. A selectividade deve-se à utilização de compostos inibidores, escolha do pH apropriado ou à omissão de nutrientes específicos.
- meios de cultura diferenciais permitem a distinção de um grupo de microrganismos com características específicas (por exemplo actividade lipolítica ou proteolítica) (Jarvis e Williams, 1987).

1.3.1 Meios de cultura gerais

Um meio de cultura ideal para a enumeração de fungos em alimentos deve satisfazer os seguintes requisitos (Hocking e Pitt, 1992 a):

- suprimir o crescimento bacteriano
- ser adequado em termos nutricionais
- induzir a formação de colónias compactas
- inibir o crescimento excessivo de fungos filamentosos
- promover o crescimento de fungos relevantes

- facilitar a contagem/diferenciação de leveduras na presença de fungos filamentosos
- ser de fácil preparação

As características acima descritas são as que deveriam ser contempladas no desenho de um meio para contagem total de fungos e leveduras. Considera-se que na prática não existe um meio que satisfaça todos os requisitos acima descritos. No entanto, um elevado número de meios de cultura permitem avaliar com uma boa aproximação as populações de leveduras presentes num determinado produto. Actualmente, existe no mercado um grande número de meios de cultura em forma desidratada para o isolamento de leveduras, conforme resumido na tabela 1.6. A acidificação de meios de cultura para valores de pH 3,5 a 5,0 considerou-se necessária para inibir o crescimento de bactérias. Entretanto sabe-se que meios de cultura ácidos apresentam uma recuperação de leveduras inferior quando comparado com os meios contendo antibióticos (Welthagen e Viljoen, 1997). Além disso, valores baixos de pH são desfavoráveis para a recuperação de células em condições de "stress", podendo promover o crescimento de bactérias lácticas e favorecendo a precipitação de proteínas provenientes dos alimentos. A utilização de meios de cultura ácidos é recomendada somente para alimentos com baixos valores de pH, como frutas ou preparados de fruta (Beuchat, 1993 a).

Os antibióticos como oxitetraciclina, clorotetraciclina, cloranfenicol, gentamicina, e estreptomicina, incorporados nos meios de cultura a concentrações de 10 a 100 mg/l são eficientes inibidores do crescimento bacteriano. O cloranfenicol é utilizado preferencialmente, dado que apresenta uma actividade antimicrobiana contra uma vasta gama de bactérias e uma vez que pode ser adicionado ao meio de cultura antes da autoclavagem, o que representa uma vantagem do ponto de vista laboratorial (Beuchat, 1993 a; Jarvis e Williams, 1987). A incorporação de corante "rose bengal" ou do composto "dichloran" é aconselhado para a inibição da formação de micélios de fungos filamentosos. As recomendações dadas por Hocking e Pitt (1992 a) mencionam que o "rose bengal" pode ter efeitos inibitórios em leveduras, devido à fotodegradação do composto, associado à formação de produtos tóxicos.

O trabalho publicado por Deák (1992 a) resume os resultados de um estudo inter-laboratorial respeitante à comparação da eficiência de meios de cultura no isolamento de leveduras. Os meios utilizados foram por exemplo DRBC, TGY acidificado ou suplementado com cloranfenicol, DG18, e OGY (tabela 1.6). Testaram-se vários alimentos com diferentes teores de leveduras. A compilação dos dados mostrou que não há diferenças significativas entre os meios utilizados. Em alguns casos o meio DRBC apresentou uma recuperação superior aos restantes, enquanto o meio TGY acidificado mostrou uma baixa selectividade para leveduras. A percentagem de recuperação no meio DG18 foi inferior à dos outros meios.

O meio YGC é recomendado para a análise de leveduras e fungos filamentosos em carnes e produtos derivados de carnes, peixes, mariscos, leites, produtos lácteos, alimentos secos (como por exemplo especiarias, açúcar, cacau) produtos de chocolate, gelados e produtos congelados (Baumgart, 1993).

De um modo geral, para a pesquisa de leveduras em alimentos e bebidas recomenda-se a selecção e a validação do meio de cultura, para o qual se obtêm os melhores resultados em função do alimento a analisar, desde que não existam normas ou indicações específicas. Deve-se escolher o método de análise em função da densidade populacional estimada no próprio produto, bem como da consistência do alimento a analisar (Baumgart, 1993).

Tabela 1.6 Composição de alguns meios de cultura para o isolamento de fungos e/ou leveduras (Merck, 1994; Beuchat, 1993 a; Samson *et al.*, (Eds.), 1992; Vaz de Oliveira *et al.*, 1995).

Características e composição	Meio de cultura								
	OGY ou OGG Y	YGC	DG1 8	TGY	RBC ou DRBC	MEA	MY60 G	YEP D	WLN
Marca Merck, ref. nº	10877	1600 0	-	-	-	-	-	-	10866
Notas	(1)	-	-	-	(2)	-	-	-	-
pH	6,5	6,6	6,5	(?)	7,2 ou 5,6	(?)	(?)	(?)	5,5
Extracto de malte (g/l)	-	-	-	-	-	20,0	10,0	-	-
Peptona (g/l)	-	-	5,0	-	5,0	1,0	-	20,0	-
Triptona (g/l)	-	-	-	5,0	-	-	-	-	-
Extracto de levedura (g/l)	5,0	5,0	-	5,0	-	-	2,5	10,0	4,0
Hidrolisato de caseína (g/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	5,0
Glucose (g/l)	10,0	20,0	10,0	100	10,0	20,0	600	20,0	50,0
KH ₂ PO ₄ (g/l)	-	-	1,0	-	1,0	-	-	-	0,55
KCl (g/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,425
CaCl ₂ (g/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,125
MgSO ₄ (g/l)	-	-	0,24	-	0,24	-	-	-	0,125
FeCl ₃ (g/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,002 5
MnSO ₄ (g/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,002 5
"Rose bengal" (5% p/v) ml	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-
"Dichloran" (0,2% p/v em etanol) ml	-	-	1,0	-	1,0	-	-	-	-
Verde de bromocresol (g/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,022
Agar (g/l)	15,0	14,9	15,0	15,0	15,0	20,0	10,0	20,0	17,0
Gentamicina (g/l)	(0,05)	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxitetraclina (g/l)	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloranfenicol (g/l)	-	0,1	0,1	-	0,1	-	-	-	-

Notas:

- (1) Os antibióticos devem ser esterilizados por filtração e suplementados asepticamente ao meio após autoclavagem.
O meio OGGY consiste do meio OGY suplementado com gentamicina, na concentração indicada.
- (2) O meio DRBC consiste do meio RBC suplementado com "dichloran", na concentração indicada.

Abreviaturas utilizadas para os meios de cultura:

OGY	"Oxytetracycline glucose yeast extract agar"
OGGY	"Oxytetracycline glucose gentamycine yeast extract agar"
YGC	"Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar"
DG18	"Dichloran 18% glycerol agar"
TGY	"Tryptone glucose yeast extract agar"
RBC	"Rose bengal chloramphenicol agar"
DRBC	"Dichloran rose bengal chloramphenicol agar"
MEA	"Malt Extract Agar"
MY60G	"Malt extract yeast extract 60% glucose agar"
YEPD	"Yeast Extract peptone dextrose agar"
WLN	"Wallerstein laboratory nutrient agar"

1.3.2 Meios de cultura selectivos e/ou diferenciais

Para o acompanhamento da flora de leveduras ao longo do processo de produção do vinho, foram desenvolvidos vários meios de cultura, como por exemplo:

- WLN agar (descrito na tabela 1.6): meio de cultura geral utilizado para a enumeração de leveduras em processos de fermentação.
- Meio de lisina: utilizado para a selecção de leveduras apiculadas (inibição do crescimento de *S. cerevisiae*).
- YEPD (descrito na tabela 1.6): utilizado para a análise de vinhos e de mostos

A comparação entre os meios de cultura gerais DRBC, WLN e OGY, referidos na secção anterior, para a enumeração e identificação de leveduras em sumos de fruta, cerveja e vinho mostrou que os três meios de cultura permitiram a diferenciação de várias leveduras pela diferente morfologia das colónia. As diferenças morfológicas foram mais acentuadas no meio WLN (Andrews, 1992 a).

Para a detecção de leveduras resistentes a conservantes químicos aconselha-se a utilização dos meios TGY ou MEA (descritos na tabela 1.6), ambos acidificados com ácido acético na concentração final de 0,5% (v/v) (Hocking e Pitt, 1992 b).

As leveduras xerotolerantes, bem como outros fungos xerotolerantes podem ser isoladas em meios selectivos contendo quantidades substanciais de açúcar. Na tabela 1.7 mencionamos alguns meios já descritos anteriormente para isolamento de leveduras (tabela 1.6), referindo o valor de a_w , factor importante a ter em conta para o isolamento de leveduras xerotolerantes.

Tabela 1.7 Valores de a_w de alguns meios utilizados no isolamento de leveduras xerotolerantes (Beuchat, 1993 a).

Meio de cultura	a_w do meio
DG18	0,95
MY20G	0,97
MY40G	0,93
MY50G	0,89
MY60G	0,85

O meio DG18 agar (tabela 1.6), inicialmente desenvolvido para o isolamento de fungos de cereais, farinhas, nozes e especiarias, pode ser aplicado também para a recuperação de leveduras xerotolerantes. A adição de glicerol baixa o valor de a_w , e o “dichloran” evita o crescimento excessivo de fungos filamentosos (Beuchat, 1993 a). Os meios MY contêm quantidades crescentes de glucose (de 20 a 60 %, p/v).

Para a levedura *D. anomala* foram desenvolvidos estudos no sentido de otimizar as condições de crescimento, permitindo a recuperação rápida desta espécie. O Meio Rico (extracto de levedura 0,5 %, p/v; peptona 1,0 %, p/v; agar 2,0 % p/v) suplementado com glucose (0,05 % (p/v) e fructose (0,05 % (p/v) a pH 5,5 permitiu a detecção de colónias após um período de incubação de 2 dias a 34°C (Azevedo, 1997). Para a detecção desta levedura foi também desenvolvido meio diferencial e parcialmente selectivo contendo antibióticos e substratos percursos de aromas desagradáveis (Gonçalves, 1996).

Um novo meio de cultura que permite a detecção da levedura *Yarrowia lipolytica* encontra-se actualmente em fase de validação (Loureiro, comunicação pessoal).

Outros meios de cultura diferenciais são os meios cromogénicos, actualmente disponíveis principalmente para a pesquisa de bactérias. Os meios contêm um composto substrato de uma enzima, característica de uma espécie ou de um grupo de espécies. A reacção está associada à formação de uma substância corada. Assim, as bactérias em questão podem ser facilmente identificadas pela cor da colónia. Para o isolamento e a

diferenciação de espécies de leveduras do género *Candida* existe no mercado um meio cromogénico ("CHROMagar *Candida*", comercializado pela firma CHROMagar). Um meio cromogénico para o isolamento das leveduras *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lactis* a partir de produtos lácteos foi desenvolvido por Gonzalo e co-autores (1998).

1.3.3 Meios de cultura utilizados para a detecção e enumeração de *Zygosaccharomyces bailii*

Os trabalhos realizados por Makdesi e Beuchat (1996 a e 1996 b) tiveram como objectivo a optimização de um meio de cultura selectivo para a levedura *Z. bailii*. Nestes estudos foram testados vários meios de cultura, conforme resumido na tabela 1.8.

Tabela 1.8 Composição de alguns meios de cultura para o isolamento selectivo de *Z. bailii* (Makdesi e Beuchat, 1996 a e 1996 b).

Características e composição	Meio de cultura									
	YMA	YMA A	MEA A	TGY A	TFY A	TGY AC	TFY AC	TGY ACB	ZBA	ZBA C
a_w	0,99	-	-	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98
pH	5,8	3,8	3,8-4,0	3,9	3,9	4,0	4,1	4,2	4,0	4,2
Triptona (g/l)	-	-	-	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Extracto de malte (g/l)	3,0	3,0	20,0	-	-	-	-	-	-	-
Extracto de levedura (g/l)	3,0	3,0	-	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	2,5	2,5
Peptona (g/l)	5,0	5,0	1,0	-	-	-	-	-	-	-
Neopeptona (g/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	10,0	10,0
Glucose (g/l)	10,0	10,0	20,0	100	-	100	-	100	40,0	40,0
Frutose (g/l)	-	-	-	-	40,0	-	40,0	-	30,0	30,0
Cloreto de sódio (g/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	25,0	25,0
Sorbato de potássio (g/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1
Benzoato de sódio (g/l)	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-
Ácido acético glacial (ml/l)	-	5,0	5,0	5,0	5,0	3,0	3,0	3,0	5,0	3,0
Azul de tripano (g/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,25	0,25
Agar (g/l)	15,0	15,0	20,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0

Abreviaturas utilizadas para os meios de cultura:

YMA	"Yeast malt agar"	
YMAA	"Yeast malt agar" acidificado	(0,5% ácido acético)
MEAA	"Malt extract agar" acidificado	(0,5% ácido acético)
TGYA	"Tryptone glucose yeast agar" acidificado	(0,5% ácido acético)
TFYA	"Tryptone fructose yeast agar" acidificado	(0,5% ácido acético)
TGYAC	"Tryptone glucose yeast agar" acidificado	(0,3% ácido acético)

TFYAC "Tryptone fructose yeast agar" acidificado (0,3% ácido acético)
TGYACB "Tryptone glucose yeast agar" acidificado (0,3% ácido acético) com 0,3 g/l benzoato de sódio
ZBA "Zygosaccharomyces bailii selective medium" (0,5% ácido acético)
ZBAC "Zygosaccharomyces bailii selective medium" (0,3% ácido acético)

O meio de cultura “*Zygosaccharomyces bailii* selective medium”, cuja composição se encontra descrita na tabela 1.8 apresenta uma elevada selectividade para esta levedura devido à acção sinérgica de cloreto de sódio (2,5% p/v), ácido acético (0,5% v/v) e sorbato de potássio (0,01% p/v). A percentagem de recuperação para um tempo de incubação entre 2 a 3 dias varia entre 94-97% quando é utilizada a metodologia da filtração em membrana. Outras leveduras que foram capazes de se desenvolver neste meio de cultura (*Hansenula* e *Pichia* sp.) podem ser distinguidas pela morfologia das colónias (Erickson, 1993).

Alguns produtos alimentares (como por exemplo, leite condensado, xarope de chocolate, xarope de mirtílios, vinho, bebidas carbonatadas) com valores de a_w compreendidos entre 0,82 e 0,99 e o pH entre 2,9 e 6,5, foram inoculados com nove estirpes de *Z. bailii*. Os meios utilizados foram YMA (controlo), YMAA, TGYA e ZBA. A melhor recuperação das estirpes, 21 dias após a inoculação, foi obtida para o meio TGYA. No entanto, a recuperação nos vários meios de cultura variou, consoante a estirpe e o alimento testado. No caso do vinho, o meio TGYA recuperou cerca de 90% das células quando comparado com o controlo. A recuperação de células de *Z. bailii*, inoculadas em xarope de mirtílios contendo várias concentrações de benzoato de sódio, incubados à temperatura de 1°C durante 21 dias, mostrou uma recuperação parecida nos meios YMA, TGYA e ZBA, independentemente da concentração do conservante. Quando os ensaios foram conduzidos à temperatura de -19°C, as células evidenciaram uma menor recuperação nos meios acidificados (TGYA e ZBA) (Makdesi e Beuchat, 1996 a).

Com o objectivo de desenvolver um meio de cultura que permitisse uma melhor recuperação de células sujeitas a condições de “stress” por temperaturas elevadas, utilizaram-se os meios mencionados na tabela 1.8. Células de *Z. bailii*, inoculadas em mistura maionese:água numa relação 1:1 foram aquecidas a 50°C durante 45 minutos e espalhadas nos meios mencionados (excepto YMAA). A eficiência de recuperação dos meios na recuperação das células ocorreu pela seguinte ordem: YMA (não selectivo) =TGYAC =TFYAC>TFYA>TGYA>TGYACB>ZBAC>ZBA. Os meios selectivos que evidenciaram eficiência de recuperação mais elevadas (TGYAC, TFYAC, TGYA e TFYA) foram testados relativamente à recuperação de outras estirpes de leveduras na ausência de “stress” provocado por elevadas temperaturas. O comportamento dos meios variou

conforme a estirpe testada. Para a enumeração de células de *Z. bailii* recomenda-se os meios TGYAC e TFYAC. No entanto, estes dois meios não possuem a capacidade adequada para inibirem o crescimento de outras estirpes de leveduras. Assim, os autores sugerem que os meios devem ser otimizados com o objectivo de atingir uma selectividade mais elevada para *Z. bailii* (Makdesi e Beuchat, 1996 b).

Num estudo interlaboratorial, publicado por Hocking (1996), testou-se a recuperação de várias leveduras consideradas resistentes a conservantes (*Z. bailii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia membranaefaciens*). Os meios de cultura utilizados foram o TGY, MEA, ZBA, bem como o TGYA e MEAA, de acordo com as recomendações fornecidas por Hocking e Pitt (1992 b) para a enumeração de leveduras resistentes aos conservantes. As leveduras apresentaram a melhor recuperação no meio TGYA. O meio ZBA revelou a sua selectividade para *Z. bailii*, mas a recuperação era significativamente inferior quando comparado com o meio TGYA (Hocking, 1996).

1.3.4 Controlo de qualidade de meios de cultura - conceitos gerais

Num laboratório de controlo microbiológico, a qualidade do “produto final”, que neste caso serão os valores determinados que constam do relatório de ensaios, é garantida pelo cumprimento de normas e regras gerais para cada procedimento executado ao longo da análise.

Neste contexto, o controlo da qualidade dos meios de cultura utilizados é um factor que se considera de elevada importância. Meios de cultura desidratados deverão ser guardados em locais escuros e secos, à temperatura ambiente. Após a abertura da embalagem contendo o meio, este deve ser utilizado num prazo máximo de 6 meses. A utilização de meios fora deste período de validade ou o seu armazenamento em locais não apropriados pode reduzir drasticamente a percentagem de recuperação. Por exemplo, quando o meio SS Agar (utilizado na pesquisa de Salmonelas), é guardado durante 6 meses na bancada de um laboratório à luz do dia, o aumento do teor de humidade será de 1,1%, e a percentagem de recuperação baixa para 47% (Barry e Fay, 1972, cit. por Bridson, 1994).

A “sensibilidade” de meios desidratados é um factor importante no processo de acreditação pelo Instituto Português de Qualidade. Para adquirir e/ou manter a certificação, os laboratórios são obrigados a desenvolver procedimentos laboratoriais que garantem o controlo regular dos meios de cultura utilizados. Assim, para cada “lote” de meio preparado, deve ser evidenciada a sua qualidade, verificando a percentagem de recuperação e/ou o limite inferior de detecção de estirpes padronizadas. Se a recuperação destes microrganismos não estiver dentro dos limites estabelecidos pelo laboratório, deve-se rejeitar o meio preparado. A execução laboratorial destes ensaios deve ser planeada de forma a obter resultados fiáveis, com um investimento (tempo de trabalho e materiais) mínimo.

Weenk (1995) recomenda o espalhamento em placa (manual ou automático) e a metodologia de Miles-Misra como procedimentos quantitativos adequados. Em ambos os casos, prepara-se uma série de diluições decimais a partir de uma cultura (crescida durante a noite) contendo 10^6 a 10^8 células por ml. A metodologia segundo Miles-Misra (Miles *et al.*, 1938; cit. por Corry, 1982) consiste na aplicação de gotas (20 μ l) destas suspensões diluídas em diferentes segmentos na superfície de cada uma de várias placas de Petri. A incubação inicia-se após a secagem das gotas. Para as duas metodologias, o número das células na suspensão inicial é determinado a partir da diluição que apresenta cerca de 20 a 100 colónias, calculando a média das colónias obtidas nas placas múltiplas inoculadas. Em termos estatísticos, a avaliação de duas placas de Petri, com cerca de 100 colónias desenvolvidas na sua superfície, permitirá reduzir consideravelmente os erros estatísticos.

O método ecométrico, desenvolvido por Mossel e co-autores (Mossel *et al.*, 1983; cit. por Weenk, 1995) é considerado como técnica semi-quantitativa. Segundo este método, a partir de uma cultura crescida durante a noite, procede-se à diluição do inóculo por estria, seguindo a ordem dos números crescentes do esquema representado na figura 1.1. Após incubação da placa verifica-se se ocorreu crescimento ou não nas 21 riscas. Aplicando determinadas regras mencionadas pelo autor, calcula-se de seguida um número específico para a placa de Petri assim inoculada.

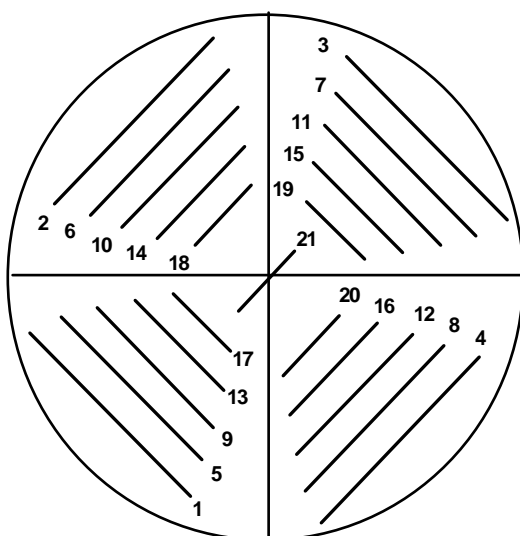


Figura 1.1 Esquema de inoculação pelo método ecométrico.

A “performance” ou a selectividade de um dado meio de cultura são sempre determinadas comparativamente às observadas para outro meio que pode ser um meio considerado equivalente ou um meio de cultura geral, consoante o estudo a realizar. Quando se pretende determinar, por exemplo, a selectividade de um meio, deve-se utilizar como referência um meio de cultura geral (Weenk, 1995).

1.4 Identificação e caracterização de leveduras

A classificação de leveduras assenta em técnicas convencionais, bastante trabalhosas, que passam pela análise de características morfológicas, fisiológicas, e bioquímicas. Os resultados obtidos nestes ensaios são comparadas com uma chave taxonómica que inclui 590 espécies e que permite a identificação ao nível da espécie. Cerca de 70 testes devem ser realizados para a identificação de uma determinada levedura (Barnett *et al.*, 1990). Estas técnicas são relativamente morosas e por este motivo foram desenvolvidos métodos mais rápidos.

Com o objectivo de tornar a identificação de leveduras menos dispendiosa, foram desenvolvidas, na última década, a partir do método convencional, alguns

sistemas simplificados ou miniaturizados que serão apresentados no ponto a seguir de uma forma resumida. Paralelamente, surgiram um elevado número de métodos de detecção e enumeração não convencionais, como por exemplo a citometria de fluxo (Ueckert *et al.*, 1995; Baumgart, 1996; Silley, 1994), métodos imunológicos (Middelhoven e Notermans, 1993; Johnson *et al.*, 1996) ou microscopia de fluorescência (Koch *et al.*, 1986). No ponto 1.4.2 serão referidos métodos que assentam na análise dos constituintes celulares, particularmente os métodos moleculares que se afiguram actualmente muito prometedores e cada vez mais adaptados à sua aplicação à indústria alimentar.

1.4.1 Métodos simplificados e miniaturizados

O sistema simplificado (SIM) para a identificação de leveduras permite a identificação das 76 leveduras mais relevantes em alimentos, pela execução de 20 testes fisiológicos. Apenas duas caixas de Petri e três tubos de ensaio são utilizados para examinar uma determinada estirpe relativamente à capacidade de assimilação de 10 fontes de carbono, fermentação de glucose, assimilação de nitratos e degradação de ureia (Deák 1992 b e 1993).

Existem no mercado "kits" de identificação, como por exemplo a galeria API 20C da firma Biomérieux SA (Marcy-l'Etoile, França) que é constituída por uma série de cavidades contendo diferentes substratos desidratados que são inoculados com uma suspensão da levedura a identificar, permitindo assim a realização de 19 testes de assimilação. O sistema "Biolog YT microplate", desenvolvido pela firma Biolog, engloba 95 testes de identificação numa microplaca. Neste sistema, a identificação de leveduras baseia-se também na utilização de várias fontes de carbono (Bochner *et al.*, 1992).

A validação do sistema simplificado de Deák foi efectuado num estudo que englobou 239 estirpes de leveduras e que passou pela comparação dos resultados de identificação com os obtidos pelo método convencional e pelo sistema API. Os resultados obtidos através do sistema simplificado foram correctos em 80% dos casos e foram significativamente melhores do que os obtidos pelo sistema API. Como conclusão, os autores recomendam que para fins taxonómicos, os métodos convencionais de

identificação devem ser utilizados, enquanto que para a identificação de leveduras de índole rotineiro, como no caso da indústria alimentar, aconselha-se a implementação do sistema simplificado (Deák, 1992 b; King e Török, 1992).

Nas técnicas acima mencionadas podem ocorrer identificações erradas, por exemplo devido a erros de leitura de resultados. Deve-se referenciar também que a levedura a identificar pode ser considerada como não identificável, quando não faz parte do conjunto de espécies de cada sistema de identificação (590 espécies no sistema de Barnett, 74 espécies no sistema de Deák) (Smith e Yarrow, 1996).

1.4.2 Análise de constituintes celulares

A detecção de leveduras com base nos perfis de ácidos gordos engloba o crescimento prévio da estirpe, de forma a obter a quantidade necessária de biomassa, seguida de extracção, derivatização e separação dos ácidos gordos por cromatografia gás-líquido. O perfil obtido para uma “estirpe problema” pode ser comparado com uma base de dados, permitindo assim um despiste rápido da estirpe analisada. A aplicação desta técnica no controlo de qualidade na indústria alimentar permite:

- a distinção das leveduras de fermentação das restantes contaminantes,
- a separação de grupos de riscos distintos dentro das leveduras contaminantes (Malfeito-Ferreira, 1996).

A comparação dos perfis electroforéticos de proteínas totais solúveis permitiu o agrupamento e a identificação de leveduras próximas em termos taxonómicos, como *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces carlsbergensis* e *Saccharomyces uvarum* (Van Vuuren e van der Meer, 1987). No entanto, este método não permitiu a identificação de estirpes de leveduras de interesse na indústria dos vinhos (Querol *et al.*, 1992). A análise combinada de perfis electroforéticos de algumas isoenzimas é no entanto uma metodologia adequada para distinguir estirpes de leveduras que pertencem ao grupo *Saccharomyces sensu stricto* (Duarte *et al.*, 1997).

As alterações no material genético ao longo da evolução possibilita a diferenciação muito específica entre microrganismos (inclusivé ao nível da estirpe). O

desenvolvimento de métodos moleculares, como por exemplo estudos de reassociação de DNA (Kurtzman, 1990) ou a comparação de sequências de RNA ou DNA ribossomal (James *et al.*, 1994 e 1996; Kurtzman, 1994) são uma base importante para o estabelecimento de relações filogenéticas. Com base nestes trabalhos taxonómicos foram desenvolvidos sistemas para a identificação rápida de leveduras relevantes na indústria alimentar.

A análise dos padrões de "Random Amplified Polymorphic DNA" (RAPD), que assenta na técnica de "Polymerase Chain Reaction" (PCR), permitiu obter sistemas de identificação com elevada especificidade, de fácil execução e de resposta rápida. Segmentos do DNA do microrganismo a identificar são hibridados com "primers" seleccionados e posteriormente amplificados pela Taq DNA polimerase. Pela repetição consecutiva deste processo de desnaturação-hibridação-amplificação consegue-se amplificar o fragmento escolhido de DNA de uma maneira exponencial. A análise do padrão electroforético dos fragmentos assim obtidos permite a identificação das leveduras ao nível da espécie ou mesmo ao nível da estirpe (van der Vossen e Hofstra, 1996; Baleiras Couto *et al.*, 1994; Ceccaldi, 1996; Baumgart, 1996). Esta técnica foi utilizada num estudo realizado por Baleiras-Couto e co-autores (1996), com 127 estirpes de leveduras isoladas de vários locais numa empresa produtora de maioneses e molhos de salada. Após a identificação das estirpes isoladas com o sistema API, procedeu-se à análise do DNA por PCR. Conseguiu-se distinguir várias estirpes da espécie *Zygosaccharomyces bailii*, que foram, juntamente com a levedura *Zygosaccharomyces bisporus*, as únicas leveduras presentes no produto final. A análise dos locais, ao longo do processo de fabrico, onde apareceram determinadas estirpes de *Z. bailii*, permitiu traçar o local da contaminação inicial.

Existem outros trabalhos baseados em sistemas de PCR relativamente à distinção de estirpes das espécies *S. cerevisiae*, *Z. bailii* e *Z. rouxii* (Pearson e McKee, 1992), *Z. bailii* e *Z. bisporus* (Stubbs *et al.*, 1994) ou *S. cerevisiae*, *S. pastorianus*, *S. bayanus* e *S. williams* (Lieckfeld *et al.*, 1993).

Certas regiões no rRNA, localizadas entre os genes que codificam para a sub-unidade ribossomal 18S, 5,8S e 28S são designadas por espaçadores internos transcritos ("internal transcribed spacers", ITS), e representam zonas muito pouco conservadas com alta variabilidade entre espécies ou entre estirpes. A amplificação

destas regiões, seguida da análise dos fragmentos de restrição dos produtos de amplificação evidenciou-se como uma técnica viável na identificação de leveduras isoladas a partir de “kefyr” (Wyder e Puhan, 1997).

De um modo geral, as metodologias apresentadas são prometedoras, apesar de ainda não terem sido introduzidas na indústria como técnicas de índole rotineiro. No entanto, é de referir que os inconvenientes das suas implementações na indústria estão frequentemente associadas a elevados custos iniciais de investimento para a aquisição de equipamentos bem como à necessidade de uma formação muito especializada por parte dos técnicos analistas.

1.5 Procedimentos experimentais e Normas Portuguesas para a pesquisa de leveduras em alimentos

1.5.1 Procedimentos experimentais

- **Aspectos gerais**

Na análise de leveduras em alimentos deve-se ter em conta algumas recomendações gerais. A quantidade de amostra a analisar deve ser a maior possível e a diluição inicial deve ser decimal (1+9), bem como as diluições consecutivas. Os meios de diluição mais frequentemente utilizados são a água desionizada, solução de peptona a 0,1 % (p/v) (frequentemente designado por água peptonada) ou solução salina (NaCl 0,85 %, p/v). Alguns laboratórios adicionam Tween 80 (0,05 %, p/v) com o objectivo de obter uma distribuição uniforme de células no meio de diluição. Para a análise de alimentos com elevado teor em açúcar recomenda-se uma solução de glucose a 20-30% (p/v) para evitar o choque osmótico das células. A inoculação deve-se efectuar preferencialmente por espalhamento na superfície de meios sólidos. A incorporação em massa, utilizando meio liquefeito a 40-48°C pode levar à inactivação térmica de células, e a limitações na disponibilidade de oxigénio, resultando assim em taxas de recuperação mais baixas. A incubação, de um modo geral, é conduzida à temperatura de 25°C durante cerca de 5 dias. Para leveduras xerotolerantes, o período de incubação deve-se

prolongar até 10 dias. Células que sofreram lesões subletais por condições adversas como por exemplo calor, frio, agentes químicos, pressão osmótica ou irradiação apresentam uma maior sensibilidade para factores químicos ou físicos no seu ambiente (Beuchat, 1993 a; Hocking e Pitt, 1992 a).

- **Leveduras xerotolerantes**

No caso de produtos com baixos teores de leveduras osmotolerantes recomenda-se a aplicação de uma das técnicas a seguir descritas:

- Teste de ausência-presença (Jermini *et al.*, 1987 b)

A um meio líquido com glucose (glucose 50%, p/v, extracto de levedura 0,5%, p/v) junta-se a amostra e incuba-se, com agitação mecânica, durante 2 a 10 dias a 30°C. Diariamente deve-se efectuar uma análise microscópica, bem como transferir uma pequena quantidade de cultura para o mesmo meio na sua forma sólida e incubar durante 5 a 7 dias. Se não foram detectadas leveduras após 10 dias de incubação da cultura líquida, considera-se a amostra isenta de leveduras osmotolerantes.

- Determinação do número mais provável

Após a preparação de uma "suspensão-mãe" da amostra em meio líquido de glucose, preparam-se várias diluições, e inoculam-se três tubos de ensaio contendo o meio líquido a partir de cada diluição. Os tubos assim preparados são selados com uma mistura de parafina/vaselina (1:4), e incubadas a 30°C durante 2 a 10 dias. A formação de gás confirma a fermentação e o número de células na amostra é registado consoante as tabelas estatísticas do número mais provável.

Para os produtos que contêm um elevado número de células (superior a 10^2 células por ml ou g), aconselha-se o espalhamento em placa, e a incubação a 30°C, durante 3 a 5 dias (Baumgart, 1993).

- **Leveduras do vinho**

Thomas e Ackermann (1988) desenvolveram um teste que permite avaliar se as leveduras encontradas em vinhos são capazes de o deteriorar. Após a filtração do vinho, coloca-se o filtro em meio de recuperação (dextrose 0,5%, p/v, triptona 1,0%, p/v e dihidrogenofosfato de potássio 1,0%, p/v), ajustado a pH 4,5, que permite a recuperação de células que estavam sujeitas a condições de "stress". Após 16 horas de incubação, os filtros são colocados em meio líquido, designado por "significance broth" a pH 4,5 e com concentração de etanol similar ao vinho analisado (*Yeast Carbon Base* 1,17%, p/v, ureia 0,04%, p/v, frutose 2,0%, p/v, etanol (95 %, v/v) 120 ml). Se após 72 horas de incubação ocorrer crescimento, considera-se que as leveduras isoladas são capazes de deteriorar o vinho.

Os procedimentos experimentais apresentados pelo Instituto do Vinho do Porto (Vaz de Oliveira *et al.*, 1995) recomendam a técnica da cultura em placa nos casos em que a concentração microbiana for elevada. A técnica de filtração em membrana é usada para vinhos com populações microbianas reduzidas, e a da cultura em meio líquido para a determinação do número mais provável quando se trata de vinhos que apresentam elevados teores de sólidos em suspensão. Em todos os casos deve-se utilizar o meio YEPD (composição mencionada na tabela 1.6) e a incubação deve ser efectuada a 25°C, em geral durante 3 dias. Se se suspeitar da presença de *Dekkera/Brettanomyces*, a incubação deve ser prolongada para 7 a 10 dias.

1.5.2 Normas portuguesas

Em geral, as normas oficiais exigem não só a pesquisa de leveduras, mas também de outros fungos. Já no século passado, foram descritos vários casos de intoxicações alimentares após a ingestão de pão com fungos filamentosos na sua superfície. O estudo destes casos conduziu à descoberta das micotoxinas, substâncias com elevado potencial tóxico, produzidas por fungos filamentosos. As doenças provocadas afectam principalmente o fígado e os rins. A aflatoxina, micotoxina produzida por *Aspergillus flavus*, pode ser detectada em alimentos como cereais, nozes,

mas também salsichas, pimento, feijão e produtos congelados (Liewen e Bullermann, 1992).

As normas portuguesas que fornecem regras gerais para o processo de determinação do número provável de bolores⁽¹⁾ e de leveduras viáveis em géneros alimentícios e alimentos para animais são as seguintes:

- NP 3277-1: Microbiologia alimentar
Contagem de bolores⁽¹⁾ e leveduras Parte I: Incubação a 25°C
Instituto Português da Qualidade, 1988
- NP 3277-2: Microbiologia alimentar
Contagem de bolores⁽¹⁾ e leveduras Parte II: Incubação a 37°C
Instituto Português da Qualidade, 1988
- NP 1934: Microbiologia alimentar
Leites e produtos lácteos: Contagem de bolores⁽¹⁾ e leveduras
Instituto Português da Qualidade, 1986
- NP 2078: Microbiologia alimentar
Cereais, leguminosas e produtos derivados
Contagem de bolores⁽¹⁾ e leveduras
Instituto Português da Qualidade, 1985

(1) Nas Normas Portuguesas, bem como na legislação, os fungos filamentosos são designadas por bolores. No presente trabalho, este termo será substituído pelo simónimo "fungos filamentosos".

Enquanto as duas primeiras normas são de índole geral, a terceira e quarta são específicas para um determinado produto alimentar. O preâmbulo destas quatro normas menciona, que *"a flora microbiana é considerada um índice de higiene, mas o avanço de conhecimentos tem permitido verificar quanto são prejudiciais para a saúde pública e animal e no aspecto tecnológico alguns grupos de bolores. Aconselha-se pois a identificarem-se, tanto quanto possível, os géneros de fungos filamentosos e os grupos de Aspergillus que se desenvolvem no meio de cultura descrito nesta Norma, em especial os potencialmente patogénicos e toxinogénicos, e a determinar a sua predominância dentro da contagem total de colónias."*

O procedimento de análise consiste na preparação de uma suspensão-mãe, de diluições convenientes e na sua posterior inoculação em meio sólido. De um modo geral, a suspensão-mãe deve ser preparada de forma a constituir a diluição 1/10 do produto a analisar. Após a preparação de uma série de diluições decimais, distribui-se 1,0 ml de

cada uma das diluições a utilizar por 5 placas contendo meio de cultura (“Cooke Rose Bengal Agar”, adicionado de clorotetraciclina na concentração final de 0,035 mg/ml). A incubação deve ser efectuada numa estufa a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 120 ± 2 horas. As colónias de leveduras e de fungos filamentosos são contadas separadamente de acordo com a sua morfologia. O resultado da análise deve apresentar o número total de fungos filamentosos, o número total de leveduras, bem como o número de colónias de cada género ou espécie de fungos filamentosos por grama ou ml do produto.

1.6 Qualidade microbiológica de alimentos

A indústria alimentar e as autoridades responsáveis na protecção da saúde pública são os principais interessados no controlo da qualidade microbiológica de alimentos. A qualidade microbiológica engloba três aspectos:

- **Segurança**
Um determinado produto não pode apresentar microrganismos patogénicos ou toxinas, que poderão provocar estados de doença após o consumo do produto.
- **Prazo de consumo aceitável**
Um alimento não pode apresentar níveis significativos de microrganismos capazes de provocar alterações organolépticas antes do fim da data limite de consumo.
- **Conformidade**
Um alimento deve apresentar conformidade em relação à segurança e ao prazo de consumo aceitável. Não podem surgir grandes variações entre vários lotes, dado que o consumidor pretende um produto com uma qualidade constante (Adams e Moss, 1995).

1.6.1 O conceito HACCP

Durante muito tempo, o conceito do controlo de qualidade na indústria alimentar baseou-se apenas no controlo do produto final. A aplicação do conceito HACCP (Hazard

Analysis Critical Control Point), que pode ser designado por análise de risco e definição de pontos críticos, constitui um sistema preventivo para a garantia de qualidade. A utilização deste conceito no caso da indústria alimentar significa a aplicação de conhecimentos de microbiologia alimentar no desenvolvimento de regras definidas para o controlo da qualidade microbiológica.

Análise de risco

A primeira intervenção na elaboração de um sistema de HACCP é a descrição completa do produto, o modo da sua utilização, bem como a elaboração de um diagrama de fluxo detalhado relativamente ao seu processo de produção. Neste diagrama devem ser especificadas possíveis origens de riscos e passam pela identificação dos seguintes pontos:

- Matérias primas ou ingredientes que podem apresentar microrganismos ou metabolitos indesejáveis;
- O potencial de contaminação nas várias fases de processamento;
- Produtos intermediários que permitam o crescimento ou a sobrevivência de microrganismos;
- Medidas de controlo de riscos como por exemplo a introdução de processos letais ou bacteriostáticos.

Identificação de pontos de controlo críticos

Os pontos de controlo críticos por definição referem-se aos locais ou processos tecnológicos onde é possível exercer controlo sobre os riscos anteriormente identificados, com o objectivo de os minimizar ou eliminar. Um dado processo de aquecimento ou de redução de pH pode ser identificado como ponto crítico.

Estabelecimento de critérios para os pontos de controlo críticos

Para cada um dos pontos de controlo críticos devem definir-se critérios de avaliação bem como limites críticos que indicam se o processo tecnológico está a decorrer conforme planeado. Possíveis critérios podem ser, por exemplo, a temperatura, pH, a_w , concentração de sal ou a textura de um produto intermediário.

Processos de monitorização de pontos de controlo críticos

A introdução de processos de monitorização (no caso ideal serão processos de monitorização contínua), permite a detecção de eventuais desvios de limites críticos previamente estabelecidos. Em geral, os critérios microbiológicos não são aplicados em processos de monitorização, devido ao período de tempo longo desde a inoculação até à obtenção de resultados. No entanto pode-se aplicar este tipo de análise na avaliação da matéria-prima.

O actual desenvolvimento de métodos microbiológicos rápidos, em especial na detecção de bactérias específicas, vai constituir futuramente uma ferramenta valiosa no processo de monitorização de pontos críticos (Vanne *et al.*, 1996).

Registos e verificações nos sistemas de HACCP

O sistema HACCP deve ser documentado e sempre actualizado, incluindo todo o sistema de monitorização, intervenções e alterações. O bom funcionamento do sistema HACCP deve ser controlado por inspecções periódicas que incluem a verificação dos processos de limpeza do equipamento, bem como dos produtos intermediários e produtos finais, por análises microbiológicas detalhadas, que fornecem informações quantitativas e qualitativas (Adams e Moss 1995; Pichhardt 1993).

Considerando o caso específico da levedura *Zygosaccharomyces bailii*, torna-se evidente que a aplicação sistemática e consequente do sistema de HACCP poderá ser uma ferramenta muito eficiente na garantia de qualidade dos produtos susceptíveis de deterioração.

1.6.2 Critérios de apreciação da qualidade microbiológica

A Norma Portuguesa NP 4129 (1994) define as regras gerais para a elaboração de critérios de apreciação dos resultados de análises microbiológicas. Esta norma prevê que a amostra destinada à análise laboratorial deve ser considerada única, constituída por cinco unidades com a massa mínima de 100 g cada uma, colhidas e acondicionadas separadamente em condições de assépsia. Para a maioria das determinações utiliza-se o critério a três classes, e para a pesquisa de microrganismos responsáveis por

toxinfecções alimentares, como por exemplo *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* ou *Campylobacter jejuni*, utiliza-se o critério de apreciação a duas classes.

Na apreciação dos resultados analíticos pelo critério a 3 classes consideram-se os seguintes parâmetros:

- n** o número de unidades que constituem a amostra para o laboratório (5 unidades),
- m** o valor estabelecido nas características microbiológicas do produto;
- M** o valor máximo de aceitação, sendo o seu valor fixado em 10 vezes o valor de **m** se a contagem for feita em meio sólido, e 30 vezes o valor de **m** se a contagem for feita em meio líquido;
- c** o número de unidades de amostra que apresenta resultados compreendidos entre **m** e **M**.

A qualidade do produto que corresponde à amostra é então considerada:

satisfatória quando os valores observados forem inferiores a 3 vezes (em meios de cultura sólidos) ou 10 vezes (em meios de cultura líquidos) o valor de **m**.

aceitável quando compreendido entre 3 e 10 vezes o valor de **m** (=M) em meios de cultura sólidos e entre 10 e 30 vezes o valor de **m** em meios de cultura líquidos para uma ou duas das cinco amostras ($c/n \leq 2$ em 5).

não satisfatória quando uma das 5 amostras apresentar valores superiores a **M**, ou no caso de $c/n > 2$ em 5.

Na apreciação dos resultados analíticos pelo critério a 2 classes considera-se que a qualidade do produto a que corresponde a amostra é:

satisfatória quando não se detecta a presença dum microrganismo patogénico;

não satisfatória quando se detecta a presença do microrganismo patogénico.

1.6.3 Características microbiológicas

A legislação alimentar actualmente em vigor define, entre outros aspectos, as características microbiológicas que um alimento deve satisfazer para ser considerado microbiologicamente próprio para consumo. As normas fixadas referem-se principalmente à ocorrência de microrganismos indicadores de fracas condições de higiene como por exemplo *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* ou patogénicos como *Salmonella sp.* ou *Listeria monocytogenes*. Neste contexto não serão mencionados estes tipo de microrganismos, dado que o tema do trabalho se concentra na contaminação provocada por leveduras. Deste modo, a análise de algumas normas legislativas permite elaborar o seguinte resumo, que fornece exemplos de números limites para a ocorrência de leveduras e fungos filamentosos em alimentos (tabela 1.9).

Como se verifica nesta tabela, o valor de **m** para as leveduras no caso de bolos e cremes de pastelaria é de 500 por grama do produto analisado. Para a pesquisa de leveduras pela NP 3277 (utilizando meio sólido) e aplicando o critério a 3 classes pode-se concluir que a qualidade microbiológica em relação ao teor de leveduras nestes produtos deve-se considerar como:

satisfatória quando o número de leveduras é inferior a 1500/g;

aceitável quando compreendido entre 1500 e 5000/g para uma ou duas das cinco amostras;

não satisfatória quando uma das 5 amostras apresentar valores superiores a 5000/g, ou mais do que duas amostras apresentarem valores entre 1500/g e 5000/g;

Tabela 1.9 Características microbiológicas, em relação a leveduras e fungos filamentosos, para alguns alimentos

Produto alimentar	Caraterísticas microbiológicas para fungos filamentosos e/ou leveduras	Fonte
Bolos e cremes de pastelaria	m = 500/g (leveduras) M = 5000/g (leveduras) n = 5 c = 2	Port. 65/90 (26.01.90)
Refrigerantes, por exemplo - de extractos vegetais, - de polme de citrinos, - aromatizados - adicionados de bebida alcoólica	max. 100/ml (leveduras + fungos fil.)	DL 93/89 (28.03.89)
Produtos lácteos:		
Leites condensados	max. 100/g (leveduras + fungos fil.)	DL 261/86 (01.09.86)
Leites em pó	max. 100/g (leveduras + fungos fil.)	DL 261/86 (01.09.86)
Queijos fundidos	máx. 10/g (fungos fil.) max. 90/g (leveduras)	Port. 73/90 (01.02.90)
Nata	máx. 20/g (fungos fil.) max. 200/g (leveduras)	Port. 68/88 (02.02.88)
Manteiga	max. 100/g (leveduras + fungos fil.)	Port.110/88 (15.02.88)
logurte natural	max. 100/ml (leveduras)	Port. 742/92 (24.07.92)
logurte aromatizado	max. 200/ml (leveduras)	

Notas:

- n** o número de unidades que constituem a amostra para o laboratório (5 unidades),
m o valor estabelecido nas características microbiológicas do produto;
M o valor máximo de aceitação, sendo o seu valor fixado em 10 vezes o valor de **m** se a contagem for feita em meio sólido, e 30 vezes o valor de **m** se a contagem for feita em meio líquido;
c o número de unidades de amostra que apresenta resultados compreendidos entre **m** e **M**.

No caso de bebidas alcoólicas como por exemplo vinhos, não existem normas legislativas relativamente aos parâmetros microbiológicos, dado que os vinhos não

costumam ser contaminados por microrganismos patogénicos. Além disso, embora a presença de leveduras de deterioração seja indesejável, não constitui um potencial risco para a saúde do consumidor, como seria no caso da ingestão de microrganismos patogénicos. Deste modo, a adega pode, no âmbito do seu sistema de controlo de qualidade, fixar normas internas. As especificações no que respeita a valores-limites para leveduras em vinhos australianos são resumidas no trabalho publicado por Andrews (1992 b). As adegas utilizam o critério a duas classes, e consideram em geral o vinho como aceitável quando não apresenta leveduras numa garafa de 750 ml (análise por filtração em membrana e cultivo no meio WLN, e/ou por contagem microscópica de células viáveis utilizando para isso a coloração com laranja de acridina). Algumas adegas toleram até 30 leveduras em 750 ml do produto. Quando a análise rotineira indica a possível presença de *Saccharomyces cerevisiae* ou *Zygosaccharomyces bailii*, os resultados deverão ser confirmados por um especialista antes da implementação de um plano de acção com o objectivo de identificar a possível origem das leveduras contaminantes e de as eliminar.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

As leveduras utilizadas no presente trabalho foram, em grande parte, cedidas pela Colecção Portuguesa de Culturas de Leveduras do Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC) e pelo Instituto Superior de Agronomia (ISA). Algumas das estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* foram provenientes do Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) da Holanda, e uma estirpe de *Debaryomyces hansenii* foi cedida pelo Instituto Nacional de Tecnologia Industrial (INETI).

O trabalho foi iniciado com uma bateria restrita de leveduras, que foi sendo alargada à medida que o presente trabalho progredia. É de referir que duas estirpes, (IGC 2899 e ISA 1213) incluídas desde o início do trabalho, classificadas como pertencentes à espécie *Zygosaccharomyces bailii*, foram posteriormente reclassificadas pela técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR) associada à utilização de um "primer" específico, pelo Instituto Gulbenkian de Ciência, devendo ser consideradas como pertencentes a outras espécies do género *Zygosaccharomyces*.

As leveduras foram mantidas em cunhas de agar com meio YEPD (descrito no ponto 2.2.1), e repicadas em intervalos de tempo regulares de 3 a 4 semanas.

Tabela 2.1 Estirpes de leveduras incluídas na bateria utilizada com vista à elaboração de meios de cultura selectivos.

Estirpe				Estirpe			
<i>Debaryomyces hansenii</i>	IGC	2968	ISA 5316	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4237	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	INETI	CL 18		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4240	
<i>Dekkera anomala</i>	IGC	5133		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4241	
<i>Dekkera anomala</i>	IGC	5160	ISA 1653	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC T	4455	
<i>Dekkera anomala</i>	IGC	5161	ISA 1654	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4457	
<i>Dekkera bruxellensis</i>	IGC	4179	ISA 1649	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4543	
<i>Dekkera bruxellensis</i>	IGC	4801	ISA 1650	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4891	
<i>Dekkera bruxellensis</i>	IGC	4808	ISA 1651	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS	5494	
<i>Dekkera bruxellensis</i>	IGC	5162	ISA 1652	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS	5495	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC	2631		<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	ISA	1083	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC	3341		<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	ISA	1088	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC	3806		<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	ISA	1089	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC	5041		<i>Saccharomyces pastorianus</i>	IGC	4579	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC	5044		<i>Saccharomyces pastorianus</i>	IGC T	4601	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC	5046		<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ISA	1190	
<i>Kloeckera apiculata</i>	ISA	1189		<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ISA	1191	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IGC	2671		<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ISA	1192	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IGC	2902		<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ISA	1193	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IGC	3014		<i>Torulaspota delbrueckii</i>	ISA	1037	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IGC	3286		<i>Torulaspota delbrueckii</i>	IGC T	2477	ISA 1082
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IGC	3886		<i>Torulaspota delbrueckii</i>	ISA	1229	
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	ISA	1308		<i>Torulaspota delbrueckii</i>	ISA	1549	IGC 3661
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	ISA	1421		<i>Torulaspota delbrueckii</i>	IGC	4182	ISA 1550
<i>Pichia anomala</i>	IGC	2495		<i>Torulaspota delbrueckii</i>	IGC	2916	
<i>Pichia anomala</i>	IGC	2505		<i>Torulaspota delbrueckii</i>	IGC	3209	
<i>Pichia anomala</i>	IGC	3294		<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	ISA	1213	
<i>Pichia anomala</i>	IGC	4121		<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	IGC	2899	
<i>Pichia anomala</i>	IGC	4380		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	4267	ISA 1022
<i>Pichia anomala</i>	IGC	4554		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1023	IGC 4268
<i>Pichia anomala</i>	IGC	5008		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1024	IGC 4269
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	2487		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1025	IGC 4270
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	2582		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1031	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	3315		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1095	IGC 2470
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	3796		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1148	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	4275		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1206	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	4475		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1212	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	4829		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1214	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	4875		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1265	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	5013		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	4806	ISA 1307
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	5015		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	4227	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	5017		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	4531	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	5019		<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC T	5167	ISA 1149
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	5122		<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC T	5335	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IGC	4791		<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5336	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IGC	5166		<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5337	
<i>Saccharomyces bayanus</i>	IGC T	4456		<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5381	
<i>Saccharomyces bayanus</i>	IGC	4565		<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5382	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS	1872-1		<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5383	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS	1872-2		<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5384	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC T	2608		<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5385	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	2917		<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	IGC	4169	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	3507		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA	1220	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	3507 III		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA	1552	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	3970		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA	1553	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	3977		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC	4194	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4003		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC	3691	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4017		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC	3693	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4022		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC	3694	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4023		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC	3695	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4024		<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC	3701	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4072					

Nota: As nomenclaturas dos laboratórios de origem encontram-se na segunda coluna da tabela. Na terceira coluna encontram-se mencionadas as correspondências à nomenclaturas de outras colecções.

2.2 Meios de cultura

2.2.1 Meios de cultura gerais

- **Meio com extracto de levedura, peptona e glucose** ("*Yeast Extract Peptone Dextrose Agar*", *YEPD*)

Glucose (BDH)	2% (p/v)
Peptona (Difco)	1% (p/v)
Extracto de levedura (Difco)	0,5% (p/v)
Agar (Difco)	2% (p/v)
Água desionizada	q.b.

O meio foi liquefeito por aquecimento até à fervura, e distribuído por tubos de ensaio (cerca de 5 ml/tubo). Seguidamente, procedeu-se à esterilização por autoclavagem (20 minutos, 1 atm). Deixou-se solidificar o meio nos tubos em posição inclinada (cerca de 10°) para obtenção de cunhas de agar. Este meio foi utilizado como meio de referência nos estudos de recuperação, e neste caso, após autoclavagem, foi vertido em caixas de Petri esterilizadas.

- **Meio de extracto de levedura e malte** ("*Yeast Extract Malt Agar*", *YMA*)

Extracto de malte (Difco)	0,3 % (p/v)
Extracto de levedura (Difco)	0,3 % (p/v)
Peptona (Difco)	0,5 % (p/v)
Glucose (BDH)	1,0 % (p/v)
Agar (Difco)	1,5 % (p/v)
Água desionizada	q.b.

Os compostos foram dissolvidos por aquecimento até à fervura e esterilizados por autoclavagem (20 minutos, 1 atm). Seguidamente, procedeu-se à distribuição do meio de cultura, temperado a 50-60°C, em caixas de Petri esterilizadas.

- **Meio de “Wallerstein Laboratory Nutrient Agar” (WLN Agar)**

Extracto de levedura	0,4 %	(p/v)
Peptona de caseína	0,5 %	(p/v)
Dextrose	5,0 %	(p/v)
Dihidrogenofosfato de potássio	0,055 %	(p/v)
Cloreto de potássio	0,0425 %	(p/v)
Cloreto de cálcio	0,0125 %	(p/v)
Sulfato de magnésio	0,0125 %	(p/v)
Cloreto de ferro	0,00025 %	(p/v)
Sulfato de manganês	0,00025 %	(p/v)
Verde de bromocresol	0,0022 %	(p/v)
Agar	2,0 %	(p/v)
Água desionizada	q.b.	

Utilizou-se o meio de cultura, que se encontra no mercado sob a forma desidratada (marca Difco). Na preparação do meio seguiram-se as indicações do fabricante.

- **Meio de extracto de malte (“Malt Extract Agar”, MEA)**

Extracto de malte (Difco)	3,0 %	(p/v)
Peptona (Difco)	0,5%	(p/v)
Agar (Difco)	1,5%	(p/v)
Água desionizada	q.b.	

Os compostos foram dissolvidos por aquecimento até à fervura e esterilizados por autoclavagem (20 minutos, 1 atm). Seguidamente procedeu-se à distribuição do meio de cultura, temperado a 50-60°C, em caixas de Petri esterilizadas.

- **Meio de extracto de malte a pH 4,5 (MEA4,5)**

Neste meio de cultura, análogo na composição ao anterior, acertou-se o pH ao valor de 4,5 (com HCl 1M) antes de proceder à esterilização no autoclave.

2.2.2 Meios de cultura selectivos

- **Meios de cultura preparados a partir de meio mineral base**

Um dos meios de cultura utilizados para crescimento em meio líquido ou em meio sólido, foi o meio mineral com vitaminas e oligoelementos A e B (van Uden, 1967) ao qual se adicionou um indicador ácido-base e a(s) fonte(s) de carbono e energia, de acordo com o pH pretendido, conforme descrito nas tabelas 2.2 e 2.3.

Na preparação dos meios a pH inicial de 4,0 ou 4,5 utilizou-se o verde de bromocresol como indicador e o púrpura de bromocresol no caso dos meios a pH inicial de 5,5 ou 6,0. Para a preparação de meios sólidos adicionou-se agar (Difco) na concentração de 2,0 % (p/v). Após ajuste do pH com NaOH (10 M) ou HCl (1M) ao valor desejado, procedeu-se à esterilização no autoclave durante 20 minutos, a 1 atm.

Os compostos utilizados como fonte de carbono nos meios com substratos simples ou mistos, foram preparados separadamente, na concentração adequada, ajustados ao pH desejado e esterilizados por filtração em membrana (filtros marca Schleicher & Schuell, porosidade de 0,22 μm).

Para a preparação dos meios sólidos, as soluções contendo a(s) fonte(s) de carbono, acrescentadas de quantidades adequadas das soluções de oligoelementos e vitaminas (concentração final de 0,05 %, v/v no meio de cultura completo), foram temperadas à temperatura de 50 a 60°C antes da adição asséptica ao meio base autoclavado e igualmente temperado a esta temperatura. Na preparação dos meios líquidos, as fontes de carbono adicionaram-se ao meio base sem o prévio ajuste da temperatura.

Os meios de cultura foram preparados 2 a 4 dias antes da sua utilização. Durante este período, os meios sólidos foram conservados em câmara fria a 4°C em sacos de plástico hermeticamente fechados. O meio base líquido contendo o indicador foi igualmente guardado em condições de refrigeração. Neste caso, preparou-se o meio completo apenas no momento de cada ensaio. Nos ensaios com meio sólido, cerca de 4 a 6 horas antes do início, retiravam-se as placas da câmara frigorífica, de modo a permitir a sua secagem.

Meio base

(NH ₄) ₂ SO ₄ (Merck)	0,5% (p/v)
KH ₂ PO ₄ (Merck)	0,5% (p/v)
MgSO ₄ ·7 H ₂ O (Merck)	0,05% (p/v)
CaCl ₂ ·2 H ₂ O (Merck)	0,013% (p/v)
Água desionizada	q.b.

Indicadores ácido-base

Púrpura de bromocresol (pK=6,3)	0,005% (p/v)
ou	
Verde de bromocresol (pK=4,7)	0,005% (p/v)

Solução de vitaminas

Biotina (BDH)	0,001% (p/v)
Pantotenato de cálcio (Merck)	0,08% (p/v)
Mio-inositol (BDH)	4% (p/v)
Niacina (Merck)	0,16% (p/v)
Hidrocloreto de piridoxina (BDH)	0,16% (p/v)
Hidrocloreto de tiamina (Sigma)	0,16% (p/v)
Água desionizada	q.b.

Solução de oligoelementos A

H ₃ BO ₃ (Merck)	1% (p/v)
KI (Merck)	0,2% (p/v)
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O (M&B)	0,4% (p/v)
Água desionizada	q.b.

Solução de oligoelementos B

CuSO ₄ · 5 H ₂ O (M&B)	0,08% (p/v)
FeCl ₃ · 6 H ₂ O (Merck)	0,4% (p/v)
MnSO ₄ · 4 H ₂ O (Merck)	0,8% (p/v)
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O (Merck)	0,8% (p/v)
HCl (Merck)10 ⁻³ N	0,8% (v/v)
Água desionizada	q.b.

Fontes de carbono e energia

As fontes de carbono e energia utilizadas na preparação dos meios foram as indicadas nas tabelas 2.2 e 2.3.

Tabela 2.2 Fontes de carbono e energia utilizadas nos meios de cultura com substratos simples.

Meio de cultura (abreviatura)	Fonte de carbono e energia		pH
Ox0,5 (4,0)	Ácido oxálico (Merck)	0,5% (p/v)	4,0
Ox0,5 (5,5)	Ácido oxálico (Merck)	0,5% (p/v)	5,5
Ox0,5 (6,0)	Ácido oxálico (Merck)	0,5% (p/v)	6,0
Mao0,5 (4,0)	Ácido malónico (Sigma)	0,5% (p/v)	4,0
Mao0,5 (5,5)	Ácido malónico (Sigma)	0,5% (p/v)	5,5
Mao0,5 (6,0)	Ácido malónico (Sigma)	0,5% (p/v)	6,0
Mae0,5 (4,0)	Ácido maléico (Merck)	0,5% (p/v)	4,0
Mae0,5 (5,5)	Ácido maléico (Merck)	0,5% (p/v)	5,5
Mae0,5 (6,0)	Ácido maléico (Merck)	0,5% (p/v)	6,0
F0,1(4,0)	Ácido fórmico (Merck)	0,1% (v/v)	4,0
F0,3 (4,5)	Ácido fórmico (Merck)	0,3% (v/v)	4,5
F0,4 (4,5)	Ácido fórmico (Merck)	0,4% (v/v)	4,5

Tabela 2.3 Fontes de carbono e energia utilizadas nos meios de cultura com substratos mistos.

Meio de cultura (abreviatura)	Fonte de carbono e energia							pH
	Glucose (BDH) (p/v)	Xilose (Merck) (p/v)	Arabinose e (Merck) (p/v)	Ácido acético (Merck) (v/v)	Ácido málico (Merck) (p/v)	Ácido pirúvico (Merck) (p/v)	Ácido fórmico (Merck) (v/v)	
Ac0,5 G0,2 (4)	0,2			0,5				4,0
Ac0,5 G0,2 (6)	0,2			0,5				6,0
Ac0,5 G0,5 (6)	0,5			0,5				6,0
Ac0,5 Ara 0,2 (4)			0,2	0,5				4,0
Ac0,5 Ara 0,2 (6)			0,2	0,5				6,0
Ac0,5 Xil 0,2 (4)		0,2		0,5				4,0
Ac0,5 Xil 0,2 (6)		0,2		0,5				6,0
Pir0,5 G0,2 (5,5)	0,2					0,5		5,5
Pir0,5 G0,2 (4,0)	0,2					0,5		4,0
Mal0,5 G0,25 (5,5)	0,25				0,5			5,5
Mal0,1 G0,5 (6,0)	0,5				0,1			6,0
F0,1 G0,1 (4,0)	0,1						0,1	4,0
F0,1 G0,1 (6,0)	0,1						0,1	6,0
F0,1 G0,2 (4,0)	0,2						0,1	4,0
F0,1 G0,5 (4,0)	0,5						0,1	4,0
F0,1 G0,5 (4,5)	0,5						0,1	4,5
F0,1 G1,0 (4,0)	1,0						0,1	4,0
F0,2 G0,5 (4,0)	0,5						0,2	4,0
F0,2 G0,5 (4,5)	0,5						0,2	4,5
F0,2 G1,0 (4,0)	1,0						0,2	4,0
F0,2 G1,0 (4,5)	1,0						0,2	4,5
F0,3 G0,1 (4,5)	0,1						0,3	4,5
F0,3 G0,5 (4,0)	0,5						0,3	4,0
F0,4 G0,1 (4,5)	0,1						0,4	4,5
F0,5 G0,1 (4,5)	0,1						0,5	4,5

- **Outros meios selectivos**

- ***Meio de extracto de malte acidificado (MEAA; pH = 3,3)***

Ao meio de extracto de malte, descrito no ponto 2.2.1, temperado a 50-60°C foi adicionado, em condições de assépsia, ácido acético (Merck) à concentração final de 0,5% (v/v). De seguida procedeu-se à distribuição do meio por caixas de Petri esterilizadas.

- ***Meio de triptona com glucose, extracto de levedura e 0,5% ácido acético (TGYA; pH = 3,9)***

Triptona (Difco)	0,5% (p/v)
Extracto de levedura (Difco)	0,5% (p/v)
Glucose (BDH)	10,0 % (p/v)
Agar (Difco)	1,5% (p/v)
Água desionizada	q.b.

Os compostos foram dissolvidos por aquecimento até à fervura e esterilizados por autoclavagem (20 minutos, 1 atm). Ao meio temperado a 50-60°C adicionou-se ácido acético (Merck), em condições de assépsia, à concentração final de 0,5% (v/v). Seguidamente procedeu-se à sua distribuição por caixas de Petri esterilizadas.

- ***Meio de triptona com glucose , extracto de levedura e 0,3% ácido acético (TGYAC; pH = 4,0)***

Neste meio de cultura, análogo na composição e na sua preparação ao meio anterior, a concentração de ácido acético foi reduzida para 0,3% (v/v).

- **Meio de triptona com frutose , extracto de levedura e 0,3% ácido acético (TFYAC; pH = 3,9)**

Triptona (Difco)	0,5% (p/v)
Extracto de levedura (Difco)	0,5% (p/v)
Frutose (Merck)	4,0% (p/v)
Agar (Difco)	1,5% (p/v)
Água desionizada	q.b.

Os compostos foram dissolvidos por aquecimento até à fervura e esterilizados por autoclavagem (20 minutos, 1 atm). Ao meio temperado a 50-60°C adicionou-se ácido acético (Merck), em condições de assépsia, à concentração final de 0,3% (v/v). Seguidamente procedeu-se à sua distribuição por caixas de Petri esterilizadas.

- **Meio de “Wallerstein Laboratory Differential Agar (WLD) (pH = 5,5 ± 0,2)**

Este meio de cultura corresponde ao meio de cultura geral “WLN”, suplementado de cicloheximida na concentração de 0,0004% (p/v). Utilizou-se o meio de cultura (marca Difco), que se encontra no mercado em forma desidratada. Na preparação do meio seguiram-se as indicações do fabricante.

- **Meio “Zygosaccharomyces bailii Agar” (ZBA; pH = 4,0)**

Sabouraud Dextrose Agar (Difco)	6,5 % (p/v)
Triptona (Difco)	0,5% (p/v)
Extracto de levedura (Difco)	0,25% (p/v)
Fructose (Merck)	3,0% (p/v)
Cloreto de sódio (Merck)	2,5% (p/v)
Azul de tripano (Merck)	0,025% (p/v)
Água desionizada	q.b.

Os constituintes do meio foram dissolvidos por aquecimento até à fervura e esterilizados por autoclavagem (20 minutos, 1 atm). A seguir, adicionou-se ácido acético (Merck), em condições de assépsia à concentração final de 0,5%, bem como 1 ml de uma solução esterilizada de 10% de sorbato de potássio (Merck). Seguidamente procedeu-se à distribuição do meio de cultura, temperado a 50-60°C, em caixas de Petri esterilizadas.

- **Meio de extracto de malte com 0,3% (v/v) ácido fórmico (MF0,3; pH = 4,5)**

Ao meio de extracto de malte, descrito no ponto 2.2.1, ajustado a pH 4,5, temperado a 50-60°C foi adicionado, em condições de assépsia, ácido fórmico (Merck) na concentração final de 0,3% (v/v). Seguidamente procedeu-se à distribuição do meio de cultura, em caixas de Petri esterilizadas.

- **Meio de extracto de malte com 0,4% (v/v) ácido fórmico (MF0,4; pH = 4,5)**

Neste meio de cultura, análogo na composição e na sua preparação ao anterior, a concentração de ácido fórmico foi aumentada para 0,4% (v/v).

- **Meio de extracto de malte com 0,3% (v/v) ácido fórmico e cicloheximida (MF0,3A; pH = 4,5)**

Este meio correspondente ao meio MF0,3, sendo suplementado, antes da autoclavagem, com cicloheximida (Sigma) a uma concentração de 0,0004 % (p/v).

- **Meio de extracto de malte com 0,4% (v/v) ácido fórmico e cicloheximida (MF0,4A; pH = 4,5)**

Análogo ao meio MF0,4, este meio foi suplementado, antes da autoclavagem, com cicloheximida (Sigma) a uma concentração de 0,0004 % (p/v).

2.3 Preparação de suspensões de células

As suspensões de leveduras foram obtidas a partir de culturas em meio de manutenção (cunhas de agar) crescidas durante 3 dias a 28°C. Uma porção adequada de biomassa foi ressuspensa num tubo de ensaio contendo água desionizada esterilizada, e a suspensão celular ajustada para uma absorvância (a 640 nm) compreendida entre 0,7 e 1,0 (Espectrofotômetro Spectronic 21, Bausch & Lomb).

2.4 Condições de inoculação e de crescimento

Ao longo da realização do presente trabalho utilizaram-se diferentes metodologias para o estudo da resposta das leveduras e avaliação dos meios de cultura desenvolvidos. Os meios foram testados sob a forma líquida e sólida de acordo com o descrito seguidamente.

- **Crescimento em meio líquido**

Tubos de ensaio

A suspensão de células (1 ml) preparada de acordo com o referido em 2.3 foi inoculada em tubos de ensaio largos (diâmetro 27 mm, altura 130 mm) contendo o meio de cultura líquido. Desta forma, no início do ensaio, a absorvância (640 nm) foi ajustada entre 0,1 - 0,15.

Microplacas

Microplacas da marca Greiner com 96 poços, contendo o meio de cultura foram inoculadas com 25 µl ("inóculo fraco"; absorvância a 640 nm: cerca 0,15) ou 100 µl ("inóculo forte"; absorvância a 640 nm: cerca 0,4) da suspensão celular descrita no ponto 2.3. Cada estirpe de levedura foi inoculada em três ou seis poços, contendo o meio de cultura.

- **Crescimento em meio sólido**

Gotas

A partir da suspensão celular descrita em 2.3, transferiram-se 5 μ l para uma placa de Petri contendo meio sólido. A inoculação foi realizada em triplicado. Após a secagem das gotas, colocaram-se as placas na estufa de incubação.

Esferas de vidro

Para a determinação da percentagem de recuperação recorreu-se ao espalhamento em meio sólido pela utilização de esferas de vidro. Para tal, a suspensão celular foi diluída por diluições decimais, utilizando água desionizada esterilizada como meio de diluição. A seguir, transferiram-se 0,1 ml das diluições escolhidas para a superfície de placas de Petri contendo meio sólido. O espalhamento foi efectuado com o auxílio de 4 a 6 esferas de vidro esterilizadas, de 2,5 mm de diâmetro, colocadas na superfície do meio. Por movimentos rotativos horizontais da placa de Petri, as esferas distribuíram o inóculo na superfície do meio, e foram posteriormente retiradas. As inoculações foram efectuadas em duplicado ou triplicado. Após a secagem do inóculo, colocaram-se as placas na estufa de incubação.

Filtração em membrana

A partir das diluições decimais preparadas para os ensaios de inoculação com esferas, transferiram-se 0,1 ml para o funil de uma rampa de filtração (marca Milipore). A seguir, juntaram-se 50 ml de água desionizada esterilizada, de modo a obter uma distribuição homogénea de células. A filtração foi efectuada por aplicação de vácuo, utilizando membranas filtrantes de 0,45 μ m de porosidade (marca Milipore). As filtrações foram realizadas em duplicado, e os filtros colocados na superfície de placas de Petri contendo os meios sólidos pretendidos. Posteriormente procedeu-se à incubação das placas.

Para o estudo da flora em amostras de vinho contaminado, aplicou-se a mesma técnica, filtrando em duplicado vários volumes (0,1 ml, 1,0 ml e 5,0 ml) de amostras de vinho.

Metodologia segundo Miles-Misra

A partir de quatro diluições decimais seguidas (preparadas como nos ensaios de inoculação com esferas), transferiram-se 50 µl para cada um de quatro segmentos de uma placa de Petri. A inoculação foi realizada em triplicado. Após a secagem das gotas, colocaram-se as placas na estufa de incubação.

Para cada experiência, os detalhes referentes à metodologia utilizada, à concentração da fonte de carbono, bem como ao valor de pH do meio e às condições de incubação, serão mencionados nas respectivas secções dos resultados.

2.5 Condições de incubação

No caso das placas contendo meio sólido, a incubação foi efectuada à temperatura de 28 ou 30°C (para a maioria dos ensaios) numa estufa de incubação (marca Haereus). Para os meios líquidos a incubação foi conduzida à mesma temperatura, numa incubadora (marca B. Braun) com uma agitação de 160 rpm.

2.6 Registo de resultados

Para os meios de cultura contendo os indicadores verde ou púrpura de bromocresol, foram estabelecidos critérios para a avaliação de viragem da cor, bem como para a classificação dos resultados em respostas positivas e negativas (ver secção de resultados). A figura 2.1 representa a cor dos meios líquidos com verde de bromocresol para uma série de valores de pH.

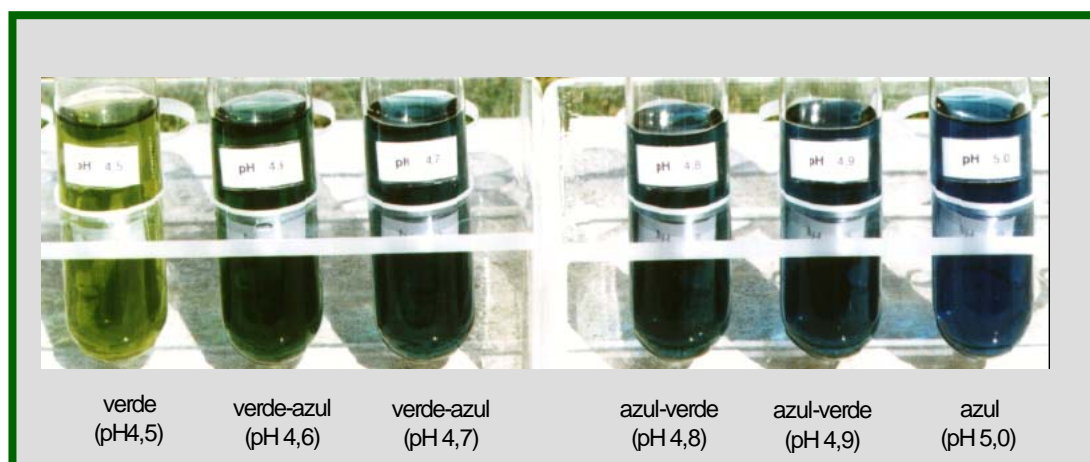


Figura 2.1 Alteração da cor do meio de cultura líquido na gama de pH 4,5-5,0 com o indicador verde de bromocresol.

O número de colónias desenvolvidas na superfície dos meios sólidos, bem como a avaliação da sua morfologia foram determinados com o auxílio de uma lupa (Marca Leica; ampliação 6x).

A avaliação do crescimento das leveduras nos meios líquidos foi feita utilizando a escala de Wickerham (Van der Walt e Yarrow, 1984). Para isso, os tubos foram agitados e as suas leituras efectuadas contra uma folha de papel branco com linhas pretas. Classificou-se o crescimento da seguinte forma:

- + quando se observavam nitidamente as linhas à transparência, considerando-se como ausência de crescimento;
- ++ quando se observavam as linhas, mas não de uma forma nítida, sendo classificado como crescimento intermédio;
- +++ quando não se observavam as linhas, devido a um crescimento acentuado.

2.7 Tratamento estatístico dos resultados

Para a avaliação de diferenças significativas nos valores das médias obtidas no que respeita aos ensaios de recuperação de leveduras nos vários meios de cultura, aplicou-se o "teste de t", conforme descrito por Zar (1974).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Formulação de um possível meio de cultura com substratos simples ou misto selectivo/diferencial para *Zygosaccharomyces bailii*

3.1.1 Introdução

O desenvolvimento de um meio de cultura selectivo/diferencial para a levedura *Zygosaccharomyces bailii* que constituiu tema do presente trabalho de tese, teve por base uma série de estudos anteriormente realizados respeitantes à caracterização fisiológica desta espécie (Estevinho, 1995; Sousa *et al.*, 1996; Sousa *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 1997). Estes estudos demonstraram, que a levedura *Z. bailii*, em contraste com outras leveduras, apresenta capacidade de consumo simultâneo de ácido acético e glucose. Este comportamento, não correspondendo ao observado para a grande maioria das leveduras estudadas, levantou a hipótese de poder ser explorado para o desenho de um meio de cultura específico para *Z. bailii*. Com efeito, num meio misto contendo glucose e ácido acético, a visualização de diferentes padrões de utilização por diferentes espécies de leveduras (simultânea, simultânea/sequencial ou sequencial) poderia ser conseguida pela incorporação de um indicador ácido-base no meio de cultura.

Conforme referido na introdução geral, *Z. bailii*, num meio misto com glucose e ácido acético, apresenta um crescimento bifásico, em que a primeira fase está associada ao consumo simultâneo de glucose e ácido acético e a segunda fase ao consumo do ácido acético remanescente no meio. Assim, na primeira fase observa-se uma constância relativa do pH do meio de cultura e na segunda fase um aumento

significativo do pH associado à viragem do indicador. À partida, outras espécies, em que genericamente, no mesmo meio misto, o consumo do ácido acético ocorria após esgotamento da glucose, deveriam apresentar um crescimento diaúxico. Nesta situação observar-se-ia uma acidificação durante a primeira fase de crescimento seguida então de uma alcalinização na segunda fase de crescimento.

Tendo por base estes dados seria de prevêr que as estirpes de *Z. bailii* no meio misto com glucose e ácido acético conduzissem a uma viragem mais rápida do indicador no meio de cultura comparativamente com as outras espécies. Assim, o poder discriminatório do meio assentaria no diferente no tempo da resposta em termos de viragem do indicador ácido-base. Nesta base, a resposta das diferentes espécies para um tempo de incubação definido seria classificada em positiva, quando se verificasse uma alcalinização do meio e correspondente alteração da cor, e negativa quando o valor de pH não fosse alterado, mantendo-se neste caso a cor inicial do meio de cultura.

Tendo em conta o anteriormente referido, e utilizando um número restrito de espécies, procedeu-se numa primeira fase à avaliação do meio mineral misto com glucose (0,2%, p/v) e ácido acético (0,5%, v/v) a dois valores de pH inicial (4,0 e 6,0). Numa tentativa de aumentar a probabilidade de diversidade de respostas possíveis pelas diferentes espécies tentou-se ainda, nesta fase, explorar as seguintes situações em termos de composição de meios a ensaiar:

- meios mistos com ácido acético em que a glucose foi substituída por outros açúcares (arabinose e xilose);
- meios mistos com glucose em que o ácido acético foi substituído por outros ácidos mono- ou dicarboxílicos;
- meios simples contendo um ácido carboxílico como única fonte de carbono e energia.

A estratégia para os trabalhos experimentais apresentados nesta parte consistiu numa primeira fase em testar o maior número de meios de cultura simples ou mistos com um número restrito de leveduras.

3.1.2 Meios de cultura com um açúcar e ácido acético

Os ensaios de crescimento em meios com substratos mistos foram realizados aplicando gotas (5 µl) da suspensão celular na superfície de meios de cultura sólidos, conforme descrito no ponto 2.4. Os indicadores utilizados foram o verde de bromocresol (pK = 4,7) nos meios a pH inicial de 4,0, e o púrpura de bromocresol (pK = 6,3) para os meios a pH inicial de 6,0. As placas de Petri inoculadas foram incubadas à temperatura de 28°C. Os resultados obtidos, após 48 horas de incubação, são apresentados na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Resposta de várias leveduras em meios de cultura contendo ácido acético e diferentes açúcares, após 48 horas de incubação a 28°C.

Ac0,5 G0,2 Meio mineral com ácido acético (0,5%, v/v) e glucose (0,2%, p/v).
 Ac0,5 Ara 0,2 Meio mineral com ácido acético (0,5%, v/v) e arabinose (0,2%, p/v).
 Ac0,5 Xil0,2 Meio mineral com ácido acético (0,5%, v/v) e xilose (0,2%, p/v).

Estirpe		Ac0,5 G0,2		Ac0,5 Ara0,2		Ac0,5 Xil0,2	
		pH 4,0	pH 6,0	pH 4,0	pH 6,0	pH 4,0	pH 6,0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	IGC 2968	0	-	0	+	0	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4072	-	-	0	+	0	+
<i>Dekkera anomala</i>	IGC 5133	0	-	0	0	0	0
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 3796	-	-	-	+	-	+
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4806	-	-	-	+	-	+
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	ISA 1229	-	-	-	+	-	+

Notas: 0 sem crescimento
 - resposta negativa (acidificação ou manutenção do pH do meio)
 + resposta positiva (viragem da cor do indicador verde de bromocresol para azul e do púrpura de bromocresol para roxo, devido à alcalinização do meio).

Pela análise da tabela 3.1 verificamos que a resposta das leveduras *P. membranaefaciens*, *Z. bailii* e *T. delbrueckii* foi idêntica para os 6 meios de cultura testados. Nos meios com glucose e ácido acético (pH 4,0 e pH 6,0), o crescimento não provocou alteração do valor de pH, e conseqüentemente não ocorreu viragem do indicador no meio. Segundo Barnett *et al.* (1990), as referidas leveduras não são capazes de utilizar arabinose ou xilose como fonte de carbono. A alcalinização verificada quando se utilizam estes dois açúcares nos meios de cultura mistos, a pH 6,0, foi devida ao consumo exclusivo do ácido acético. A pH 4,0 verificou-se uma resposta negativa por parte destas três leveduras. Esta observação poderá ser explicada tendo em

consideração o pK dos indicadores utilizados. O pK do verde de bromocresol é 4,7, e assim, no meio a pH 4,0 a alcalinização terá que ser superior a 0,7 unidades de pH para que seja detectada uma mudança de cor. Nos meios a pH 6,0, contendo púrpura de bromocresol como indicador (pK=6,3), a alcalinização terá de ser superior a 0,3 unidades de pH, para se verificar a mudança da cor do meio de cultura. Assim, os meios a pH 6,0 serão mais “sensíveis” na detecção de alterações de pH. A maior capacidade tampão do meio misto com ácido acético a pH 4,0, comparativamente com pH 6,0, também poderá contribuir para uma menor “sensibilidade” do primeiro meio relativamente ao segundo. Por último, a relação entre as velocidades de consumo dos dois substratos e a sua dependência com o pH determinará a velocidade de variação do pH e portanto o tempo ao qual se observa viragem do indicador.

S. cerevisiae e *D. hansenii*, em meios contendo glucose, arabinose ou xilose, em combinação com ácido acético, a pH 6,0, mostraram um comportamento análogo às três leveduras anteriormente descrito. No entanto, quando analisamos o comportamento dessas mesmas duas leveduras nos mesmos meios de cultura, agora a pH 4,0, verificamos a ausência de crescimento (com a excepção de *S. cerevisiae* no meio Ac0,5 G0,2). Este resultado sugere possíveis efeitos tóxicos do ácido acético a valores de pH mais baixos, e uma menor resistência destas leveduras a estas condições.

A levedura *D. anomala* cresceu apenas no meio com ácido acético e glucose, a pH 6,0.

Os resultados obtidos nesta primeira série de ensaios não nos permitiram seleccionar um meio específico para separar *Z. bailii* das outras cinco espécies.

3.1.3 Meios de cultura com glucose e um ácido mono- ou dicarboxílico

Foi ainda testada a capacidade de alcalinização das leveduras em meios de cultura mistos, escolhendo-se a glucose como fonte de carbono, associada aos ácidos acético, málico, pirúvico ou fórmico. Foram testadas várias relações ácido/açúcar, e diferentes valores iniciais de pH do meio, com o objectivo de detectar condições em que *Z. bailii* fosse capaz de induzir uma alcalinização mais rápida. Os indicadores utilizados

foram o verde de bromocresol nos meios a pH inicial de 4,0, e o púrpura de bromocresol para os meios a pH inicial de 5,5 e 6,0. Após um período de incubação de 48 horas a 28°C, foram registados os resultados que se apresentam na tabela 3.2.

Tabela 3.2 Resposta de várias leveduras em meios de cultura contendo glucose e ácidos a várias concentrações, crescidas a 28°C, durante 48 horas e a diferentes valores de pH.

Ac0,5 G0,5	Meio mineral com ácido acético (0,5%, v/v) e glucose (0,5%, p/v).
Mal0,1 G0,5	Meio mineral com ácido málico (0,1%, p/v) e glucose (0,5%, p/v).
Mal0,5 G0,25	Meio mineral com ácido málico (0,5%, p/v) e glucose (0,25%, p/v).
Pir0,5 G0,2	Meio mineral com ácido pirúvico (0,5%, p/v) e glucose (0,2%, p/v).
F0,1 G0,1	Meio mineral com ácido fórmico (0,1%, v/v) e glucose (0,1%, p/v).

Estirpe		Ac 0,5	Mal 0,1	Mal 0,5	Pir 0,5	Pir 0,5	F 0,1	F 0,1
		G 0,5	G 0,5	G 0,25	G 0,2	G 0,2	G 0,1	G 0,1
		pH 6,0	pH 6,0	pH 5,5	pH 4,0	pH 5,5	pH 4,0	pH 6,0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	IGC 2968	+	+	*	+	+	-	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4072	-	-	-	+	+	-	-
<i>Dekkera anomala</i>	IGC 5133	-	-	-	-	-	-	(+)
<i>Pichia mambraanaefaciens</i>	IGC 3796	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4806	+	-	-	-	-	+	(1)
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	ISA 1229	-	-	-	+	+	-	-

Notas:

- resposta negativa (acidificação ou manutenção do pH do meio)
- + resposta positiva (viragem da cor do indicador verde de bromocresol para azul e do púrpura de bromocresol para roxo, devido à alcalinização do meio.
- (+) ligeira alcalinização do pH do meio de cultura
- * gota de cor azul
- (1) ligeira alcalinização após 24 horas de incubação, seguida da acidificação após um período total de incubação de 48 horas.

Pela análise da tabela 3.2 verificamos que o meio de cultura com ácido acético (0,5%, v/v) e glucose (0,5%, p/v), pH 6,0, só apresentou viragem de cor quando inoculado com *D. hansenii* e *Z. bailii*. As restantes leveduras não induziram alcalinização deste meio. Para estas espécies a alcalinização provocada pelo consumo do ácido poderá ter sido compensada pela acidificação provocada pelo consumo da glucose.

D. hansenii foi a única levedura capaz de alcalinizar o meio de cultura contendo 0,5% (p/v) glucose e 0,1% (p/v) ácido málico a pH 6,0. Esta alcalinização não foi observada no meio com 0,5% (p/v) de ácido málico e 0,25% (p/v) de glucose, a pH 5,5. No entanto, a levedura cresceu formando um biofilme de cor azul na área da gota. Outras experiências realizadas, não mencionadas nesta tabela revelaram que, em determinadas condições experimentais, a levedura *D. hansenii* é capaz de produzir

durante a fase estacionária compostos do grupo dos flavonóides, de cor amarela, que são excretados para o meio de cultura. Deste modo, pode pressupor-se que o composto amarelo foi alterado para uma estrutura do tipo antocianidina, de cor azul ou roxa. Para confirmar esta hipótese, testou-se uma outra estirpe, *D.hansenii* INETI CL 18, não se tendo formado o composto azul no referido meio de cultura.

D. hansenii, *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii* apresentaram uma resposta positiva nos meios mistos contendo ácido pirúvico e glucose a um valor inicial de pH 4,0 e 5,5, .

No caso dos meios contendo ácidos, a proporção de ácido não dissociado/dissociado pode ser manipulada pela variação do pH. A título de exemplo, podem ser referidos os meios contendo ácido fórmico. As concentrações das formas dissociadas/não dissociadas em função do pH são representadas na tabela 3.3.

Tabela 3.3 Concentração da forma dissociada e não dissociada do ácido fórmico em função do pH.

pH	concentração total	concentração da forma	concentração da forma
	do ácido	dissociada	não dissociada
	% (v/v)	% (v/v)	% (v/v)
4,0	0,1	0,063	0,037
6,0	0,1	0,099	0,001

No meio com ácido fórmico e glucose a pH 6,0, a levedura *D. hansenii* evidenciou uma resposta positiva, enquanto que *D. anomala* demonstrou apenas uma ligeira alcalinização. Contudo, a pH 4,0, não se detectou a alcalinização pelas duas espécies.

No meio de cultura misto, contendo glucose e ácido fórmico a pH 4,0, *Z. bailii*, entre as espécies testadas, foi a única que alcalinizou o meio e levou à viragem da cor, e apenas após 24 horas de incubação. A pH 6,0, o comportamento da levedura *Z. bailii* foi diferente: o meio alcalinizou ligeiramente após 24 horas de incubação, seguido de acidificação durante as 24 horas seguintes. Ou seja, inicialmente parece ter ocorrido consumo preferencial de ácido fórmico, seguido do consumo de glucose. Este comportamento distinto da levedura *Z. bailii* nos dois valores de pH testados, poderá

estar associado às proporções diferentes de ácido na forma dissociada. A pH 4,0, a proporção de glucose/ácido na forma dissociada é mais favorável a uma viragem rápida da cor do meio de cultura. Deste modo os resultados obtidos nos meios de cultura contendo glucose e ácido fórmico pareceram prometedores como ponto de partida, com vista ao desenvolvimento de um meio de cultura específico para a levedura *Z. bailii*.

3.1.4 Meios simples com um ácido carboxílico

Foi também avaliado o comportamento de meios simples contendo ácido oxálico, malónico e maleico como única fonte de carbono e energia. O procedimento experimental e as condições de incubação foram já descritos no ponto anterior (3.1.2). Na tabela 3.4 apresentamos o resumo dos resultados obtidos nestes ensaios.

Para os três ácidos referidos, e aos mesmos valores de pH, não se verificou a alcalinização dos meios de cultura. No entanto, com a excepção de *D. anomala* no meio com ácido oxálico a pH 6,0, todas as outras leveduras cresceram nos meios testados. A possível utilização dos ácidos ocorreu a uma taxa reduzida, que não permitiu a alcalinização do meio de cultura. A pH 4,0, algumas leveduras apresentavam gotas ligeiramente esverdeadas, facto que indicou uma eventual incorporação do indicador nas células. Estes resultados não permitiram definir um meio específico para separar a levedura *Z. bailii* das restantes espécies.

Tabela 3.4 Resposta de várias leveduras em meios de cultura contendo ácido oxálico, maleico e malónico aos valores de pH de 4,0, 5,5 e 6,0 após 48 horas de incubação a 28°C.

Ox 0,5 Meio mineral com ácido oxálico (0,5%, v/v).
 Mae 0,5 Meio mineral com ácido maleico (0,5%, p/v).
 Mao 0,5 Meio mineral com ácido malónico (0,5%, p/v) .

Estirpe	Ox 0,5			Mae 0,5			Mao 0,5		
	pH 4,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 4,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 4,0	pH 5,5	pH 6,0
<i>Debaryomyces hansenii</i> IGC 2968	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4072	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dekkera anomala</i> IGC 5133	-	-	0	-	-	-	-	-	-
<i>Pichia membranaefaciens</i> IGC 3796	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> IGC 4806	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Torulaspota delbrueckii</i> ISA 1229	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Notas: 0 sem crescimento
- resposta negativa (acidificação ou manutenção do pH do meio)

3.2. Formulação e optimização de um meio de cultura misto com glucose e ácido fórmico como diferencial para *Zygosaccharomyces bailii*

3.2.1 Meio mineral com glucose e ácido fórmico, pH 4,0

Na secção 3.1 apresentámos os resultados obtidos numa primeira fase do trabalho, e que permitiram a selecção de um meio com substratos misto, contendo ácido fórmico e glucose, que à partida parecia específico para a levedura *Zygosaccharomyces bailii*. Assim, das seis leveduras testadas, *Z. bailii* foi a única que provocou a alteração da cor do meio de cultura.

Os resultados apresentados nesta secção, foram os obtidos com 67 estirpes de leveduras, 13 das quais pertencentes à espécie *Z. bailii*. Na constituição da bateria de leveduras teve-se em conta a inclusão de espécies responsáveis pela deterioração de produtos alimentares e de estirpes isoladas de vinhos contaminados. Foram testados diferentes meios com substratos mistos em que se variou a proporção de glucose/ácido numa tentativa de determinar a razão que conduzisse à viragem de cor do indicador no período de tempo mais curto possível pelas estirpes de *Z. bailii*. As estirpes não pertencentes à espécie *Z. bailii* à partida não seriam capazes de alcalinizar o meio, devido ao consumo preferencial de glucose ou incapacidade de metabolização do ácido fórmico, mesmo após um período de incubação prolongado.

Para a realização destes ensaios, as leveduras foram inoculadas em tubos de ensaio largos, contendo meio mineral líquido com glucose e ácido fórmico como fontes de carbono e energia. Os tubos com meio de cultura, após inoculação foram incubados a 30°C, durante um período de tempo que variou entre 24 e 60 horas, e com uma agitação de 160 rpm. Para quantificar a alcalinização durante o período de incubação foi medido, para alguns ensaios, o pH final. Com esta metodologia, a determinação do crescimento foi por vezes difícil de acompanhar, dado que as várias cores das suspensões no final do tempo de incubação interferiram com as leituras da densidade óptica ao comprimento de onda utilizado (640 nm). Assim, o crescimento foi determinado

com uma metodologia “semi-quantitativa”, utilizando a escala de Wickerham (van de Walt e Yarrow, 1984), conforme descrito no ponto 2.6. Esta avaliação permitiu distinguir entre o crescimento intermédio (++) , acentuado (+++) e ausente (+). Nesta fase do trabalho, procurou-se otimizar a composição de um meio de cultura, em que a sua alcalinização rápida foi considerado o aspecto principal, e a quantificação do crescimento constituiu um aspecto secundário.

- **Meios de cultura com 0,1 % de ácido**

Os ensaios cujos resultados são apresentados na tabela 3.5 foram realizados, quer com um meio com substrato simples em que o ácido fórmico (0,1 %, v/v) foi usado como única fonte de carbono e energia, quer em meio com substratos misto em que ao ácido fórmico é adicionado glucose à concentração de 0,1 % (p/v). Foram testadas as 13 estirpes de *Z. baillii* e 54 outras estirpes de leveduras pertencentes a diferentes espécies.

Em oito das estirpes de *Z. baillii*, quando crescidas no meio simples, não se verificou a viragem da cor do indicador. Três estirpes (ISA 1023, IGC 4806 e IGC 4227) alcalinizaram o meio de cultura, e duas outras estirpes mostraram resultados intermédios (ISA 1025 e ISA 1148). O valor de pH máximo (5,9) foi atingido pela estirpe IGC 4806. No meio com substratos misto (ácido fórmico 0,1 %, v/v e glucose 0,1 %, p/v), todas as estirpes testadas induziram alcalinização durante o mesmo período de incubação. Pela análise destes resultados podemos concluir que a adição da glucose ao meio de cultura permitiu um crescimento mais rápido, traduzido numa alcalinização também mais rápida. No entanto, tal como foi verificado no meio simples, existiram diferenças no que respeita aos valores de pH final. Enquanto estirpes de *Z. baillii* como IGC 4806 ou ISA 1214 alcalinizaram o meio até valores de pH elevados (6,5 e 6,4), as outras exibiram uma menor eficiência na alcalinização, atingindo valores de pH mais baixos (5,1, IGC 4267 ou 5,2, IGC T5167). Estas variações poderão estar associados a diferenças nas taxas de consumo dos dois substratos e sua dependência com o pH extracelular. Das restantes espécies testadas, nenhuma evidenciou capacidade de utilização do ácido fórmico como única fonte de carbono e energia.

No entanto, no meio com ácido (0,1%, p/v) e glucose (0,1%, p/v), outras espécies tais como *Z. rouxii* IGC 4194 e ISA 1220, *S. cerevisiae* IGC 4543, *D. hansenii*

INETI CL 18 e *Zygosaccharomyces sp.* ISA 1213, induziram viragem de cor do meio. Neste sentido estas respostas foram consideradas falso positivas.

Tabela 3.5 Resposta de várias espécies em meios de cultura contendo glicose (0,1 %, p/v) e/ou ácido fórmico (0,1%, v/v) a pH 4,0, após 48 horas de incubação a 30°C.

Estirpe		F0,1 (4,0)*		F0,1 G0,1 (4,0)*	
		cor	pH final	cor	pH final
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1206	v	4,1	a	6,2
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4267	v	4,0	a	5,1
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1023	a	5,2	a	6,3
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1025	av	4,7	a	6,5
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1095	v	4,0	a	5,8
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1148	va	4,4	a	6,2
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1212	v	4,2	a	6,1
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1214	v	4,0	a	6,4
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1265	v	4,0	a	6,1
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4806	a	5,9	a	6,5
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4227	a	5,5	a	6,4
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4531	v	4,0	a	6,2
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC T 5167	v	4,0	a	5,2
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	ISA 1213	v	4,0	a	5,8
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	IGC 2899	v	4,0	v	4,0
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC 4194	v	4,0	a	5,0
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA 1220	v	4,0	a	5,6
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	IGC 4169	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 1872-1	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 1872-2	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC T 2608	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 2917	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 3507	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 3507 III	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 3970	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 3977	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4003	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4017	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4022	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4023	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4024	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4072	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4240	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC T 4455	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4543	v	4,0	a	5,7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4891	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 5494	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 5495	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces bayanus</i>	IGC T 4456	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	IGC 4579	v	4,0	v	4,0
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	IGC T 4601	v	4,0	v	4,0
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 2487	v	4,0	v	4,0
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 2582	v	4,0	v	4,0
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 3315	v	4,0	v	4,0
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 3796	v	4,0	v	4,0
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 4475	v	4,0	v	4,0
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 4829	v	4,0	v	4,0
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 4875	v	4,0	v	4,0
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5013	v	4,0	v	4,0
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5015	v	4,0	v	4,0
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5017	v	4,0	v	4,0
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5019	v	4,0	v	4,0
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5122	v	4,0	v	4,0

cont.

Tabela 3.5 Resposta de várias espécies em meios de cultura contendo glucose (0,1 %, p/v) e/ou ácido fórmico (0,1%, v/v) a pH 4,0, após 48 horas de incubação a 30°C.

Estirpe		F0,1 (4,0)*		F0,1 G0,1 (4,0)*	
		cor	pH final	cor	pH final
<i>Pichia anomala</i>	IGC 4121	v	4,0	v	4,0
<i>Dekkera anomala</i>	IGC 5133	v	4,0	v	4,0
<i>Dekkera bruxellensis</i>	IGC 4179	v	4,0	v	4,0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	IGC 2968	v	4,0	v	4,0
<i>Debaryomyces hansenii</i>	INETI CL 18	v	4,0	a	6,4
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC 3806	v	4,0	v	4,0
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IGC 3886	v	4,0	v	4,0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IGC 5166	v	4,0	v	4,0
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	ISA 1229	v	4,0	v	4,0

Notas: v verde
va verde azulado
av azul esverdeado
a azul

* abreviatura do meio de cultura, conforme descrito na tabela 2.3.
resposta falso negativa (*Z. bailii*) ou falso positiva (restantes estirpes).

Com o objectivo de eliminar as respostas falso positivas, aumentou-se a concentração de glucose no meio misto para 0,2 %, 0,5 %, e 1,0 % (p/v) por forma a provocar uma acidificação mais pronunciada, não permitindo viragem do indicador durante o consumo do ácido. Na tabela 3.6 apresentamos os resultados obtidos, para as estirpes seleccionadas. Na mesma tabela, e com o objectivo de permitir uma melhor interpretação, incluímos resultados já apresentados na tabela 3.5

Tabela 3.6 Resposta de várias estirpes em meios de cultura contendo várias concentrações de glucose e ácido fórmico (0,1 %, v/v) a pH 4,0, após 48 horas de incubação a 30°C.

Estirpe		F0,1 G0,1 (4,0)*		F0,1 G0,2 (4,0)*		F0,1 G0,5 (4,0)*		F0,1 G1,0 (4,0)*	
		cor	pH	cor	pH	cor	pH	cor	pH
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1206	a	6,2	a	6,3	a	6,1	a	4,9
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC T5167	a	5,5	a	5,5	a	5,6	v	4,3
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	ISA 1213	a	6,1	a	6,0	a	4,9	a	4,8
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC 4194	a	5,6	a	5,8	a	5,8	a	5,3
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA 1220	a	5,0	a	5,1	a	5,1	a	5,1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4543	a	6,0	a	5,8	v	4,3	v	3,7
<i>Debaryomyces hansenii</i>	INETI CL 18	a	6,2	a	6,2	a	6,0	v	4,2

Notas: v verde
a azul
* abreviatura do meio de cultura, conforme descrito na tabela 2.3.
resposta falso negativa (*Z. bailii*) ou falso positiva (restantes estirpes).

O aumento da concentração de glucose de 0,1 para 1,0 % (p/v) no meio com 0,1% (v/v) de ácido fórmico traduziu-se numa diminuição significativa do pH após 48 horas de incubação. A estirpe *Z. bailii* ISA 1206 conseguiu alcalinizar o meio, enquanto a estirpe tipo IGC T5167 apresentou uma resposta falso negativa para esta concentração de glucose. As restantes três estirpes do género *Zygosaccharomyces* (ISA 1213, 1220 e 4194) no meio misto com 1,0 % (p/v) de glucose, o valor de pH final, após 48 horas de incubação, foi ainda suficientemente elevado para provocar a alcalinização do meio de cultura.

O aumento da concentração de glucose foi uma das estratégias que resolvemos testar com vista a eliminar respostas falso positivas pelas estirpes anteriormente testadas. O aumento da concentração para 0,5 % (p/v) foi suficiente para evitar a alcalinização do meio pela estirpe *S. cerevisiae* IGC 4543. Para a concentração de 1,0 % (p/v) verificou-se a acidificação do meio, devido ao consumo preferencial da glucose. No entanto, *D. hansenii* só foi eliminada como falso-positiva quando a concentração da glucose foi aumentada para 1,0 % (p/v).

Em resumo, os resultados continuaram a não ser satisfatórios dado que, por um lado o aumento da concentração da glucose levou a uma resposta falso negativa para a estirpe *Z. bailii* IGC T5167, e por outro lado não evitou as respostas falso positivas das estirpes *Zygosaccharomyces sp.* ISA 1213, bem como *Z. rouxii* ISA 1220 e IGC 4194.

- **Meios de cultura com 0,2 % de ácido**

Uma vez que o aumento da concentração da glucose no meio de cultura misto, com glucose e ácido fórmico, não se mostrou uma estratégia adequada para poder separar as estirpes de *Z. bailii* das restantes espécies, tentámos manipular a concentração do ácido. Assim, se o consumo de ácido fórmico fosse uma característica específica desta levedura, seria de supor que concentrações mais elevadas deste ácido no meio não afectassem significativamente o seu crescimento. As restantes leveduras seriam inibidas, devido a possíveis efeitos tóxicos provocados pelo ácido fórmico. Os resultados resumidos na tabela 3.7, quer em termos de viragem de cor quer em termos de crescimento, foram obtidos nos meios com 0,2 % (v/v) de ácido fórmico.

Tabela 3.7 Resposta de várias leveduras em meios de cultura contendo glucose (0,5 ou 1,0%, p/v) e ácido fórmico (0,2 %, v/v) a pH 4,0, após 48 horas de incubação, a 30°C.

Estirpe		F0,2 G0,5 (4,0)*		F0,2 G1,0 (4,0)*	
		cor	crescimento	cor	crescimento
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1206	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4267	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1023	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1025	a	+++	v	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1095	va	++	v	++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1148	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1212	v	+++	v	++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1214	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1265	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4806	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4227	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4531	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC T 5167	va	+++	v	+++
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	ISA 1213	v	++	v	++
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	IGC 2899	v	++	v	++
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC 4194	v	+	v	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA 1220	v	+	v	+
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	IGC 4169	v	++	v	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4543	v	+++	v	+++
<i>Debaryomyces hansenii</i>	INETI CL 18	v	+	v	+

Notas: v verde
 va verde azulado
 a azul
 + sem crescimento
 ++ crescimento intermédio
 +++ crescimento acentuado
 * abreviatura do meio de cultura, conforme descrito na tabela 2.3.
 resposta falso negativa (*Z. bailii*) ou falso positiva (restantes estirpes).

O aumento da concentração de ácido fórmico de 0,1 para 0,2 % (v/v) na presença de glucose (0,5 %, p/v), reflectiu-se na ausência de viragem de cor do indicador para azul após 48 horas de incubação pela estirpe ISA 1212. As estirpes de *Z. bailii* ISA 1095 e IGC T5167 mostraram uma resposta intermédia no meio referido, dado que a cor do indicador se mostrou verde azulado. Todas as outras estirpes de *Z. bailii* apresentaram um crescimento acentuado neste meio e uma alcalinização do meio de cultura.

O aumento da concentração de glucose para 1,0 % (p/v), mantendo-se o ácido fórmico à mesma concentração, diminuiu a capacidade de alcalinização do meio por parte das leveduras referidas anteriormente, bem como pela estirpe *Z. bailii* ISA 1025, não permitindo viragem de cor do meio. As restantes estirpes de *Z. bailii* mostraram uma resposta positiva e um bom crescimento no meio misto contendo 1,0 % (p/v) glucose.

As respostas falso negativas para as estirpes de *Z. bailii* nos dois meios testados, poderão ser devidas a dois efeitos, nomeadamente:

- o aumento da concentração de glucose dificulta a alcalinização do meio, como já foi demonstrado para os meios contendo 0,1 % (v/v) de ácido fórmico,
- o ácido fórmico poderá induzir efeitos tóxicos na levedura, que podem levar a uma alcalinização mais lenta nos meios contendo 0,2 % (v/v) de ácido fórmico.

As restantes estirpes do género *Zygosaccharomyces* (ISA 1213, IGC 2988, ISA 1220, IGC 4194 e IGC 4169) não conseguiram alcalinizar os meios testados, e apresentaram um crescimento mais reduzido quando comparado com as estirpes de *Z. bailii*.

As leveduras *S. cerevisiae* IGC 4543 e *D. hansenii* INETI CL 18 crescidas nestas condições não induziram alteração do pH do meio de cultura. *S. cerevisiae* apresentou um crescimento análogo ao da maioria das estirpes de *Z. bailii*; o crescimento de *D. hansenii* foi negativo em ambos os meios de cultura.


Assim, pode ser constatado, que o aumento do ácido fórmico de 0,1 % (v/v) para 0,2 % (v/v) revelou-se como estratégia adequada para eliminar as respostas falso positivas obtidas para concentrações mais baixas de ácido fórmico.

- Meios de cultura com 0,3 % de ácido

Os estudos foram alargados a meios contendo 0,3 % ácido fórmico e 0,5 % glucose com o objectivo de estudar a influência de concentrações mais elevadas de ácido fórmico na capacidade de alcalinização pelas estirpes de *Z. bailii*. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3.8. Nestas condições, obtivemos resultados distintos de acordo com o tempo de incubação das culturas.

Tabela 3.8 Resposta de várias espécies de leveduras em meios de cultura contendo glucose (0,5 %, p/v) e ácido fórmico (0,3 %, v/v) a pH 4,0, após 48 ou 60 horas de incubação a 30°C.

Estirpe			F0,3 G0,5 (4,0)*			
			incubação: 48 horas		incubação: 60 horas	
			cor	crescimento	cor	crescimento
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1206	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	4267	v	+	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1023	v	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1025	v	+	v	+
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1095	v	+	v	++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1148	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1212	v	++	v	++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1214	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1265	v	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	4806	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	4227	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	4531	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	T 5167	v	+	v	++
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	ISA	1213	v	++	v	++
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	IGC	2899	v	+	v	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC	4194	v	+	v	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA	1220	v	++	v	++
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	IGC	4169	v	++	v	++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4543	v	++	v	++
<i>Debaryomyces hansenii</i>	INETI	CL 18	v	+	v	+

Notas: v verde
a azul
+ sem crescimento
++ crescimento intermédio
+++ crescimento acentuado
* abreviatura do meio de cultura, conforme descrito na tabela 2.3.
 resposta falso negativa (*Z. bailii*) ou falso positiva (restantes estirpes).

Assim, e de acordo com a tabela 3.8 verificou-se que, apenas algumas das estirpes de *Z. bailii* alcalinizaram o meio de cultura contendo glucose (0,5 %, p/v) e ácido fórmico (0,3 %, v/v) após 48 horas de incubação. Quando as suspensões celulares foram incubadas por um período adicional de 12 horas, verificou-se que quatro estirpes de *Z. bailii* continuaram a não alcalinizar o meio de cultura. Para as estirpes que responderam de maneira positiva ao fim de 60 horas de incubação verificou-se um crescimento acentuado.

No entanto, constataram-se diferenças em relação ao crescimento das estirpes que mostraram uma resposta negativa. Após 48 horas de incubação, a estirpe *Z. bailii* IGC T5167 não apresentou crescimento, enquanto que a estirpe ISA 1265 cresceu de forma acentuada.

Em termos da capacidade de alcalinização, as estirpes de *Z. bailii* responderam da mesma forma nos meios F0,2 G1,0(4,0) após 48 horas de incubação (conforme tabela 3.7), e no meio F0,3 G0,5(4,0) após 60 horas de incubação (tabela 3.8). Assim, os resultados obtidos são consistentes com a hipótese anteriormente formulada de que o aumento de concentração de ácido está associado a um aumento da toxicidade a nível da célula. Consequentemente, o aumento de concentração de ácido fórmico no meio de cultura traduziu-se num aumento do tempo de incubação necessário para ocorrência de viragem de cor do meio.

As restantes leveduras não pertencentes à espécie *Z. bailii*, não induziram alcalinização do meio de cultura, de modo análogo ao já observado para os meios contendo 0,2 % (v/v) de ácido fórmico (tabela 3.7).

Em resumo, os resultados obtidos com meio contendo 0,1 % (v/v) de ácido fórmico, permitiram identificar um grupo de 5 estirpes (*Zygosaccharomyces sp.* ISA 1213, *Z. rouxii* IGC 4194, ISA 1220, *S. cerevisiae* IGC 4543 e *D. hansenii* INETI CL 18) que conduzem a uma resposta falso positiva neste meio. Numa tentativa de eliminar estas respostas, aumentou-se a concentração de ácido fórmico no referido meio. Em paralelo, registou-se a capacidade de alcalinização das 13 estirpes de *Z. bailii* nestes meios. A tabela 3.9 representa as percentagens de respostas falso negativas (para as 13 estirpes de *Z. bailii*), bem como de respostas falso positivas (para as 5 restantes estirpes), para os diferentes meios de cultura testados.

Tabela 3.9 Percentagem de respostas falso positivas e falso negativas, obtidas em meios de cultura contendo várias concentrações de glucose e ácido fórmico a pH 4,0, após 48 horas de incubação a 30°C.

Meio de cultura	Percentagem de respostas falso-negativas (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>)	Percentagem de respostas falso-positivas *
F0,1 (4,0)	70 %	0 %
F0,1 G0,1 (4,0)	0 %	100 %
F0,1 G0,2 (4,0)	-	100 %
F0,1 G0,5 (4,0)	-	80 %
F0,1 G1,0 (4,0)	-	60 %
F0,2 G0,5 (4,0)	23 %	0 %
F0,2 G1,0 (4,0)	31 %	0 %
F0,3 G0,5 (4,0)	54 %	0 %

Nota: * A percentagem foi determinada relativamente ao número de respostas positivas obtidas no meio F0,1 G0,1(4).

Um meio de cultura selectivo considerado “ideal” deveria ter uma percentagem de respostas falso positivas bem como falso negativas muito reduzida. No caso presente verificou-se que os meios com substratos mistos com baixa concentração de ácido fórmico apresentam uma elevada percentagem de respostas falso positivas, que foram eliminadas com o aumento da concentração do ácido. Este aumento teve como contrapartida um aumento de percentagem de repostas falso negativas. Assim, nesta fase considerámos que o meio de cultura ainda não se revelava satisfatório, pelo que tentámos uma nova abordagem, que será apresentada na secção seguinte.

3.2.2 Meio mineral com glucose e ácido fórmico, pH 4,5

Conforme referimos na secção anterior, os meios de cultura com substratos mistos contendo glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico na concentração de 0,2 e 0,3 % (v/v) a pH 4,0, não foram considerados como meios selectivos adequados para *Z. bailii*. Tendo em conta os dados obtidos na secção anterior, tentámos diminuir a percentagem de respostas falso negativas pela manipulação de um outro parâmetro do meio, ou seja, o pH.

Assim, tomando em consideração o valor de pK (4,7) do indicador verde de bromocresol, uma levedura que cresce num meio de cultura com substrato simples ou misto a pH 4,0, teria de aumentar o valor de pH de 0,7 unidades, para provocar a alcalinização do meio de cultura. Se aumentarmos o pH do meio para 4,5, a alcalinização necessária para provocar a mudança da cor do indicador incorporado no meio de cultura teria que ser apenas de 0,2 unidades de pH. Nestas condições, o tempo de resposta das estirpes de *Z. bailii* deveria diminuir, o que representaria uma situação desejável na utilização de rotina do meio de cultura. Por outro lado, seria de esperar que aquelas estirpes que mostraram resultados falso positivos em ensaios anteriores, também iriam alcalinizar o meio de cultura com maior facilidade, ou seja, num intervalo de tempo reduzido. Para solucionar este problema, testámos novamente várias proporções de ácido fórmico/glucose, em meios de cultura a pH 4,5. Tomámos também em consideração, que as fracções da forma dissociada e não dissociada do ácido fórmico variam com o pH. A título de exemplo, representamos na tabela 3.10 as concentrações da forma dissociada e não dissociada de várias concentrações de ácido fórmico para os valores de pH inicial de 4,0 e 4,5.

Tabela 3.10 Concentração da forma dissociada e não dissociada de várias concentrações do ácido fórmico a pH 4,0 e 4,5.

Concentração (%)	pH 4,0		pH 4,5	
	dissociado (%)	não dissociado (%)	dissociado (%)	não dissociado (%)
0,1	0,063	0,037	0,084	0,016
0,2	0,126	0,074	0,168	0,032
0,3	0,189	0,111	0,252	0,048
0,4	0,252	0,148	0,336	0,064
0,5	0,315	0,185	0,420	0,080

Para uma dada concentração de ácido fórmico, a concentração da forma tóxica do ácido, isto é a forma não dissociada, é mais elevada para valores de pH mais baixos, como se verifica pela análise da tabela 3.10. O meio a pH 4,0, com 0,2 % (v/v) ácido fórmico, contém 0,074 % da forma não dissociada do ácido. Uma concentração similar (0,080 %) é atingida no meio a pH 4,5 mas para uma concentração muito superior do ácido (0,5 %, v/v). Assim, podemos testar concentrações mais elevadas de ácido fórmico em meios a pH 4,5, com o objectivo de definir as condições que permitam uma resposta positiva o mais rápida possível para as estirpes de *Z. bailii*, e uma resposta negativa para as restantes leveduras.

A utilização de tubos de ensaio largos tornou-se pouco praticável, em especial quando se pretendia testar em simultâneo e em replicado um número elevado de leveduras. Esta técnica foi considerada como pouco adequada para uma possível implementação em laboratórios de controlo microbiológico rotineiro. Por este motivo recorreremos nesta parte do trabalho também à utilização de microplacas com 96 poços ou de placas de Petri contendo meio sólido, a inoculação tendo sido efectuada conforme descrito no ponto 2.4.

- **Meios de cultura com 0,1 % de ácido**

As diferentes estirpes de *Z. bailii*, bem como as estirpes consideradas falso positivas na secção anterior, foram inoculadas em tubos de ensaio largos para testar o seu comportamento no meio misto contendo 0,1 % ácido fórmico (v/v) e 0,5 % (p/v) glucose a pH 4,5. Os resultados encontram-se sumariados na tabela 3.11. Verifica-se

que o aumento do pH de 4,0 para 4,5 não se traduziu na detecção de respostas falso negativas, ou seja, todas as estirpes de *Z. bailii* alcalinizaram o meio de cultura após 48 horas de incubação.

Das restantes espécies verificaram-se cinco casos de respostas falso positivas. Destas cinco estirpes, quatro já haviam apresentado resposta positiva no meio a pH 4,0 (*Z. rouxii* ISA 1220 e IGC 4194, *Zygosaccharomyces sp.* ISA 1213 e *D. hansenii* INETI CL 18). Os resultados obtidos de certa forma já eram esperados, dado que no mesmo meio de cultura, a pH 4,0, foram registados, em termos globais, resultados idênticos (tabela 3.6). No entanto, o aumento de pH de 4,0 para 4,5 permitiu que a estirpe IGC 4543 de *S. cerevisiae* se apresentasse como falso positiva no meio a pH mais elevado. Para a eliminação das respostas falso positivas tentámos, por um lado, aumentar a concentração de ácido fórmico e por outro, a concentração de glucose mantendo o pH do meio a 4,5.

Tabela 3.11 Resposta de várias leveduras em meios de cultura contendo glucose (0,5%, p/v) e ácido fórmico (0,1%, v/v) a pH 4,5 (F0,1 G0,5(4,5)) após 48 horas de incubação a 30°C.

Estirpe		F0,1 G0,5 (4,5)	
		cor	crescimento
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1206	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4267	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1023	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1025	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1095	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1148	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1212	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1214	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1265	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4806	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4227	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4531	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC T 5167	a	+++
<i>Zygosaccharomyces sp</i>	ISA 1213	a	++
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	IGC 2899	v	+
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC 4194	a	+++
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA 1220	a	+++
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	IGC 4169	v	+++
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4543	a	+++
<i>Debaryomyces hansenii</i>	INETI CL 18	a	+++

Notas: v verde
a azul
+ sem crescimento
++ crescimento intermédio
+++ crescimento acentuado
resposta falso negativa (*Z. bailii*) ou falso positiva (restantes estirpes).

- **Meios de cultura com 0,2 % de ácido**

Na tabela 3.12 apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios efectuados com ácido fórmico na concentração de 0,2 % (v/v) na presença de 0,5 ou 1,0% (p/v) de glucose, em tubos de ensaio largos.

Tabela 3.12 Resposta de várias leveduras em meios de cultura contendo glucose (0,5 ou 1,0 %, p/v) e ácido fórmico (0,2%, v/v) a pH 4,5 (F0,2 G0,5(4,5) ou F0,2G1,0(4,5)) após 48 horas de incubação a 30°C.

Estirpe		F0,2 G0,5 (4,5)		F0,2 G1,0 (4,5)	
		cor	crescimento	cor	crescimento
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1206	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4267	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1023	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1025	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1095	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1148	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1212	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1214	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1265	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4806	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4227	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4531	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC T 5167	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	ISA 1213	a	++	a	++
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	IGC 2899	v	++	v	++
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC 4194	a	+++	a	+++
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	IGC 4169	v	++	v	++

Notas: v verde
a azul
+ sem crescimento
++ crescimento intermédio
+++ crescimento acentuado
 resposta falso negativa (*Z. bailii*) ou falso positiva (restantes estirpes).

Para todas as estirpes de *Z. bailii*, verificou-se a alcalinização do meio de cultura e o crescimento acentuado após 48 horas de incubação, independentemente da concentração de glucose. Durante o período de incubação comparou-se repetidas vezes o desenvolvimento da cor nos dois meios de cultura, e foi possível registar uma alcalinização mais lenta no meio contendo a concentração mais elevada de glucose (resultados não apresentados). Nos meios de cultura a pH 4,0, este atraso na alcalinização foi também observado (tabela 3.7). A análise comparativa das tabelas 3.7,

que documenta a alcalinização no mesmo meio mas a pH 4,0 (F0,2 G0,5(4,0)) e a tabela 3.12 permite concluir, que o aumento do pH eliminou as respostas falso negativas de algumas estirpes de *Z. bailii* observado nos meios mistos a pH 4,0 para as duas concentrações de glucose (0,5 e 1,0 %, p/v). Tal facto pode ser explicado pela menor diferença entre o valor inicial do pH e o pK do indicador quando comparado com os meios a pH 4,0. No entanto o aumento do pH de 4,0 para 4,5 teve como resultado o aparecimento de respostas falso positivas para as estirpes *Zygosaccharomyces sp.* ISA 1213 e *Z. rouxii* IGC 4194.

Em resumo podemos constatar que as condições experimentais adequadas à obtenção de respostas positivas pelas estirpes de *Z. bailii* durante um período de incubação de 48 horas, continua a estar associada a respostas falso negativas pelas outras espécies. Por outro lado, o aumento de concentração de ácido fórmico de 0,1 para 0,2 % (v/v) não permitiu a eliminação das respostas falso positivas obtidas no meio com menor concentração de ácido fórmico.

- **Meios de cultura com 0,3 % de ácido**

Uma vez que as tentativas de eliminação de respostas falso positivas anteriormente referidas não foram bem sucedidas, resolvemos retomar a possibilidade de utilização de um meio com substrato simples (ácido fórmico), mas agora a pH 4,5.

Os resultados neste meio para as estirpes de *Z. bailii*, bem como para as espécies que se apresentaram como falso positivas nos meios anteriormente testados figuram na tabela 3.13. Neste ensaio utilizaram-se tubos de ensaio largos, e o tempo de incubação foi prolongado para 168 horas (7 dias), dado que após 48 horas de incubação não se verificou a alcalinização do meio para nenhuma das estirpes testadas.

Tabela 3.13 Resposta de várias leveduras no meio de cultura contendo 0,3% (v/v) ácido fórmico a pH 4,5, ao longo de 168 horas de incubação a 30°C.

Estirpe		Tempo de incubação (horas)				
		24 (1 dia)	48 (2 dias)	72 (3 dias)	120 (5 dias)	168 (7 dias)
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1206	v	va	va	av	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4267	v	v	va	av	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1023	v	v	va	av	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1025	v	v	va	av	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1095	v	v	v	v	v
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1148	v	va	av	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1212	v	v	v	v	v
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1214	v	v	v	v	va
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1265	v	va	av	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4806	v	v	av	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4227	v	va	av	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4531	v	v	v	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC T 5167	v	v	v	v	v
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	ISA 1213	v	v	v	v	v
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	IGC 2899	v	v	v	v	v
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA 1220	v	v	v	v	v
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC 4194	v	v	v	v	v
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	IGC 4169	v	v	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4543	v	v	v	v	v
<i>Debaryomyces hansenii</i>	INETI CL 18	v	v	v	v	v

Notas: v verde
a azul
va verde azulado
av azul esverdeado
resposta falso negativa (*Z. bailii*).

Quando o tempo de incubação foi prolongado até um período total de 168 horas (correspondente a uma semana), a maioria das estirpes testadas provocaram alcalinização do meio. No entanto, houve quatro estirpes de *Z. bailii* (ISA 1095, ISA 1212, ISA 1214 e IGC T5167) que responderam de forma negativa, não tendo alterado a cor do indicador no final do tempo de incubação. Previamente, no meio simples com 0,1% (v/v) ácido fórmico a pH 4,0 (tabela 3.5) observaram-se diferenças acentuadas entre as várias estirpes no que diz respeito à eficiência de alcalinização. Com esta abordagem podemos classificar estirpes como “lentas”, (por exemplo *Z. bailii* ISA 1095 ou IGC T5167), ou como “rápidas” (por exemplo *Z. bailii* ISA 1148 e 1265 ou IGC 4806 e 4227).

As restantes espécies apresentaram resultados negativos após 1 semana de incubação, pelo que podemos considerar a concentração de ácido fórmico de 0,3 % (v/v) no meio a pH 4,5 adequada, para evitar respostas falso positivas, mesmo após um período de incubação muito prolongado.

Como já foi mencionado em secções anteriores, no valor inicial de pH 4,5, a alcalinização provocada pela levedura *Z. bailii* deveria ocorrer com maior facilidade. Mesmo assim, várias estirpes de *Z. bailii* apresentaram respostas muito lentas. Tal poderá estar associado à diferente sensibilidade das estirpes de *Z. bailii* ao ácido fórmico. Tendo sido possível seleccionar a concentração do ácido fórmico para a qual não se observou ocorrência de respostas falso positivas havia agora que tentar reduzir o tempo de resposta pelas estirpes de *Z. bailii*. Os resultados apresentados na tabela 3.5, documentam que a adição de 0,1 % de glucose ao meio simples com ácido fórmico, a pH 4,0, acelerou a alcalinização do meio de cultura induzida por *Z. bailii*. Por conseguinte, o meio contendo ácido fórmico a 0,3 % (v/v) foi suplementado com 0,1 % (p/v) de glucose. Os ensaios foram realizados em tubos largos, microplacas (com inóculo fraco, sendo assim a concentração celular nos poços das microplacas idêntica à utilizada nos tubos largos) e em placas de Petri (com aplicação de gotas de suspensões celulares conforme mencionado no ponto 2.4). Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3.14. Nas figuras 3.1 e 3.2 apresentam-se exemplos de respostas positivas e negativas para algumas espécies, obtidos em meio sólido ou em microplacas. Na realização destes ensaios, incluímos 8 estirpes de *Zygosaccharomyces bisporus*.

Tabela 3.14 Resposta de várias leveduras no meio de cultura contendo glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,3 %, v/v) a pH 4,5 (F0,3 G0,1(4,5)), durante 48 horas de incubação a 30°C.


Estirpe		Tubos largos	Microplacas	Placas de Petri
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1206	a	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4267	a	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1023	a	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1025	a	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1095	a	av	v
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1148	a	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1212	a	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1214	a	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1265	a	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4806	a	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4227	a	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4531	a	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC T 5167	a	a	v

cont.

Tabela 3.14 Resposta de várias leveduras no meio de cultura contendo glicose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,3 %, v/v) a pH 4,5 (F0,3 G0,1(4,5)), durante 48 horas de incubação a 30°C.

Estirpe		Tubos largos	Microplacas	Placas de Petri
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC T5335	a	av	av
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC 5336	a	av	av
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC 5337	a	av	a
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC 5381	a	av	a
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC 5382	a	av	a
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC 5383	a	av	a
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC 5384	a	av	a
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC 5385	a	av	a
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	ISA 1213	va	v	v
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	IGC 2899	v	v	v
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC 4194	a	a	a
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA 1220	v	v	v
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	IGC 4169	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 1872-1	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 1872-2	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC T 2608	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 2917	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 3507	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 3507 III	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 3970	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 3977	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4003	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4017	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4022	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4023	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4024	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4072	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4240	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC T 4455	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4543	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4891	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 5494	-	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 5495	-	v	v
<i>Saccharomyces bayanus</i>	IGC T 4456	-	v	v
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	IGC 4579	-	v	v
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	IGC T 4601	-	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 2487	-	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 2582	-	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 3315	-	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 3796	-	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 4475	-	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 4829	-	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 4875	-	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5013	-	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5015	-	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5017	-	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5019	-	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5122	-	v	v
<i>Pichia anomala</i>	IGC 4121	-	v	v
<i>Dekkera anomala</i>	IGC 5133	-	v	v
<i>Dekkera bruxellensis</i>	IGC 4179	-	v	v
<i>Debaryomyces hansenii</i>	IGC 2968	-	v	v
<i>Debaryomyces hansenii</i>	INETI CL 18	v	v	v
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC 3806	-	v	v
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IGC 3886	-	v	v
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IGC 5166	-	v	v
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	ISA 1229	-	v	v

Notas: v verde
va verde azulado
av azul esverdeado
a azul

-  ausência de dados
resposta falso negativa (*Z. bailii*) ou falso positiva (restantes estirpes).

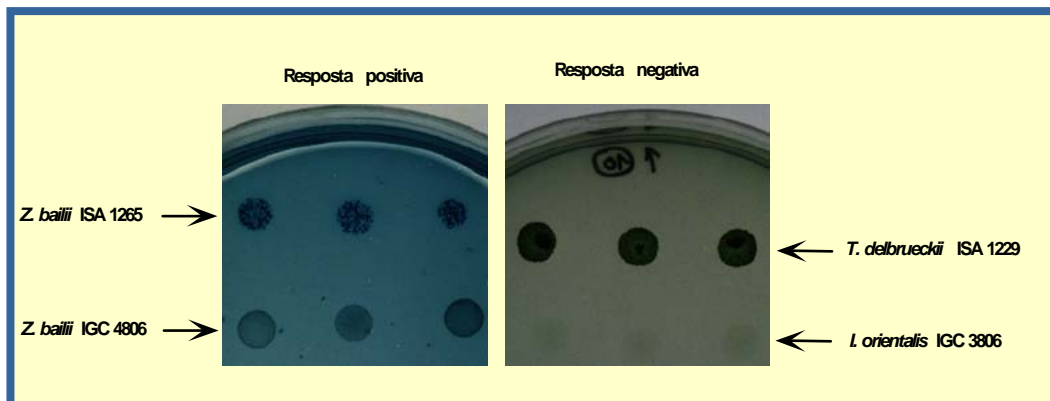


Figura 3.1 Resposta de várias leveduras em meio sólido contendo glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,3 %, v/v) a pH 4,5 (F0,3 G0,1(4,5)), ao fim de 48 horas de incubação a 30°C.

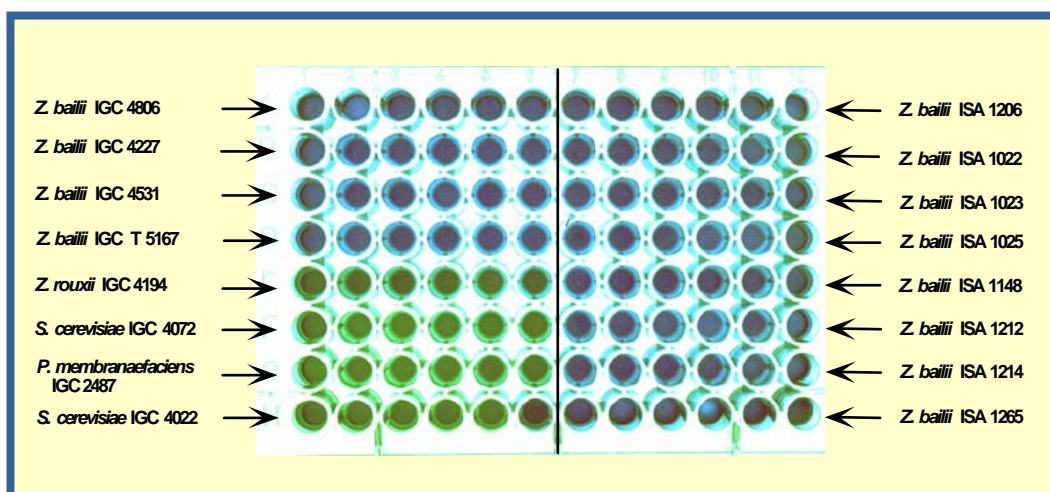


Figura 3.2 Resposta de várias leveduras em meio líquido contendo glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,3 %, v/v) a pH 4,5 (F0,3 G0,1(4,5)), ao fim de 48 horas de incubação a 30°C.

De acordo com a tabela 3.14, todas as estirpes de *Z. bailii* conseguiram alcalinizar o meio líquido a pH 4,5 contendo 0,3 % (v/v) de ácido fórmico e 0,1 % (p/v) de glucose, após 48 horas de incubação a 30°C, e com agitação a 160 rpm. No mesmo meio, mas na sua forma sólida, verificamos para as estirpes *Z. bailii* ISA 1095 e IGC T5167 um atraso no tempo de resposta. Após 48 horas de incubação, com estas duas estirpes, não se observou viragem do indicador, mas ao fim de mais 24 horas observou-

se viragem de cor do meio (resultados não apresentados). Estes resultados são consistentes com os obtidos em meio simples contendo 0,3 % (v/v) ácido fórmico, onde estas duas estirpes foram classificadas como “lentas” relativamente à eficiência de alcalinização.

Todas as estirpes de *Z. bisporus* responderam de forma análoga às estirpes de *Z. baillii*, revelando uma alcalinização do meio de cultura, líquido ou sólido, após 48 horas de incubação. Este resultado, à partida indesejável, não invalidou o meio de cultura, dado que a levedura *Z. bisporus* à semelhança de *Z. baillii* é um agente causador de deterioração alimentar (ver tabela 1.4).

Nenhuma das duas estirpes de *Zygosaccharomyces sp.* provocaram a alcalinização do meio de cultura após 48 horas de incubação. Relativamente às duas estirpes de *Z. rouxii*, verificámos que somente a estirpe ISA 4194 provocou uma resposta falso positiva, para todas as metodologias testadas. A outra estirpe de *Z. rouxii* testada (ISA 1220), respondeu de maneira diferente, não tendo alcalinizado o meio após um período de incubação de 48 horas.

A levedura *S. cerevisiae* IGC 4543, que faz parte do grupo de leveduras descritas anteriormente como falso positivas, não alcalinizou o meio após 48 horas de incubação, independentemente da metodologia de inoculação. Apenas 120 horas após a inoculação foi detectado a mudança da cor do indicador (resultado não apresentado), tanto no meio líquido como no meio sólido. Para a estirpe *D. hansenii* INETI CL 18, que também deu origem a respostas falso positivas em meios anteriormente testados, não verificámos a mudança da cor do meio após 48 horas de incubação, nem ao fim de 120 horas (resultados não apresentados), para as três metodologias aplicadas.

No início desta secção, mencionámos que em todos os ensaios (tubos de ensaio largos ou microplacas) as suspensões celulares apresentavam a mesma concentração. A temperatura de incubação e a velocidade de agitação foram as mesmas. Assim, o factor mais relevante que poderá ter influenciado a eficiência de alcalinização seria a disponibilidade de oxigénio. Os tubos de ensaio largos apresentam à partida melhores condições, dado que apenas 3 cm da altura do tubo são ocupados pela suspensão celular, e os restantes 10-12 cm são ocupados pelo ar. A agitação a 160

rpm permitiu também um arejamento eficiente. Nas microplacas, 250 µl do volume total do poço (300 µl), são ocupados pela suspensão celular, o que parece constituir uma situação menos vantajosa em termos de arejamento. Durante a realização dos ensaios com microplacas, verificámos uma alcalinização ligeiramente mais rápida nos poços marginais, bem como uma ligeira diminuição do volume da suspensão celular quando comparado com os poços em zonas mais interiores da placa. A primeira observação poderá estar relacionada com o facto de, nas zonas marginais da placa, a troca de gases ocorrer com maior facilidade, não sendo limitante para a utilização do ácido. Por outro lado, a viragem mais rápida poderá estar unicamente associada a uma maior evaporação de água nos poços periféricos.

No entanto, a diferente disponibilidade de oxigénio nas metodologias experimentais não afectou os resultados. Contudo permaneceu por esclarecer se a utilização de microplacas com poços mais largos permitiria uma alcalinização mais rápida e uniforme em todos os poços da placa.

No que respeita aos ensaios em meios sólidos verificámos uma grande diversidade nos padrões de crescimento apresentados pelas leveduras. Além das estirpes que viraram a cor do meio de cultura e apresentavam na área da gota uma biomassa de cor azul claro, registámos um elevado número de estirpes que não conseguiram crescer neste meio de cultura. Aquelas estirpes que apresentaram crescimento, mas sem alcalinizar o meio, exibiram na área da gota, biomassa de cor branca ou de cor esverdeada, o que indicava a incorporação do indicador ácido-base pelas células. É de salientar que neste meio, não nos foi possível agrupar estirpes consoante a morfologia das gotas.

Em resumo, verificou-se que no meio de cultura com glucose (0,1 %, p/v) e ácido fórmico (0,3 %, v/v), pH 4,5, as estirpes *Zygosaccharomyces sp.* ISA 1213, *Z. rouxii* ISA 1220, *S. cerevisiae* IGC 4543 e *D. hansenii* INETI CL 18 não induziam alcalinização do meio. Apenas uma estirpe deste grupo (*Z. rouxii* IGC 4194) mostrou uma resposta falso positiva. As estirpes de *Z. bailii* e também *Z. bisporus* alcalinizaram o meio, independentemente da metodologia de inoculação (com a excepção das estirpes “lentas” *Z. bailii* ISA 1095 e IGC T5167) após 48 horas de incubação. Como comentário final, os resultados obtidos sugerem, que o meio de cultura com ácido fórmico (0,3 %,

v/v) e glucose (0,1 %, p/v), a pH 4,5 evidencia-se, entre os meios até agora testados, como o de maior especificidade para a(s) espécie(s) *Z. bailii*/*Z. bisporus*.

- **Meios de cultura com 0,4 % de ácido**

Para avaliar até que ponto os dois efeitos antagônicos - toxicidade do ácido fórmico por um lado, e diminuição do tempo de resposta na presença de glucose por outro lado - podem favorecer a resposta rápida de todas as estirpes de *Z. bailii*, acompanhada da exclusão (com elevada segurança) de estirpes que não pertencem a esta espécie, realizámos ensaios em meios com substratos mistos contendo 0,4 % (v/v) ácido fórmico e 0,1 % de glucose.

Nos ensaios em meios líquidos até agora apresentados, a densidade óptica do meio inoculado no início de cada ensaio era de 0,15, correspondente ao “inóculo fraco”, descrito na secção 2.4. Nas experiências realizadas com meio misto, contendo 0,4 % (v/v) de ácido fórmico e 0,1 % (p/v) de glucose, os poços foram inoculados com um maior volume de suspensão celular (correspondente ao “inóculo forte” descrito na secção 2.3) na expectativa de que o aumento da concentração celular pudesse conduzir a uma alcalinização mais rápida. Nesta fase do trabalho, o conjunto de leveduras foi aumentado para 120 estirpes. Os ensaios foram realizados em microplacas e placas de Petri (aplicação de gotas, conforme descrito em 2.4), e os resultados obtidos apresentam-se na tabela 3.15.

Tabela 3.15 Resposta de várias leveduras no meio de cultura contendo glicose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,4 %, v/v) a pH 4,5 (F0,4 G0,1(4,5)), durante 48 ou 120 horas de incubação a 30°C.

Estirpe		Microplacas		Placas de Petri				
		Cor		Cor		Crescimento	Observações	
		48 h	120 h	48 h	120 h	48 h	48 h	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1206	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	4267	a	a	a	a	1	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1023	a	a	a	a	1	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1024	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1025	a	a	a	a	1	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1031	a	a	a	a	1	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1095	v	a	v	a	3	
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1148	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1212	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1214	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA	1265	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	4806	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	4227	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	4531	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC	T 5167	v	a	v	a	3	
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	T5335	v	a	v	a	1	
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5336	v	a	v	a	1	
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5337	v	a	v	a	1	
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5381	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5382	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5383	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5384	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces bisporus</i>	IGC	5385	a	a	a	a	1	b
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	ISA	1213	v	v	v	v	-	
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	IGC	2899	v	v	v	v	-	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA	1220	v	a	v	a	2	b
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA	1552	v	v	v	v	-	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA	1553	v	v	v	v	2	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC	4194	v	a	v	a	2	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC	3691	v	v	v	v	2	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC	3693	v	v	v	v	2	b
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC	3694	v	v	v	v	2	
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC	3701	v	v	v	v	2	b
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	IGC	4169	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS	1872-1	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS	1872-2	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	T 2608	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	2917	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	3507	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	3507 III	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	3970	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	3977	v	v	v	v	-	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4003	v	v	v	v	2	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4017	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4022	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4023	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4024	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4072	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4237	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4240	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4241	v	v	v	v	2	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	T 4455	v	v	v	v	2	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4543	v	a	v	a	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC	4891	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS	5494	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS	5495	v	v	v	v	2	b

cont.

Tabela 3.15 Resposta de várias leveduras no meio de cultura contendo glicose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,4 %, v/v) a pH 4,5 (F0,4 G0,1(4,5)), durante 48 ou 120 horas de incubação a 30°C.

Estirpe			Microplacas		Placas de Petri			
			Cor		Cor		Crescimento	Observações
			48 h	120 h	48 h	120 h	48 h	48 h
<i>Saccharomyces bayanus</i>	IGC	4565	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces bayanus</i>	IGC	T 4456	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	IGC	4579	v	v	v	v	-	
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	IGC	T 4601	v	v	v	v	-	
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	ISA	1083	v	v	v	v	2	b
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	ISA	1088	v	v	v	v	2	
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	ISA	1089	v	v	v	v	2	b
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ISA	1190	v	v	v	v	2	b
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ISA	1191	v	v	v	v	2	b
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ISA	1192	v	v	v	v	2	
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	ISA	1193	v	v	v	v	2	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	2487	v	v	v	v	2	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	2582	v	v	v	v	1	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	3315	v	v	v	v	3	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	3796	v	v	v	v	-	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	4275	v	v	v	v	3	e
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	4475	v	v	v	v	-	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	4829	v	v	v	v	-	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	4875	v	v	v	v	-	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	5013	v	v	v	v	3	e
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	5015	v	v	v	v	3	e
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	5017	v	v	v	v	3	e
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	5019	v	v	v	v	-	
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC	5122	v	v	v	v	-	
<i>Pichia anomala</i>	IGC	2495	v	v	v	v	3	e
<i>Pichia anomala</i>	IGC	2505	v	v	v	v	3	e
<i>Pichia anomala</i>	IGC	3294	v	v	v	v	3	e
<i>Pichia anomala</i>	IGC	4121	v	v	v	v	3	e
<i>Pichia anomala</i>	IGC	4380	v	v	v	v	3	
<i>Pichia anomala</i>	IGC	4554	v	v	v	v	3	
<i>Pichia anomala</i>	IGC	5008	v	v	v	v	4	
<i>Dekkera anomala</i>	IGC	5133	v	v	v	v	-	
<i>Dekkera anomala</i>	IGC	5160	v	v	v	v	-	
<i>Dekkera anomala</i>	IGC	5161	v	v	v	v	-	
<i>Dekkera bruxellensis</i>	IGC	4179	v	v	v	v	-	
<i>Dekkera bruxellensis</i>	IGC	4801	v	v	v	v	-	
<i>Dekkera bruxellensis</i>	IGC	4808	v	v	v	v	-	
<i>Dekkera bruxellensis</i>	IGC	5162	v	v	v	v	-	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	IGC	2968	v	v	v	v	-	
<i>Debaryomyces hansenii</i>	INETI	CL 18	v	v	v	v	-	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC	2631	v	v	v	v	3	e
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC	3341	v	v	v	v	-	
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC	3806	v	v	v	v	3	e
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC	5041	v	v	v	v	3	e
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC	5044	v	v	v	v	3	e
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC	5046	v	v	v	v	3	e
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IGC	2671	v	v	v	v	-	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IGC	2902	v	v	v	v	-	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IGC	3014	v	v	v	v	-	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IGC	3286	v	v	v	v	-	
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IGC	3886	v	v	v	v	-	
<i>Kloeckera apiculata</i>	ISA	1189	v	v	v	v	-	
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	ISA	1308	v	v	v	v	4	
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	ISA	1421	v	v	v	v	-	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IGC	4791	v	v	v	v	-	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IGC	5166	v	v	v	v	2	

cont.

Tabela 3.15: Resposta de várias leveduras no meio de cultura contendo glicose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,4 %, v/v) a pH 4,5 (F0,4 G0,1(4,5)), durante 48 ou 120 horas de incubação a 30°C.

Estirpe		Microplacas		Placas de Petri			
		Cor		Cor		Crescimento	Observações
		48 h	120 h	48 h	120 h	48 h	48 h
<i>Torulaspóra delbrueckii</i>	ISA 1037	v	v	v	v	2	b
<i>Torulaspóra delbrueckii</i>	IGC T2477	v	v	v	v	-	
<i>Torulaspóra delbrueckii</i>	ISA 1229	v	v	v	v	2	b
<i>Torulaspóra delbrueckii</i>	ISA 1549	v	v	v	v	2	b
<i>Torulaspóra delbrueckii</i>	IGC 4182	v	v	v	v	2	
<i>Torulaspóra delbrueckii</i>	IGC 2916	v	v	v	v	2	b
<i>Torulaspóra delbrueckii</i>	IGC 3209	v	v	v	v	2	

Notas:

- v** verde
 - a** azul
 - sem crescimento
 - 1** biofilme com muita biomassa na área da gota
 - 2** biofilme com pouca biomassa na área da gota
 - 3** 100 a 300 colónias pequenas na área da gota
 - 4** menos do que 10 colónias na área da gota
 - b** relevo à volta da margem da gota
 - e** colónias com aspecto esponjoso na margem
- resposta falso negativa (*Z. bailii*) ou falso positiva (restantes estirpes).

A análise dos resultados obtidos no meio misto contendo 0,4 % (v/v) de ácido fórmico e 0,1 % (p/v) de glicose a pH 4,5 revelou que, com excepção de duas estirpes da levedura *Z. bailii*, todas as outras conseguiram alcalinizar o meio ao fim de 48 horas de incubação, tanto na forma líquida como na forma sólida. Verificámos também um crescimento significativo, dado que a área da gota apresentou um biofilme com muita biomassa. Algumas estirpes apresentavam um relevo à volta da margem da biomassa na área da gota. Apenas duas estirpes de *Z. bailii* (ISA 1095 e IGC T5167), classificadas em ensaios anteriores como estirpes “lentas”, apresentaram menor biomassa após 48 horas de incubação, e começaram a alcalinizar o meio somente após 72 a 96 horas de incubação.

Cinco das oito estirpes de *Z. bisporus* mostraram resposta idêntica às estirpes de *Z. bailii*, alcalinizando o meio de cultura após um período de incubação de 48 horas, e apresentaram igualmente um bom crescimento em meio sólido. As três estirpes que não alcalinizaram o meio de cultura após 48 horas de incubação (*Z. bisporus* IGC

T5335, IGC 5336 e IGC 5337) viraram a cor do indicador quando o tempo de incubação foi prolongado para 120 horas.

As estirpes que em ensaios anteriores se comportaram como falso positivas (*Z. rouxii* IGC 4194 e ISA 1220, *Zygosaccharomyces sp.* ISA 1213, *S.cerevisiae* IGC 4543 e *D. hansenii* INETI CL 18), foram eliminadas como tal após 48 horas de incubação. As duas estirpes de *Z. rouxii* acima referidas e a estirpe de *S. cerevisiae* IGC 4543 começaram a alcalinizar, tanto o meio sólido como o meio líquido, apenas após um período de incubação de 96 a 120 horas.

As restantes leveduras apresentaram respostas negativas tanto no meio líquido como no meio sólido, mesmo para um período de incubação de 120 horas. Nenhuma destas leveduras foi capaz de crescer no presente meio de cultura tão rapidamente como *Z. bailii* e *Z. bisporus*. O crescimento das restantes leveduras no meio sólido ocorreu em forma de um biofilme, mas com pouca biomassa, ou em colónias individualizadas, em conformidade com o descrito nas notas da tabela 3.15. Relativamente à morfologia da biomassa desenvolvida na área da gota podemos distinguir basicamente duas situações. Por um lado, o desenvolvimento de um relevo à volta da gota, como já foi mencionado para o caso de *Z. bailii*, mas que se verificou também para a grande maioria das estirpes de *S. cerevisiae*, e para algumas estirpes de outras espécies. Por outro lado, observámos que algumas estirpes de *I. orientalis*, *P. membranaefaciens* e *P. anomala* conduziam à formação de colónias que apresentaram um aspecto esponjoso na margem. Observámos casos pontuais em que o indicador verde de bromocresol foi aparentemente incorporado nas células, conferindo ao biofilme (ou às colónias) uma cor verde, com tonalidades variáveis consoante a estirpe (resultados não apresentados).

Em resumo, e em comparação com os resultados obtidos no meio misto contendo glucose (0,1 %, p/v) e ácido fórmico (0,3 %, v/v), podemos constatar que o aumento da concentração do ácido fórmico de 0,3 para 0,4 % (v/v) aumentou o tempo de resposta de uma estirpe falso positiva (*Z. rouxii* ISA 4194) observada no meio misto com 0,3 % (v/v) de ácido fórmico. Por outro lado, o aumento da concentração de ácido fórmico provocou também um atraso na resposta positiva por parte das duas estirpes *Z.bailii* ISA 1095 e IGC T5167.

- **Meios de cultura com 0,5 % de ácido**

Por último tentou-se ainda avaliar o efeito do aumento de concentração de ácido fórmico de 0,4 para 0,5 % (v/v) na presença de 0,1 % (p/v) de glucose a pH 4,5, no tempo de resposta. Estes ensaios foram realizados em meio líquido, utilizando microplacas. De forma análoga aos ensaios realizados no meio contendo 0,3 % (v/v) de ácido fórmico, a concentração celular inicial correspondia ao “inóculo fraco”. A tabela 3.16 apresenta os resultados experimentais obtidos no meio com 0,1 % (p/v) de glucose e 0,5 % (v/v) de ácido fórmico.

O aumento de concentração do ácido no meio traduziu-se no aparecimento de mais uma resposta falso negativa ao fim de 48 horas de incubação (*Z. bailii* ISA 1025). As restantes espécies não alcalinizaram o meio de cultura, nem após o tempo de incubação total de 5 dias (120 horas). Assim, os resultados obtidos indicaram novamente que o aumento de concentração de ácido fórmico de 0,4 para 0,5 % (v/v) permitirá, à partida, definir um meio específico para *Z. bailii*. Será, no entanto, necessário avaliar a resposta das estirpes de *Z. bisporus* neste meio. Por último, outro aspecto a ter em conta e que irá ser discutido na secção 3.3, é a avaliação da recuperação das células inoculadas neste meio de cultura.

Tabela 3.16 Resposta de várias leveduras no meio de cultura contendo glicose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,5 %, v/v) a pH 4,5 (F0,5 G0,1(4,5)), durante 48 horas de incubação a 30°C.

Estirpe		Tempo de incubação (horas)		
		24	48	120
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1206	av	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4267	av	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1023	av	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1025	v	v	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1095	v	v	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1148	v	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1212	v	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1214	v	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 1265	a	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4806	av	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4227	av	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC 4531	av	a	a
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	IGC T 5167	v	v	a
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	ISA 1213	v	v	v
<i>Zygosaccharomyces sp.</i>	IGC 2899	v	v	v
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	IGC 4194	v	v	v
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	ISA 1220	v	v	v
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	IGC 4169	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 1872-1	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 1872-2	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC T 2608	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 2917	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 3507	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 3507 III	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 3970	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 3977	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4017	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4022	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4023	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4024	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4072	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC T 4455	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4543	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4891	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 5494	v	v	v
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CBS 5495	v	v	v
<i>Saccharomyces bayanus</i>	IGC T 4456	v	v	v
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	IGC 4579	v	v	v
<i>Saccharomyces pastorianus</i>	IGC T 4601	v	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 2487	v	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 2582	v	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 3796	v	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 4475	v	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 4829	v	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 4875	v	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5013	v	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5017	v	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5019	v	v	v
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 5122	v	v	v
<i>Pichia anomala</i>	IGC 4121	v	v	v
<i>Dekkera anomala</i>	IGC 5133	v	v	v
<i>Dekkera bruxellensis</i>	IGC 4179	v	v	v
<i>Debaryomyces hansenii</i>	IGC 2968	v	v	v
<i>Debaryomyces hansenii</i>	INETI CL 18	v	v	v
<i>Issatchenkia orientalis</i>	IGC 3806	v	v	v
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	IGC 3886	v	v	v
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	IGC 5166	v	v	v
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	ISA 1229	v	v	v

Notas: v verde
av azul esverdeado
a azul
resposta falso negativa (*Z. bailii*).

3.3 Validação do meio de cultura com glucose e ácido fórmico como diferencial para *Zygosaccharomyces bailii*

Na continuação do trabalho anteriormente apresentado, realizámos ainda experiências com a finalidade de, por um lado, validar os meios de cultura desenvolvidos, e, por outro lado, comparar o seu comportamento com meios de cultura já anteriormente descritos para o isolamento selectivo de *Zygosaccharomyces bailii*.

A validação contemplou abordagens quantitativas, que incluíram o espalhamento em placa, a filtração em membrana e a metodologia segundo Miles-Misra (ver 2.4). O número de unidades formadoras de colónias (ufc) desenvolvidos num meio de cultura selectivo/diferencial foi comparado com o valor obtido num meio de cultura geral, seleccionado como meio de referência. Assim a percentagem de recuperação foi calculada relativamente ao meio de referência. Estes ensaios foram realizados com quatro estirpes seleccionadas da bateria inicialmente utilizada, nomeadamente *Z. bailii* IGC 4806, *S. cerevisiae* IGC 4072, *P. membranaefaciens* IGC 2487 e *D. anomala* IGC 5133. Esta escolha teve como critério o facto de se tratarem de espécies mais frequentemente associadas a vinhos contaminados. Realizaram-se ainda ensaios com culturas mistas das estirpes referidas anteriormente, com o objectivo de simular o caso concreto de uma contaminação e de avaliar a recuperação de *Z. bailii* num determinado meio de cultura na presença de outras leveduras. A realização dos ensaios com culturas mistas também nos permitiu estudar a possibilidade de distinguir morfológicamente as várias leveduras nos diferentes meios de cultura.

3.3.1 Selecção do meio de referência mais adequado ao cálculo da percentagem de recuperação de *Zygosaccharomyces bailii*

Uma vez que estão actualmente disponíveis no mercado um elevado número de meios de cultura gerais utilizados no isolamento de leveduras (tabela 1.6), tornou-se necessário comparar as respostas das espécies seleccionadas nesses diferentes meios. Tal comparação permitir-nos-ia identificar o meio de cultura mais adequado para ser utilizado como meio de referência no cálculo da percentagem de recuperação. Em trabalhos publicados respeitantes ao desenvolvimento de meios selectivos para *Z. bailii* e outras leveduras resistentes a conservantes químicos (Makdesi e Beuchat, 1996 a, 1996 b; Hocking, 1996), foram utilizados como meios de referência o meio de extracto de levedura e malte (Yeast Extract Malt Agar, YMA) e o meio de extracto de malte (Malt Extract Agar, MEA), ambos descritos na secção 2.2.1. Com os ensaios descritos nesta secção pretendemos verificar se existiam diferenças de crescimento entre os referidos meios de cultura considerados gerais, para as quatro leveduras seleccionadas. Testámos também o meio WLN, dado que se trata de um meio de cultura geral, vulgarmente utilizado no isolamento de leveduras de vinhos. Os resultados obtidos pela técnica do espalhamento em placa são apresentados na tabela 3.17.

Tabela 3.17 Percentagem de recuperação (%) de quatro estirpes de leveduras, quando inoculadas em meios de cultura comparativamente com a obtida em YEPD após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.

YEPD Meio com extracto de levedura, peptona e glucose.
 YMA Meio de extracto de levedura e malte.
 MEA Meio de extracto de malte.
 WLN "Wallerstein Laboratory Nutrient Agar".

Estirpe		YEPD	YMA	MEA	WLN
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	ISA 4806	100	109	105	103
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	IGC 4072	100	98	91	108
<i>Pichia membranaefaciens</i>	IGC 2487	100	97	110	88
<i>Dekkera anomala</i>	IGC 5133	100	117	113	101

Pela análise dos valores apresentados na tabela 3.17, verificámos que não existem diferenças significativas entre os meios testados e o meio YEPD, pelo que este

último foi seleccionado como meio de referência para o cálculo de percentagem de recuperação nos meios de cultura desenvolvidos no presente trabalho.

3.3.2 Reformulação do meio de cultura contendo glucose e ácido fórmico para efeitos de validação

Os meios de cultura mistos desenvolvidos na secção anterior, baseados no meio mineral, contendo glucose e/ou ácido fórmico em várias proporções, poderão ter algumas limitações na sua utilização de rotina no âmbito de análises de controlo microbiológico. Com efeito, a necessidade de adicionar soluções de vitaminas e oligoelementos, por exemplo, é inconveniente, dado que pode traduzir-se numa diminuição do tempo de armazenamento do meio preparado. Assim, será desejável dispôr de um meio de cultura que se mantenha estável sob a forma desidratada, ao qual será apenas necessário adicionar o ácido fórmico e a glucose na concentração adequada.

Para tal, tentámos tirar partido de informação existente em diferentes trabalhos publicados recentemente (Makdesi e Beuchat, 1996 a, 1996 b) respeitantes à optimização de meios de cultura para *Z. bailii*. Estes autores utilizaram um meio de cultura que designaremos como meio rico, suplementado com ácido acético como agente selectivo, em concentrações variáveis. Uma outra estratégia utilizada por aqueles autores para aumentar a selectividade do meio, consistiu na substituição da glucose do meio rico pela frutose, uma vez que *Z. bailii* é uma levedura fructofílica. Assim, e com o objectivo de adaptar a preparação do meio com glucose e ácido fórmico à sua utilização prática no controlo microbiológico, testámos meios à base de extracto de malte e ácido fórmico. Estes meios com valor de pH inicial de 4,5 após autoclavagem, foram suplementados com ácido fórmico (pH 4,5), nas concentrações adequadas (0,3% ou 0,4% v/v). Com o objectivo de aumentar a selectividade, adicionámos aos referidos meios cicloheximida à concentração de 0,0004% (p/v), conforme descrito no ponto 2.2.2. O meio de extracto de malte a pH 4,5 (2.2.1) foi utilizado como controlo.

Paralelamente e com o objectivo de termos uma base de comparação, testámos o comportamento dos meios propostos por Makdesi e Beuchat (1996 a, 1996 b) e Hocking (1996) para as quatro leveduras seleccionadas.

A percentagem de recuperação nos diferentes meios foi calculada a partir dos resultados obtidos pela técnica do espalhamento em placa, utilizando o meio YEPD como referência (tabela 3.18 e figura 3.3).

Tabela 3.18 Percentagem de recuperação (%) de alguns meios de cultura em comparação com o meio YEPD após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.

- TGYAC Meio de triptona com glucose, extracto de levedura e ácido acético (0,3%, v/v).
- TFYAC Meio de triptona com frutose, extracto de levedura e ácido acético (0,3%, v/v).
- TGYA Meio de triptona com glucose, extracto de levedura e ácido acético (0,5%, v/v).
- MEAA Meio de extracto de malte com ácido acético (0,5%, v/v).
- MEA4,5 Meio de extracto de malte a pH 4,5.
- MF0,3 Meio de extracto de malte com ácido fórmico (0,3%, v/v).
- MF0,3A Meio de extracto de malte com ácido fórmico (0,3%, v/v) e cicloheximida.
- MF0,4 Meio de extracto de malte com ácido fórmico (0,4%, v/v).
- MF0,4A Meio de extracto de malte com ácido fórmico (0,4%, v/v) e cicloheximida.

Estirpe	TGYAC	TFYAC	TGYA	MEAA	MEA4,5	MF0,3	MF0,3A	MF0,4	MF0,4A
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> IGC 4806	95	82	130	108	104	82	68	77	9,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IGC 4072	64	73	10	<0,2	84	10	<0,002	0,47	<0,002
<i>Pichia membranaefaciens</i> IGC 2487	77	55	6	3	105	2,0	<0,005	0,04	<0,005
<i>Dekkera anomala</i> IGC 5133	<0,2	<0,2	<0,2	<0,2	115	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002

Nota: As áreas sombreadas indicam resultados que se distinguem de modo significativo ($p \leq 0,05$) dos valores obtidos no meio de referência.

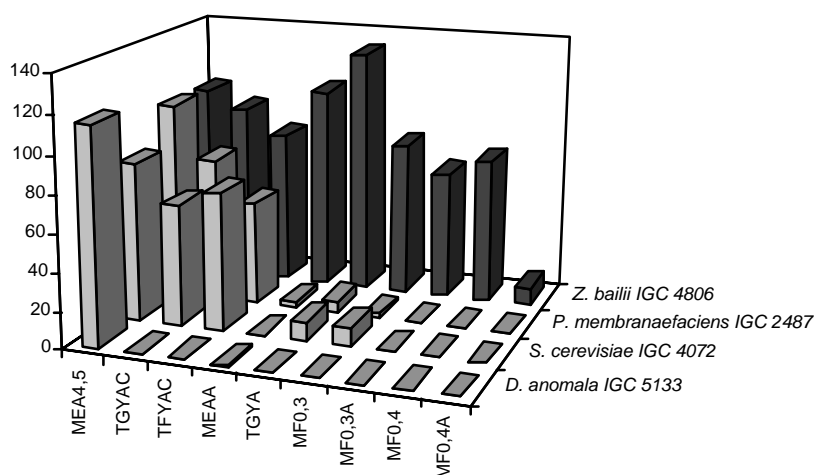


Figura 3.3 Percentagem de recuperação (%) das espécies testadas em diferentes meios de cultura utilizando o meio YEPD como meio de referência após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.

Os meios de cultura contendo ácido acético à concentração de 0,3% (v/v) (TGYAC e TFYAC) permitiram a percentagem de recuperação para *Z. bailii* similar à obtida em meio YEPD. Ambos os meios não demonstraram a selectividade desejada, uma vez que 50 a 70 % das células de *S. cerevisiae* IGC 4072 e *P. membranaefaciens* IGC 2487 foram igualmente recuperadas nestes meios. Estes valores vêm confirmar os resultados de Makdesi e Beuchat (1996 b), que referiram que os dois meios não possuem a capacidade adequada de inibir o crescimento de outras leveduras. Das estirpes testadas, apenas a levedura *D. anomala* IGC 5133 não cresceu nestes meios de cultura. A substituição da glucose (no meio TGYAC) pela fructose (meio TFYAC) não parece ter conduzido a um aumento da selectividade.

O aumento da concentração de ácido acético para 0,5% (v/v) (meio TGYA) diminuiu de modo significativo a percentagem de recuperação das duas estirpes *S. cerevisiae* IGC 4072 e *P. membranaefaciens* IGC 2487, para 10% e 6%, respectivamente. Neste meio, a percentagem de recuperação de *Z. bailii* IGC 4806 foi da mesma ordem de grandeza que a observada no meio de referência. A levedura *D. anomala* IGC 5133, pelo contrário, não cresceu no presente meio de cultura. A selectividade mais elevada deste meio estará aparentemente associada à concentração mais elevada de ácido acético.

O meio de extracto de malte suplementado com 0,5% (v/v) de ácido acético (MEAA) apresentou a selectividade mais elevada em comparação com o meio TGYA. As estirpes *S. cerevisiae* IGC 4072 e *D. anomala* IGC 5133 não cresceram neste meio de cultura, e a recuperação de *P. membranaefaciens* IGC 2487 foi reduzida para 3%. A percentagem de recuperação de *Z. bailii* IGC 4806 neste meio não apresentou valores significativamente distintos dos observados no meio YEPD.

No meio de extracto de malte a pH 4,5 (MEA4,5), todas as estirpes testadas cresceram sem diferenças significativas em comparação com o meio YEPD. A adição de ácido fórmico à concentração de 0,3% (v/v) diminuiu significativamente a percentagem de recuperação das leveduras *S. cerevisiae* IGC 4072, *P. membranaefaciens* IGC 2487 e *D. anomala* IGC 5133, enquanto que a estirpe *Z. bailii* IGC 4806 não foi significativamente inibida por esta concentração de ácido fórmico.

O aumento da concentração de ácido fórmico para 0,4% (v/v) no meio MF0,4 baixou a recuperação da levedura *Z. bailii* IGC 4806 para 77%, sendo significativamente distinta do meio de referência. Para as restantes três estirpes verificou-se um crescimento muito reduzido, e uma percentagem de recuperação inferior a 1%.

Quando os meios contendo 0,3% ou 0,4% (v/v) de ácido fórmico foram suplementados com 0,0004% (p/v) de cicloheximida (MF0,3A e MF0,4A), não verificámos crescimento das leveduras *S. cerevisiae* IGC 4072, *P. membranaefaciens* IGC 2487 e *D. anomala* IGC 5133. Estas condições experimentais reduziram significativamente a percentagem de recuperação da estirpe *Z. bailii* IGC 4806 para 68% no meio MF0,3A e 9,5% no meio MF0,4A.

Resumindo, para os meios de cultura apresentados nesta secção podémos constatar o seguinte, no que respeita à sua capacidade de recuperação selectiva de *Z. bailii*:

- Os meios TGYAC e TFYAC não possuem a selectividade pretendida, em concordância com os resultados de Makdesi e Beuchat (1996 b).
- Três (MF0,3A, MF0,4 e MF0,4A) dos quatro meios com extracto de malte e ácido fórmico apresentaram uma selectividade elevada. No entanto, apesar de terem reprimido o crescimento das espécies *S. cerevisiae*, *P. membranaefaciens* e *D. anomala*, não se afiguram como meios selectivos adequados para a levedura *Z. bailii*, dado que a percentagem de recuperação desta espécie é reduzida.
- Podémos considerar os meios TGYA, MEAA e MF0,3 como meios adequados para o isolamento selectivo de *Z. bailii*. Constatamos a existência de diferenças entre estes três meios relativamente à percentagem de recuperação para *Z. bailii*, não sendo no entanto significativamente distintas do meio de referência (YEPD). Dos três meios acima referidos, o meio MEAA revelou-se o mais eficiente na inibição do crescimento de *S. cerevisiae*, enquanto que o meio MF0,3 apresentou maior capacidade de inibição de *P. membranaefaciens* e *D. anomala*.

3.3.3 Ensaio de validação do meio desenvolvido e comparação com outros descritos na literatura para *Zygosaccharomyces bailii*

Nesta parte do trabalho serão apresentados resultados de ensaios de validação de alguns meios já anteriormente testados em forma líquida (ponto 3.2), nomeadamente os meios com substratos mistos (com base no meio mineral) contendo 0,1% (p/v) de glucose, e ácido fórmico em concentrações de 0,2, 0,3, 0,4 e 0,5% (v/v), pH 4,5. O meio YEPD foi utilizado como meio de referência, de modo análogo aos ensaios apresentados nos pontos anteriores. Neste grupo de ensaios testámos também o meio ZBA (*Zygosaccharomyces bailii* selective medium) descrito por Erickson (1993), para efeitos comparativos com o meio desenvolvido neste trabalho.

Na realização de análises microbiológicas de alimentos torna-se necessário a escolha da metodologia mais adequada, em conformidade com o grau de contaminação esperado do produto a analisar, mas também com a consistência do próprio produto. Por este motivo optámos por testar o meio aplicando as seguintes metodologias:

- O espalhamento em placa, que figura entre as técnicas mais frequentemente utilizadas, e que é indicada na análise de alimentos e bebidas com elevado número de microrganismos;
- O método segundo Miles-Misra, é indicado quando se pretende obter uma estimativa da carga microbiana. A vantagem desta metodologia consiste por um lado, na economia de tempo de trabalho, dado que gotas da amostra (ou de respectivas diluições) são aplicadas na superfície do meio sem serem espalhadas, e por outro lado, o gasto de material é reduzido, dado que 4 diluições podem ser aplicadas numa única placa de Petri. Por vezes podem surgir dificuldades na contagem das colónias, devido à área inoculada ser de tamanho reduzido.
- A filtração em membrana, que pode ser considerada como método ideal para amostras líquidas, como por exemplo vinhos. A vantagem deste método consiste em permitir a análise de grandes volumes de amostra, desde que

esta não apresente sólidos em suspensão, que podem conduzir à colmatação dos poros do filtro. Uma outra vantagem consiste no facto de que, pela filtração, podem ser removidos possíveis compostos inibitórios contidos na amostra.

O controlo microbiológico dos vinhos será possivelmente o sector mais relevante em termos de aplicação prática do(s) meio(s) de cultura desenvolvido(s) neste trabalho. Por este motivo, os ensaios foram maioritariamente realizados pela técnica da filtração em membrana, comparativamente com os realizados por espalhamento em placa e segundo a metodologia de Miles-Misra. Estas duas últimas metodologias deverão ser consideradas como complemento.

Escolhemos as mesmas estirpes utilizadas nos pontos anteriores para a realização dos ensaios (*Z. baillii* IGC 4806, *S. cerevisiae* IGC 4072, *P. membranaefaciens* IGC 2487 e *D. anomala* IGC 5133). De acordo com o já referido anteriormente, nos vinhos contaminados, a principal espécie contaminante *Z. baillii* encontra-se frequentemente associada a outras leveduras. Por este motivo, e na tentativa de simular o caso concreto de um vinho contaminado, preparámos misturas de várias estirpes em proporções iguais.

- **Filtração em membrana**

Na tabela 3.20 e na figura 3.4 apresentamos os valores obtidos de percentagem de recuperação das culturas puras e mistas pela metodologia da filtração em membrana.

Tabela 3.20 Percentagem de recuperação (%) obtida pela metodologia de filtração em membrana para alguns meios de cultura com substratos mistos e do meio “*Zygosaccharomyces bailii* selective medium” (ZBA, composição conforme descrito na secção 2.2.2) em comparação com o meio YEPD após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.

F0,2 G0,1(4,5) Meio mineral com glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,2%, v/v) a pH 4,5
 F0,3 G0,1(4,5) Meio mineral com glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,3%, v/v) a pH 4,5
 F0,4 G0,1(4,5) Meio mineral com glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,4%, v/v) a pH 4,5
 F0,5 G0,1(4,5) Meio mineral com glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,5%, v/v) a pH 4,5

Estirpe	Meio de cultura				
	ZBA	F0,2G0,1 (4,5)	F0,3G0,1 (4,5)	F0,4G0,1 (4,5)	F0,5G0,1 (4,5)
Zb IGC 4806	72	82	78	65	42
Zb IGC 4806 + Sc IGC 4072	77	82	81	57	35
Zb IGC 4806 + Pm IGC 2487 + Da IGC 5133	82	99	94	67	34
<i>S. cerevisiae</i> IGC 4072	6	30	4	< 0,002	< 0,002
<i>P. membranaefaciens</i> IGC 2487	< 0,004	55	5,9	0,011	< 0,004
<i>D. anomala</i> IGC 5133	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004	< 0,004

Notas: Zb *Zygosaccharomyces bailii*
 Sc *Saccharomyces cerevisiae*
 Pm *Pichia membranaefaciens*
 Da *Dekkera anomala*

As áreas sombreadas indicam resultados que se distinguem de modo significativo ($p \leq 0,05$) dos valores obtidos no meio de referência.

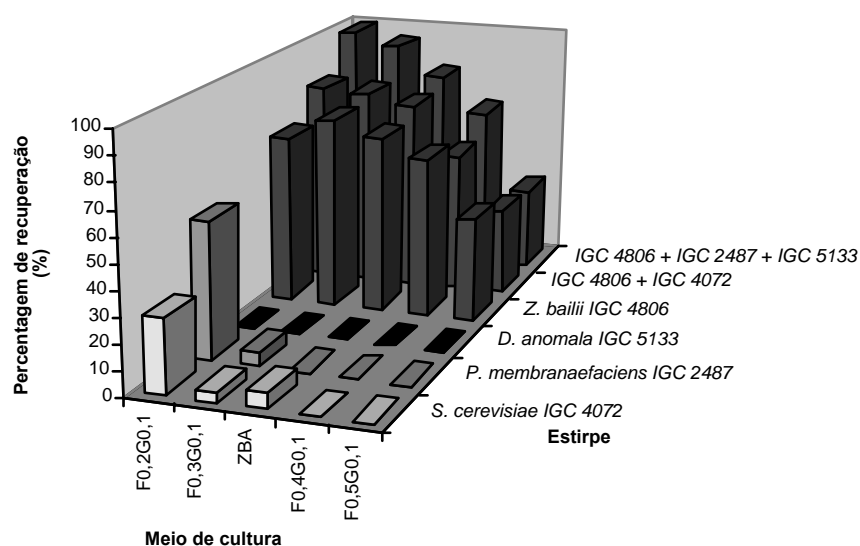


Figura 3.4: Percentagem de recuperação (%) obtida pela metodologia de filtração em membrana para alguns meios de cultura com substratos mistos e do meio “*Zygosaccharomyces bailii* selective medium” (ZBA, composição conforme descrito na secção 2.2.2) após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.

Ensaio com culturas puras

Nos meios de cultura com substratos mistos, a percentagem de recuperação da levedura *Z. bailii* IGC 4806 (em cultura pura) diminuiu com o aumento da concentração de ácido fórmico no meio, de 82% no meio F0,2 G0,1(4,5) para 42% no meio F0,5 G0,1(4,5). Este decréscimo da percentagem da recuperação com concentrações crescentes de ácido fórmico deverá ser devido a um aumento da toxicidade do ácido. No entanto, apenas para o meio misto contendo 0,5 % (v/v) ácido fórmico, verificámos uma diferença significativa em comparação com os valores obtidos no meio de referência. No meio ZBA, 72% das células crescidas no meio de referência foram recuperadas, e este valor é comparável aos 78% de células recuperadas no meio F0,3 G0,1(4,5). Neste meio de cultura, após 96 horas de incubação, as células de *Z. bailii* IGC 4806 formaram colónias azuis, devido à alcalinização do meio de cultura, e incorporação do indicador na biomassa celular. As colónias apresentaram um diâmetro aproximado de 1 mm, conforme ilustrado na figura 3.5 A. A cor do meio de cultura foi alterada para azul, que não pode ser visualizado nesta figura, dado que o meio se encontra coberto pela membrana filtrante. No meio ZBA, o tamanho das colónias foi 2 a 3 vezes maior, e ao longo do tempo de incubação, a superfície das colónias, inicialmente lisa, formou estruturas características, que são apresentadas na figura 3.5 B.

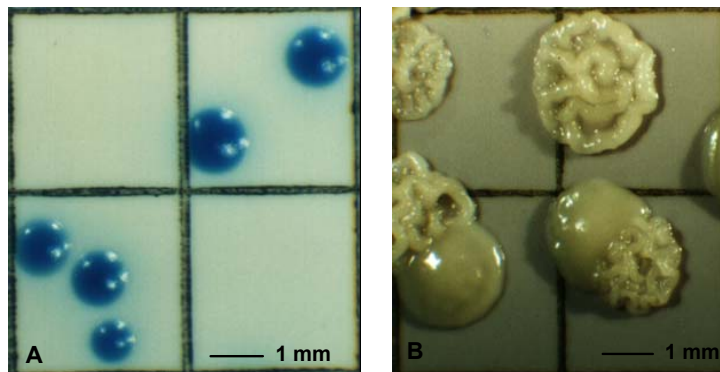


Figura 3.5 Morfologia de colónias da levedura *Zygosaccharomyces bailii* IGC 4806 nos meios de cultura pela metodologia de filtração em membrana, após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.
A Meio com substratos mistos com 0,3% (v/v) de ácido fórmico e 0,1% (p/v) de glucose a pH 4,5 (F0,3 G0,1(4,5)) e
B "*Zygosaccharomyces bailii* selective medium" (ZBA, composição conforme descrito na secção 2.2.2)

A levedura *S. cerevisiae* IGC 4072 exibiu percentagens de recuperação significativamente mais baixas nos meios testados comparativamente com o meio de referência. Cerca de 1/3 das células crescidas no meio de referência, foram recuperadas no meio misto com 0,2% (v/v) de ácido fórmico. Quando a concentração de ácido foi aumentada para 0,3% (v/v), a recuperação diminuiu para 4%, comparável ao valor observado no meio ZBA (6%). Nos meios contendo 0,4 ou 0,5% (v/v) de ácido fórmico, não se verificou crescimento. A morfologia das células crescidas tanto no meio F0,2 G0,1(4,5) como no meio ZBA era muito heterogénea, como se pode verificar na figura 3.6. Em ambos os meios, o tamanho das colónias variava entre 0,2 e 1,0 mm, variando também a cor das colónias. No meio misto contendo 0,2% de ácido fórmico observaram-se colónias brancas, mas também colónias com tonalidades variadas de verde, o que indicava que o indicador verde de bromocresol parece ser incorporado na biomassa, não tendo ocorrido no entanto, alteração do pH inicial (4,5) do meio. No meio ZBA observámos colónias com tonalidades diferentes de roxo acastanhado, que representa a cor do meio de cultura.

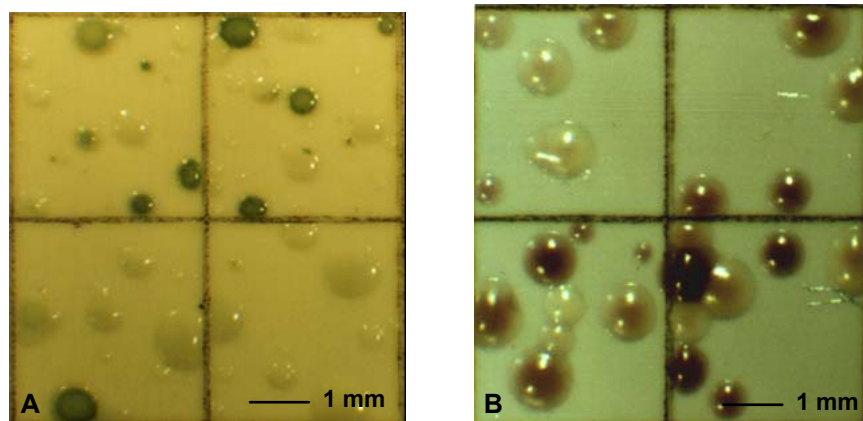


Figura 3.6 Morfologia de colónias da levedura *Saccharomyces cerevisiae* IGC 4072 nos meios de cultura pela metodologia de filtração em membrana, após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.
A Meio com substratos misto com 0,2% (v/v) de ácido fórmico e 0,1% (p/v) de glucose a pH 4,5 (F0,2 G0,1(4,5)) e
B "*Zygosaccharomyces bailii* selective medium" (ZBA, composição conforme descrito na secção 2.2.2)

Cerca 50% das células da estirpe *P. membranaefaciens* IGC 2487 recuperaram no meio com substratos misto contendo 0,2% (v/v) de ácido fórmico. O aumento da concentração do ácido para 0,3 e 0,4% (v/v) reduziu a percentagem de recuperação para 5,9 e 0,011%, respectivamente. Assim, esta estirpe possui aparentemente uma resistência ligeiramente maior ao ácido fórmico comparativamente com a levedura *S. cerevisiae* 4072. No entanto, não verificámos crescimento no meio ZBA, bem como no meio misto contendo 0,5% (v/v) de ácido. As colónias que foram possíveis observar no meio F0,2 G0,1(4,5) (representadas na figura 3.7) mostraram uma cor verde muito intensa, e um tamanho de cerca de 1 mm. Por vezes observámos colónias com o centro verde escuro, rodeado de uma zona marginal mais clara (resultados não apresentados).

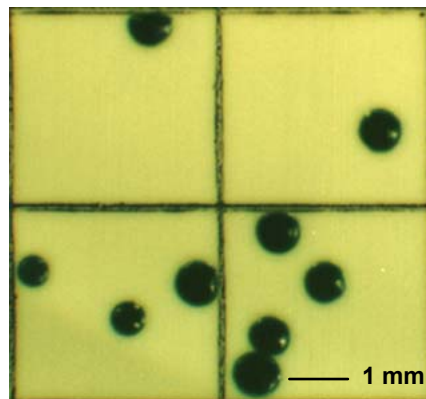


Figura 3.7 Morfologia de colónias da levedura *Pichia membranaefaciens* IGC 2487 no meio com substratos misto com 0,2% (v/v) de ácido fórmico e 0,1% de glucose (p/v) a pH 4,5 (F0,2 G0,1(4,5)) pela metodologia de filtração em membrana, após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.

A estirpe *D. anomala* IGC 5133 não cresceu em qualquer dos meios selectivos para *Z. bailii*.

Ensaio com culturas mistas

Nos ensaios realizados com culturas mistas em proporções iguais das diferentes espécies (*Z. bailii* IGC 4806 + *S. cerevisiae* IGC 4072 ou *Z. bailii* IGC 4806 + *P. membranaefaciens* IGC 2487 + *D. anomala* IGC 5133) foi possível distinguir

morfologicamente a levedura *Z. bailii* IGC 4806 da(s) restante(s) espécie(s). Assim, os valores mencionados na tabela 3.20 reflectem apenas a recuperação da estirpe *Z. bailii* IGC 4806. Pela análise desta tabela podemos constatar que as percentagens de recuperação obtidas em culturas mistas são semelhantes aos valores verificados para a estirpe *Z. bailii* IGC 4806 em cultura pura. Assim, a presença de outras leveduras, nas proporções testadas, não pareceu influenciar a percentagem de recuperação.

O meio de cultura F0,2 G0,1(4,5) permitiu distinguir, com elevada segurança, entre as colónias de *Z. bailii* IGC 4806 e *S. cerevisiae* IGC 4072, como se verifica na figura 3.8. Enquanto que a estirpe *Z. bailii* IGC 4806 apresentava colónias de cor azul, as colónias formadas por *S. cerevisiae* eram predominantemente brancas, às vezes com um ligeiro tom azulado. Este tipo de colónias "intermédias", apresentando uma zona central com uma tonalidade mais intensa, representava somente 1 a 2 % do número total de colónias.

Com o objectivo de aumentar a selectividade, os meios mistos foram suplementados com cicloheximida na concentração de 0,0004% (p/v). Verificámos uma percentagem de recuperação significativamente mais baixa quando comparado com o meio de referência, sendo 48% para o meio misto com 0,2% (v/v) ácido fórmico, e 24% para o meio contendo 0,3% ácido fórmico (resultados não apresentados). No entanto, no meio de extracto de malte com a mesma concentração de ácido (0,3 %, v/v), a percentagem de recuperação foi de 68 %. Tal poderá estar associado ao facto de se tratar de um meio rico.

A selectividade do meio contendo glucose (0,1 %, p/v) e ácido fórmico (0,2 %, v/v) foi consideravelmente melhorada pelo aumento da concentração do ácido para 0,4 % (v/v). Este aumento não se traduziu numa diminuição da percentagem de recuperação significativamente diferente ($p < 0,05$) da obtida para o meio de referência (tabela 3.20) para a levedura *Z. bailii*.

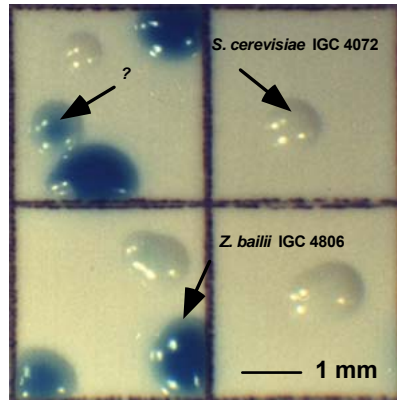


Figura 3.8 Morfologia de colônias das leveduras *Zygosaccharomyces bailii* IGC 4806 e *Saccharomyces cerevisiae* IGC 4072 no meio com substratos mistos com 0,2% (v/v) de ácido fórmico e 0,1% de glucose (p/v) a pH 4,5 (F0,2 G0,1(4,5)) pela metodologia de filtração em membrana, após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.

Quando as culturas mistas de *Z. bailii* IGC 4806 e *P. membranaefaciens* IGC 2487 foram crescidas no meio de cultura misto contendo ácido fórmico na concentração de 0,2% (v/v), as células de *Z. bailii* formaram colônias de cor azul (figura 3.9), de modo idêntico ao observado para o caso de cultura pura (figura 3.5 A). A levedura *P. membranaefaciens* IGC 2487 no entanto, apresentava nestas circunstâncias colônias de cor azul escuro intenso. Em cultura pura, esta levedura deu origem a colônias verdes (figura 3.7). Aparentemente, esta estirpe, sem ter alcalinizado o meio, apenas incorporou o indicador do meio de cultura, cuja cor virou para azul devido à alcalinização provocada por *Z. bailii*. Mesmo assim, a figura 3.9 mostra, que as referidas espécies poderam ser facilmente distinguidas pela sua morfologia no que respeita à cor e ao tamanho das colônias.

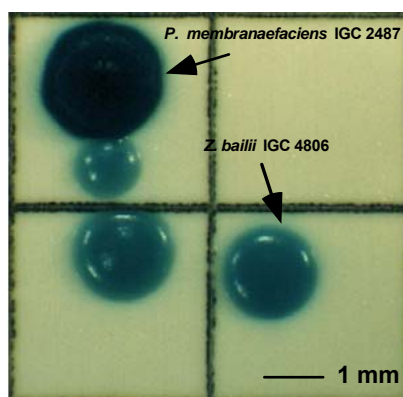


Figura 3.9 Morfologia de colónias da levedura *Zygosaccharomyces bailii* IGC 4806 e *Pichia membranaefaciens* IGC 2487 no meio com substratos mistos com 0,2% (v/v) de ácido fórmico e 0,1% de glucose (p/v) a pH 4,5 (F0,2 G0,1(4,5)) pela metodologia de filtração em membrana, após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.

Erickson (1993), em ensaios realizados pela metodologia da filtração em membrana também obteve percentagens de recuperação no meio ZBA para estirpes de *Z. bailii* muito próximos do meio de referência. A percentagem de recuperação obtida por este autor poderá ser explicada pelo facto de as três estirpes de *Z. bailii* por ele testadas, serem provenientes de alimentos acidificados. Assim, as referidas estirpes estariam à partida adaptadas a meios acidificados, crescendo muito bem no meio ZBA, que contém ácido acético.

Os resultados obtidos nesta parte do trabalho confirmaram os resultados de Makdesi e Beuchat (1996 a, 1996 b), pois não detectaram diferenças significativas entre a recuperação de células de *Z. bailii* num meio de cultura geral e no meio ZBA. A recuperação de várias estirpes de *Z. bailii* inoculadas, em diferentes alimentos, variou consoante o alimento inoculado, e também consoante o meio de cultura utilizado. No caso dos vinhos por exemplo, houve estirpes que apresentaram no meio ZBA uma percentagem de recuperação de 100%, mas outras apenas de 75%. Por outro lado, em ensaios com células de *Z. bailii*, que foram sujeitas ao “stress” térmico, a recuperação baixou significativamente. Para o isolamento de células que sofreram condições de “stress”, os autores sugerem a utilização do meio TGYAC, que evidenciou uma percentagem de recuperação (100%) significativamente superior ao meio ZBA, apesar do meio TGYAC não possuir a selectividade desejada. Estes autores recomendam ainda

a optimização de um meio de cultura que seja capaz de recuperar tanto células não afectadas de *Z. bailii*, como células sujeitas a “stress”, inibindo ao mesmo tempo e de modo eficiente o crescimento de outras leveduras.

Em termos globais, os resultados obtidos nesta secção sugerem, que nos meios de cultura com substratos mistos contendo ácido fórmico à concentração de 0,2, 0,3 ou 0,4 % (v/v) a percentagem de recuperação de *Z. bailii* IGC 4806 não foi significativamente diferente da obtida no meio ZBA, utilizando a metodologia da filtração em membrana. Estes meios de cultura actuaram de forma selectiva, dado que inibiram em medidas diferentes o crescimento das restantes leveduras testadas. Por outro lado, evidenciaram-se como meios diferenciais, dado que permitiram a distinção de leveduras acompanhantes tanto pela morfologia, como pela cor das colónias. No entanto, o meio ZBA não possibilitou a sua distinção pela cor. Erickson (1993) faz apenas referência que outras leveduras recuperadas no meio ZBA, como por exemplo *Hansenula anomala*, *Hansenula mrakii*, *P. membranaefaciens* e *Pichia terricola* foram distinguidas pela morfologia das colónias. É de conhecimento geral que a identificação de uma determinada levedura apenas pela sua morfologia no meio de cultura, está sujeita a interpretações erradas. O desenvolvimento de meios que permitem a diferenciação de espécies pela cor é uma grande vantagem, facilitando decisivamente a interpretação de resultados. Por este motivo verifica-se actualmente uma tendência acentuada no mercado para o desenvolvimento e a comercialização de tais meios de cultura.

Quando se pretende utilizar um determinado meio de cultura para análises microbiológicas rotineiras, os custos associados a este produto são um aspecto fundamental. A fórmula do meio ZBA inclui uma elevada quantidade de “Sabouraud Dextrose Agar”, tornando o meio consideravelmente mais caro do que o meio misto com ácido.

Consideramos, pelos motivos acima referidos, o meio misto contendo 0,4% (v/v) de ácido ideal para o isolamento e enumeração da levedura *Z. bailii*.

Com o objectivo de aprofundar a aplicabilidade do meio de cultura no caso concreto da indústria alimentar, achámos conveniente isolar e enumerar leveduras da espécie *Z. bailii* a partir de vinhos e alimentos contaminados, quer aplicando o meio misto contendo 0,1 % (p/v) de glucose e 0,4 % (v/v) de ácido fórmico, quer aplicando

outros meios de cultura como termo de comparação. Neste contexto, deveríamos também avaliar a aplicabilidade do meio para a enumeração de células sujeitas a condições de “stress”, uma vez que os estudos de Makdesi e Beuchat (1996 b) revelaram que o meio TGYAC não possui a selectividade desejada.

- **Espalhamento em placa**

Os resultados obtidos por esta metodologia encontram-se resumidos na tabela 3.21 bem como na figura 3.10. A percentagem de recuperação da levedura *Z. bailii* IGC 4806 (tanto em cultura pura como em cultura mista com as estirpes *S. cerevisiae* IGC 4072 ou *P. membranaefaciens* e *D. anomala* IGC 5133) no meio ZBA ficou compreendida entre 55 e 69%. Para o meio com substratos misto com ácido fórmico (0,2%v/v) e glucose (0,1% p/v), a percentagem situou-se na ordem de 72 a 102 %. Com o aumento progressivo da concentração de ácido fórmico verificámos um decréscimo desta percentagem para valores compreendidos entre 69 a 84 % (0,3% v/v ácido fórmico), 54 a 61% (0,4% v/v ácido fórmico) e 31 a 40% (0,5% v/v ácido fórmico). Apenas para o meio contendo 0,5% (v/v) de ácido fórmico verificámos uma percentagem de recuperação significativamente diferente da do meio de referência. Estes resultados foram semelhantes aos obtidos pela metodologia da filtração em membrana.

A estirpe *S. cerevisiae* IGC 4072 não cresceu no meio ZBA, tendo-se verificado a sua recuperação nos meios contendo 0,2 % (v/v) de ácido. Para a estirpe *P. membranaefaciens* IGC 2487 verificou-se a diminuição da percentagem de recuperação com o aumento da concentração do ácido, e a estirpe *D. anomala* IGC 5133 não cresceu em nenhum dos meios testados.

Relativamente à morfologia e à cor das colónias nos diferentes meios, confirmaram-se de um modo geral as observações descritas na metodologia da filtração em membrana. Surgiram algumas dificuldades na determinação do número de colónias de *S. cerevisiae* IGC 4072 e *Z. bailii* IGC 4806 quando testadas em cultura mista, devido à cor azul do meio alcalinizado. Com esta “cor de fundo”, as colónias de *S. cerevisiae* apareciam frequentemente azul claro, dificultando a sua distinção das colónias azuis de *Z. bailii*. Neste aspecto, a utilização de um filtro branco na filtração em membrana permitiu uma discriminação mais objectiva dos dois tipos de colónias.

Tabela 3.21 Percentagem de recuperação (%) obtida pela metodologia de espalhamento em placa para alguns meios de cultura com substratos mistos e do meio “*Zygosaccharomyces bailii* selective medium” (ZBA, composição conforme descrito na secção 2.2.2) em comparação com o meio YEPD após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.

F0,2 G0,1(4,5) Meio mineral com glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,2%, v/v) a pH 4,5.
 F0,3 G0,1(4,5) Meio mineral com glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,3%, v/v) a pH 4,5.
 F0,4 G0,1(4,5) Meio mineral com glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,4%, v/v) a pH 4,5.
 F0,5 G0,1(4,5) Meio mineral com glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,5%, v/v) a pH 4,5.

Estirpe		Meio de cultura				
		ZBA	F0,2G0,1 (4,5)	F0,3G0,1 (4,5)	F0,4G0,1 (4,5)	F0,5G0,1 (4,5)
<i>Z. bailii</i> IGC 4806		69	102	84	58	40
<i>Zb</i> IGC 4806 + <i>Sc</i> IGC 4072		63	99	84	61	31
<i>Zb</i> IGC 4806 + <i>Pm</i> IGC 2487 + <i>Da</i> IGC 5133		55	72	69	54	32
<i>S. cerevisiae</i> IGC 4072		< 0,02	35	< 0,02	< 0,02	< 0,02
<i>P. membranaefaciens</i> IGC 2487		< 0,003	48	6,7	0,4	0,003
<i>D. anomala</i> IGC 5133		< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003	< 0,003

Notas: **Zb** *Zygosaccharomyces bailii*
Sc *Saccharomyces cerevisiae*
Pm *Pichia membranaefaciens*
Da *Dekkera anomala*

As áreas sombreadas indicam resultados que se distinguem de modo significativo ($p \leq 0,05$) dos valores obtidos no meio de referência.

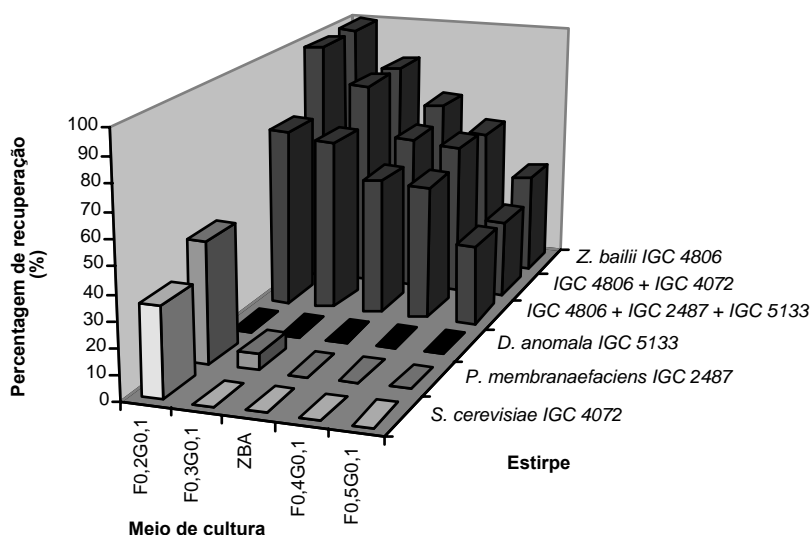


Figura 3.10 Percentagem de recuperação (%) obtida pela metodologia de espalhamento em placa, para alguns meios de cultura com substratos mistos em comparação com o meio “*Zygosaccharomyces bailii* selective medium” (ZBA, composição conforme descrito na secção 2.2.2) após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.

- **Metodologia de Miles - Misra**

A tabela 3.22 e a figura 3.11 mostram a recuperação das leveduras testadas nos vários meios, aplicando a metodologia de Miles-Misra. Para a levedura *Z. bailii* IGC 4806, tanto em cultura pura como em cultura mista, verificou-se um comportamento análogo ao observado para as duas metodologias descritas anteriormente. A ordem dos meios testados em termos da percentagem de recuperação obtida foi a seguinte: F0,2 G0,1(4,5) = F0,3 G0,1(4,5) > ZBA = F0,4 G0,1(4,5) = F0,5 G0,1(4,5).

A recuperação das restantes três estirpes foi inibida (*D. anomala* IGC 5133) ou significativamente reduzida. A estirpe *P. membranaefaciens* IGC 2487 revelou uma maior resistência ao ácido fórmico do que a levedura *S. cerevisiae* IGC 4072, sendo as respectivas percentagens de recuperação similares às obtidas pelas metodologias descritas anteriormente. As colónias observadas apresentaram uma morfologia idêntica à ilustrada nas figuras 3.5 a 3.8. A dificuldade na distinção entre as espécies *Z. bailii* IGC 4806 e *S. cerevisiae* IGC 4072 foi idêntica à obtida no caso do espalhamento em placa.

Tabela 3.22 Percentagem de recuperação (%) obtida pela metodologia de Miles-Misra para alguns meios de cultura com substratos mistos e do meio “*Zygosaccharomyces bailii* selective medium” (ZBA, composição conforme descrito na secção 2.2.2) em comparação com o meio YEPD após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.

F0,2 G0,1(4,5)	Meio mineral com glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,2%, v/v) a pH 4,5.
F0,3 G0,1(4,5)	Meio mineral com glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,3%, v/v) a pH 4,5.
F0,4 G0,1(4,5)	Meio mineral com glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,4%, v/v) a pH 4,5.
F0,5 G0,1(4,5)	Meio mineral com glucose (0,1%, p/v) e ácido fórmico (0,5%, v/v) a pH 4,5.

Estirpe	Meio de cultura				
	ZBA	F0,2G0,1 (4,5)	F0,3G0,1 (4,5)	F0,4G0,1 (4,5)	F0,5G0,1 (4,5)
<i>Z. bailii</i> IGC 4806	62	88	95	62	33
<i>Zb</i> IGC 4806 + <i>Sc</i> IGC 4072	50	93	81	55	39
<i>Zb</i> IGC 4806 + <i>Pm</i> IGC 2487 + <i>Da</i> IGC 5133	68	99	69	50	37
<i>S. cerevisiae</i> IGC 4072	< 0,002	22	9	< 0,002	< 0,002
<i>P. membranaefaciens</i> IGC 2487	< 0,003	52	24	2,6	0,04
<i>D. anomala</i> IGC 5133	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002	< 0,002

Notas: **Zb** *Zygosaccharomyces bailii*
Sc *Saccharomyces cerevisiae*
Pm *Pichia membranaefaciens*
Da *Dekkera anomala*
 As áreas sombreadas indicam resultados que se distinguem de modo significativo ($p \leq 0,05$)

dos valores obtidos no meio de referência.

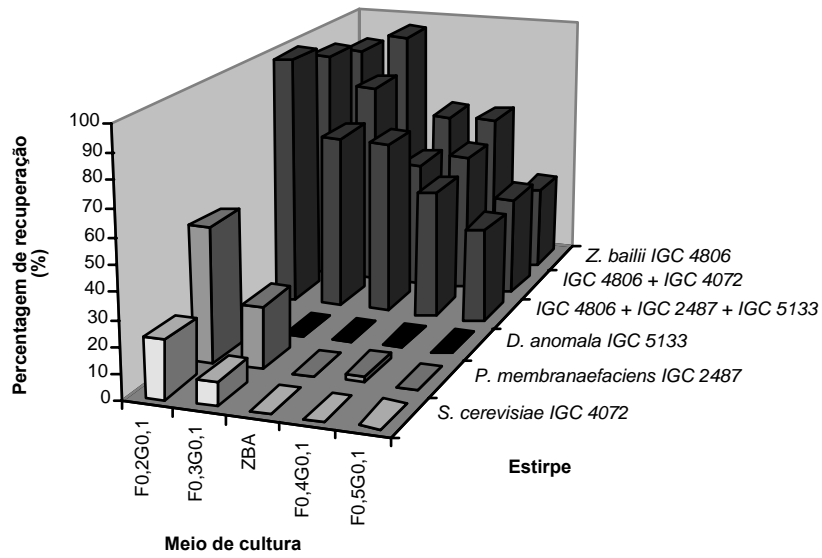


Figura 3.11 Percentagem de recuperação (%) obtida pela metodologia de Miles-Misra para alguns meios de cultura com substratos mistos e para o meio “*Zygosaccharomyces bailii* selective medium” (ZBA, composição conforme descrito na secção 2.2.2)) após 96 horas de incubação à temperatura de 30°C.

3.4 O caso concreto da aplicação do meio de cultura desenvolvido a amostras de vinho contaminado

A validação de um meio de cultura terá de passar obviamente, pela aplicação do meio desenvolvido a “casos concretos”, ou seja, pela utilização do meio no controlo microbiológico de amostras contaminadas. Assim, na última parte do trabalho apresentamos os resultados de uma análise realizada a duas amostras de Vinho Verde que se apresentavam contaminados. As amostras eram provenientes da mesma adega e do mesmo vinho, mas de cubas diferentes (cuba A e cuba B), tratando-se aparentemente de um problema de refermentação, associado a condições de higiene deficientes durante a produção do vinho. Estas análises foram efectuadas pela metodologia da filtração em membrana, utilizando volumes diferentes de amostra. Os meios de cultura que se utilizaram foram os seguintes:

- Meio YEPD como meio de cultura geral;
- Meio WLN - meio de cultura geral, para a pesquisa de leveduras em amostras de vinho;
- Meio WLD - meio de cultura para a pesquisa de leveduras não-fermentativas em amostras de vinho. (Este meio corresponde ao meio WLN suplementado com cicloheximida na concentração de 0,0004 %, p/v);
- Meio F0,4 G0,1(4,5) - meio de cultura selectivo para a pesquisa da levedura *Z. bailii*.

A tabela 3.23 mostra os resultados obtidos nos meios referidos nas duas amostras de vinho após a amostragem (antes da refrigeração) e a seguir ao armazenamento a 4°C durante 5 meses (após refrigeração). Os valores apresentados representam médias de filtrações efectuadas em duplicado.

Tabela 3.23 Análise de amostras de vinho contaminado - número de ufc por ml em placas com vários meios de cultura, após 96 horas de incubação à 30° C.

YEPD	Meio com extracto de levedura, peptona e glucose.
WLN	"Wallerstein Laboratory Nutrient Medium".
WLD	"Wallerstein Laboratory Differential Medium".
F0,4 G0,1(4,5)	Meio mineral com glucose (0,1% p/v) e ácido fórmico (0,4%, v/v) a pH 4,5.

Meio de cultura	Cuba A		Cuba B	
	antes refrigeração	após refrigeração	antes refrigeração	após refrigeração
YEPD	-	107	-	85
WLN	685	73	620	2
WLD	10	3	200	2
F0,4G0,1(4,5)	75 ⁽¹⁾	0	90 ⁽¹⁾ + 170 ⁽²⁾	0

Notas: ufc unidades formadoras de colónias
 - não determinado
 (1) colónias de cor creme-amarelado
 (2) colónias de cor azul, típicas de *Zygosaccharomyces bailii*

Antes da refrigeração, as populações de leveduras presentes nas duas cubas apresentaram uma capacidade de crescimento no meio WLN da mesma ordem de grandeza. No entanto, as principais diferenças foram encontradas quando os meios de cultura foram o WLD e o F0,4 G0,1(4,5). Na cuba A, só 10 leveduras foram capazes de crescer no meio WLD, e no meio F0,4 G0,1(4,5) detectaram-se apenas 75 colónias de cor creme-amarelado. Na cuba B, houve 20 vezes mais leveduras capazes de crescer no meio WLD, quando comparado com a cuba A.

No meio contendo ácido fórmico registou-se também um número mais elevado de colónias na cuba B comparativamente à cuba A. As colónias isoladas a partir da amostra retirada da cuba B apresentavam duas morfologias distintas:

- por um lado as colónias branco-amareladas, idênticas às obtidas na cuba A,
- e por outro lado colónias pequenas com cerca 1 mm diâmetro e de cor azul.

Cada uma destas colónias típicas foi isolada, purificada, e confirmada pela técnica de "Polymerase Chain Reaction" (PCR), recorrendo a "primers" específicos, no

Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia. As colónias de cor azul correspondiam à espécie *Z. bailii*, enquanto que as colónias branco-amareladas não. É de admitir que as leveduras isoladas no meio WLD (cuba B) fossem da espécie *Z. bailii*, pois esta levedura cresce na presença de cicloheximida (ponto 3.3.2), e o número de colónias neste meio correspondeu aproximadamente ao número de colónias obtidas no meio F0,4 G0,1(4,5) com uma morfologia idêntica às de *Z. bailii*.

Após o período de refrigeração detectámos nas duas amostras um número de leveduras no meio YEPD da mesma ordem de grandeza. A refrigeração provocou a diminuição drástica de leveduras desenvolvidas no meio WLD para cerca de 10% (cuba A) ou 0,3% (cuba B) do valor inicial, e eliminou a população capaz de se desenvolver no meio F0,4 G0,1(4,5). Aparentemente, no caso da cuba A tratou-se de uma população de leveduras, que conseguiram recuperar no meio WLN após um período de 5 meses a baixas temperaturas, enquanto o mesmo meio não se revelou com igual eficácia quando passámos para a cuba B, após o mesmo tempo de refrigeração. Estes resultados são consistentes com os obtidos pela técnica de PCR, sugerindo tratar-se de populações distintas nas duas amostras.

O facto de termos encontrado populações distintas nas duas cubas, onde se encontrava o mesmo vinho, pode indicar que a contaminação do vinho ocorreu possivelmente a partir de cubas contaminadas, que poderão ser consideradas como ponto crítico na produção de vinhos. Este caso confirma a necessidade de que o controlo microbiológico não se pode limitar ao produto final, uma vez que este é insuficiente para garantir a qualidade do vinho. Neste sentido, seria recomendável que os referidos meios fossem testados no âmbito de um sistema de qualidade (como por exemplo HACCP) na adega, incluindo os pontos críticos mais relevantes.

Os resultados destes ensaios revelaram dois aspectos importantes no controlo microbiológico de vinhos:

- Na avaliação da flora não-fermentativa, o meio com substratos misto contendo glucose e ácido fórmico à concentração de 0,1 % (p/v) e 0,4% (v/v) respectivamente, parece constituir o meio ideal para o isolamento de leveduras da espécie *Zygosaccharomyces bailii*, permitindo distinguir facilmente esta levedura de outras espécies. De igual modo verificou-se que

a recuperação neste meio foi superior ao meio WLD, o que constituiu uma situação desejável no controlo microbiológico de vinhos.

- O meio YEPD permitiu a recuperação de um maior número de leveduras comparativamente ao meio WLN após um período de refrigeração de 5 meses a 4°C. O meio YEPD seria um meio aconselhado para a avaliação da flora de leveduras, quando o processo de fabrico do vinho passa por processos tecnológicos que podem criar condições de "stress" para estes microrganismos.

Achámos importante estender os estudos sobre a recuperação da flora de leveduras contaminantes em diferentes meios de cultura incluindo também vinhos artificialmente contaminados. A contaminação pela levedura *Z. bailii* é de tal modo perigosa para o vinho que apenas uma célula por garrafa pode ser suficiente para provocar a turvação e/ou refermentação do vinho (Thomas, 1993). Este facto justifica o prosseguimento de testes de aplicabilidade de meios com o objectivo de determinar o limite de detecção desta levedura (na presença/ausência de outras leveduras).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com os objectivos e plano geral da tese, os estudos desenvolvidos foram dirigidos no sentido de desenvolver um meio de cultura selectivo/diferencial para a detecção da levedura de contaminação alimentar *Zygosacharomyces bailii*.

Os estudos realizados na primeira parte do trabalho levaram à formulação de dois meios de cultura mineral, contendo glucose (0,1 %, p/v) e ácido fórmico (0,3 ou 0,4 %, v/v), a pH 4,5, que permitiram a detecção de *Z. bailii*, mas também de *Z. bisporus*, pela mudança da cor do indicador incorporado no meio de cultura (líquido ou sólido), após 48 horas de incubação a 30°C. Esta resposta específica não foi detectada pelas restantes 18 espécies incluídas no conjunto de leveduras testadas. Uma vez que *Z. bisporus* à semelhança de *Z. bailii* é considerada um importante agente causador de deterioração alimentar, não achámos necessário a alteração da composição do meio no sentido de eliminar as respostas falso positivas de *Z. bisporus*.

Na segunda parte do trabalho, na validação dos meios de cultura acima referidos, foi possível demonstrar a sua equivalência em termos de percentagem de recuperação e de selectividade a meios de cultura já anteriormente descritos para a detecção e enumeração de *Z. bailii*. A percentagem de recuperação no meio contendo glucose (0,1 %, p/v) e ácido fórmico (0,2, 0,3 ou 0,4 %, v/v) não foi significativamente diferente ($p < 0,05$) do meio de referência. O aumento da concentração do ácido para 0,5 % (v/v) reduziu a recuperação de *Z. bailii* para 30-40%. A grande vantagem do meio desenvolvido consiste na sua capacidade de diferenciar, pela cor, as colónias de *Z. bailii* de outras leveduras. Esta característica, que não se verifica para os meios descritos anteriormente, facilita decisivamente a pesquisa desta levedura quando presente em

culturas mistas. Na análise microbiológica de amostras de vinhos contaminados, o meio contendo glucose (0,1 %, p/v) e ácido fórmico (0,4 %, v/v) evidenciou a sua acção diferencial dado que permitiu distinguir as colónias de *Z. bailii* das restantes leveduras presentes.

Em geral, na pesquisa de leveduras em alimentos, o tempo de incubação aconselhado situa-se entre 3 a 5 dias. Os meios de cultura com substratos mistos, nas condições experimentais testadas, permitiram a detecção de *Z. bailii* após 4 dias de incubação. Para a indústria alimentar é, no entanto, importante, dispôr de metodologias mais rápidas para a detecção de microrganismos contaminantes, e neste sentido achamos conveniente que sejam desenvolvidos estudos com o objectivo de reduzir o tempo de incubação.

Em termos de perspectivas futuras julgamos importante que os meios desenvolvidos sejam caracterizados (comparativamente com outros meios de cultura já existentes), no sentido de avaliar:

- a sua aplicabilidade no isolamento de *Z. bailii* de diferentes produtos alimentares contaminados, para além do vinho;
- a percentagem de recuperação de células sujeitas a condições de "stress";
- a capacidade de crescimento, nestes meios, de bactérias associadas a produtos alimentares deteriorados.

No âmbito de um sistema de controlo de qualidade na indústria alimentar, que tenha em consideração problemas associados à deterioração de produtos pela levedura *Z. bailii*, devem colocar-se as seguintes questões:

- (1) É possível detectar a presença de *Z. bailii*?
- (2) Qual é o grau de contaminação com a levedura *Z. bailii*?
- (3) É possível detectar outras leveduras associadas a *Z. bailii*?

O meio de cultura desenvolvido no presente trabalho parece permitir responder às questões anteriormente colocadas.

No futuro, a aplicação de metodologias moleculares permitirá proporcionar à indústria alimentar ferramentas mais eficazes (maior sensibilidade e rapidez) do que as convencionalmente utilizadas no controlo microbiológico de alimentos. No entanto, tal não significa que se ponha de parte o desenvolvimento de novos meios de cultura selectivos/diferenciais. Com efeito, a aplicação de técnicas moleculares apesar de extremamente prometedoras, implica frequentemente uma etapa de pré-enriquecimento da amostra, pela utilização de um meio de cultura selectivo. Pensamos assim que o desenvolvimento de novas metodologias para o controlo microbiológico de alimentos terá que, dada a sua complementariedade, contemplar as abordagens clássicas e moleculares.

5 BIBLIOGRAFIA

- Adams, M.R. e Moss, M.O. (1995). Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry.
- Andrews, S. (1992 a). Comparative study of WL Nutrient Agar with DRBC and OGY for yeast enumeration in foods. *In: Modern methods in food mycology*, pp. 61-67. Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. e King, D.A. (Eds.) Elsevier.
- Andrews, S. (1992 b). Specifications for yeasts in australian beer, wine and fruit juice products. *In: Modern methods in food mycology*, pp. 111-119. Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. e King, D.A. (Eds.) Elsevier.
- Azevedo, M.M.S. (1997). Estudos sobre a utilização de fontes de carbono e energia pela levedura *Dekkera anomala* com vista à optimização do seu crescimento. Tese de Mestrado. Universidade do Minho.
- Baleiras Couto M.M, van der Vossen J.M.B.M., Hofstra, H. e Huis in't Veld, J.H.J. (1994). RAPD analysis: a rapid technique for the differentiation of spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, **24**: 249-260.
- Baleiras Couto M.M, Hartog, B.J., Huis in't Veld, J.H.J., Hofstra, H. e van der Vossen J.M.B.M. (1996). Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. *Food Microbiol.*, **13**: 59-67.
- Barnett, J.A., Payne, R.W. e Yarrow, D. (1990). Yeasts: Characteristics and identification. Cambridge University Press.
- Barry, A.L., Fay, G.D. (1972). A review of some common sources of error in the preparation of agar media. *Amer. J. Med. Techn.*, **38**: 241 - 245.

- Baumgart, J. (1993). Mikrobiologische Untersuchung von Lebensmitteln. Behr's Verlag.
- Baumgart, J. (1996). Schnellmethoden und Automatisierung in der Lebensmittelmikrobiologie. *Fleischwirtschaft*, **76**: 1-5.
- Beuchat, L.R. (1982). Thermal inactivation of yeasts in fruit juices supplemented with food preservatives and sucrose. *J. Food Sci.*, **47** (5): 1679-1682.
- Beuchat, L.R. (1993 a). Selective media for detecting and enumerating foodborne yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, **19**: 1-14.
- Beuchat, L.R. (1993 b). Combined effects of food preservatives and organic acids on thermal inactivation of yeasts in fruit juices. *Lebensm.-Wiss. u. -Technol.*, **16**: 51-54.
- BioMérieux SA. API 20C AUX - Systeme d'identification des levures. Notice technique; Version H.
- Bochner, B.R., So, B., Lola, A. e Gadzinski, P. (1992). Development of a new yeast test panel for characterization and identification of a wide range of yeast species. Biolog, Inc., Hayward, Ca, USA.
- Bridson, E. (1994). The development, manufacture and control of microbiological culture media. Oxoid. Unipath Ltd, UK.
- Cardoso, M.H.R. (1994). Toxicidade de ácido acético e outros ácidos monocarboxílicos de cadeia curta em *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Doutoramento. Universidade do Minho.
- Casal, M., Cardoso, H. e Leão, C. (1996). Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **142**: 1385-1390.

- Casal, M., Cardoso, H. e Leão, C. (1998). Effects of ethanol and other alcohols on the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (2): 665-668.
- Ceccaldi, B.C. (1996). Le contrôle microbiologique des aliments. *Biofutur*, **160** (10): 22-25.
- Corry, J.E.L. (1982). Quality assessment of culture media by the MILES-MISRA method. *In: Quality assurance and quality control in microbiological culture media*, pp. 21-37. Corry, J.E.L. (Ed.) GIT Verlag, Darmstadt.
- Deák, T. (1992 a). Media for enumerating spoilage yeasts - a collaborative study. *In: Modern methods in food mycology*, pp. 31-39. Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. e King, D.A. (Eds.) Elsevier.
- Deák, T. (1992 b). Experiences with, and further improvement to, the Deák and Beuchat simplified identification scheme for food-borne yeasts. *In: Modern methods in food mycology*, pp. 47-55. Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. e King, D.A. (Eds.) Elsevier.
- Deák, T. (1993). Simplified techniques for identifying foodborne yeasts. *Int. J. Food Microbiol.*, **19**: 15-26.
- Deák, T., Reichart, O., Szakmár K. e Péter, G. (1992). Spoilage yeasts of unusual sorbate resistance. *In: Modern methods in food mycology*, pp. 55-60. Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. e King, D.A. (Eds.) Elsevier.
- Duarte, F., Pais, C., Spencer-Martins, I. e Leão, C. (1997). Taxonomic value of electrophoretic isoenzyme profiles in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. 18th International Specialized Symposium on Yeasts; Bled, Slovenia.
- Emmerich, W. e Radler, F. (1983). The anaerobic metabolism of glucose and fructose by *Saccharomyces bailii*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**: 3311-3318.

- Erickson J.P. (1993). Hydrophobic membrane filtration method for the selective recovery and differentiation of *Zygosaccharomyces bailii* in acidified ingredients. *J. Food Prot.*, **56** (3): 234-238.
- Estevinho, M.L. (1995). Resistência da levedura *Zygosaccharomyces bailii* a ambientes extremos: Estudos sobre toxicidade e utilização do ácido acético e outros ácidos monocarboxílicos. Tese de Doutoramento. Universidade do Minho, Braga.
- Fernandes, M.L., Côrte-Real, M., Loureiro, V., Loureiro-Dias M.C. e Leão, C.(1997). Glucose respiration and fermentation in *Zygosachharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae* express different sensitivity patterns to ethanol and acetic acid. *Lett. Appl. Microbiol.*, **25**: 249-253.
- Frazier, W.C. e Westhoff, D.C. (1988). *Food Microbiology*. 4th Ed. Mc Graw Hill International Editions.
- Gancedo C. e Serrano, R. (1989). Energy-yielding metabolism. *In: The Yeasts*, vol. 3, pp. 205-259, Rose, A.H. e Harrison, J.S. (eds), Academic Press Limited, London.
- Golden, D.A. e Beuchat L.R. (1992). Interactive effect of solutes, potassium sorbate and incubation temperature on growth, heat resistance and tolerance to freezing of *Zygosaccharomyces rouxii*. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**: 524-530.
- Gonzalo, P., Valderrama, M.J., de Silóniz, M.I. e Peinado, J.M. (1998). Validation of new selective and differential culture media for food spoilage yeasts. 6^{as} Jornadas de Biologia de Leveduras, Santarém.
- Gonçalves, M.G.A. (1996). Leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces*: Métodos de despiste rápido e sua incidência em vinhos portugueses. Tese de Mestrado. Universidade Técnica de Lisboa.
- Hammond, J.R.M. (1995). Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century. Progress to date. *Yeast*, **11**: 1613-1627.

- Hocking, A.D. (1996). Media for preservative resistant yeasts: a collaborative study. *Int. J. Food Microbiol.*, **29**: 167-175.
- Hocking, A.D. e Pitt, J.I. (1992 a). Introduction and summary of the first international workshop on standarization of methods for the mycological examination of foods. *In: Modern methods in food mycology*, pp. 3-7. Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. e King, D.A. (Eds.) Elsevier.
- Hocking, A.D. e Pitt, J.I. (1992 b). Recomendations from the closing session of SMMEF II *In: Modern methods in food mycology*, pp. 359-365. Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. e King, D.A. (Eds.) Elsevier.
- James, S.A., Collins, R.D. e Roberts, I.N. (1994). Genetic interrelationship among species of the genus *Zygosaccharomyces* as revealed by small-subunit rRNA gene sequence. *Yeast*, **10**: 871-881.
- James, S.A., Collins, R.D. e Roberts, I.N. (1996). Use of rRNA internal transcribes spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspota*. *Int. J. System. Bacteriol.*, **46** (1): 189-194.
- Jarvis, B. e Williams, A.P. (1987). Methods for detecting fungi in foods and beverages. *In: Food and beverage mycology*, pp. 599-636. Beuchat, L.R. (ed.); Van Nostrand Reinhold.
- Jay, J.M. (1992). *Modern Food Microbiology*. 4th Ed. Chapman & Hall.
- Jermini, M.F.G. e Schmidt-Lorenz W. (1987 a). Growth of osmotolerant yeasts at different water activity values. *J. Food Prot.*, **50** (5): 404-410.
- Jermini, M.F.G., Geiges, O. e Schmidt-Lorenz W. (1987 b). Detection, isolation and identification of osmotolerant yeasts from high-sugar products. *J. Food Prot.*, **50** (6): 468-472.

- Johnson, S.M., Parsons, E.Y., Stringer, S.C., Dodd, C.E.R., Morgan, M.R.A., Waites, W.M. (1996). Use of antibody-linked probes for immuno-location of microorganisms in food systems. *Food & Agricult. Immunol.*, **8**: 239-248.
- Kalathenos, P., Sutherland, J.P. e Roberts, T.A. (1995). Resistance of some wine spoilage yeasts to combinations of ethanol and acids present in wine. *J. Appl. Bacteriol.*, **78**: 245-250.
- King, A.D. e Török, T. (1992). Comparison of yeast identification methods. *In: Modern methods in food mycology*, pp. 39-47. Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. e King, D.A. (Eds.) Elsevier.
- Koch, H.A., Bandler, R., e Gibson, R. (1986). Fluorescence microscopy procedure for quantitation of yeasts in beverages. *Appl. Env. Microbiol.*, **52** (3): 599-601.
- Kunkee, R.E. e Bisson, L.F. (1993). Wine-making yeasts. *In: The Yeasts. Vol 5 - Yeast Technology* pp. 70-118. Rose, A.H. e Harrison J.S. (Eds.). Academic Press; London, San Diego, New York.
- Kurtzman, C.P. (1990). DNA relatedness among species of the genus *Zygosaccharomyces*. *Yeast*, **6**: 213-219.
- Kurtzman, C.P. (1994). Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast*, **10**: 1727-1740.
- Lieckfeldt, E., Meyer., W. e Börner, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *J. Basic Microbiol.*, **33**: 413-425.
- Liewen, M.B. e Bullermann L.B. (1992). Toxigenic fungi and fungal toxins. *In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods* pp. 811-821. Vanderzant, C., e Splittstoesser D.F. (Eds.). American Public Health Association.
- Loureiro, V. (1994). Wine spoilage yeasts: a problem to be solved. *Actas da "Assemblée General de l'Office International de la Vigne et du Vin"*, Paris.

- Loureiro, V. e Malfeito-Ferreira M. (1993). - *In*: "Encyclopaedia of food science, food technology and nutrition". Macrae, R., Robinson, R.K. e Sadler, M.J. (Eds.). Academic Press, London.
- Makdesi, A.K. e Beuchat L.R. (1996 a). Performance of selective media for enumerating *Zygosaccharomyces bailii* in acidic foods and beverages. *J. Food Prot.*, **59** (6): 652-656.
- Makdesi, A.K. e Beuchat L.R. (1996 b). Improved selective medium for enumeration of benzoate-resistant, heat-stressed *Zygosaccharomyces bailii*. *Food Microbiol.*, **13**: 281-290.
- Malfeito-Ferreira, M. (1996). Perfis de ácidos gordos e toxicidade de ácidos fracos em leveduras de contaminação de alimentos. Tese de doutoramento. Universidade Técnica de Lisboa.
- Malfeito-Ferreira, M., Lopes, J. e Loureiro, V. (1990). Characterization of spoilage yeasts in portuguese bottled dry white wines. 4^o Simp. International de Enologia, Dumond, Paris.
- Malfeito-Ferreira, M., Loureiro-Dias, M.C. e Loureiro, V. (1997). Weak acid inhibition of fermentation by *Zygosaccharomyces bailii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.*, **36**: 145-153.
- Martini, A., Ciani, M. e Scorzetti, G. (1996). Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am. J. Enol. Vitic.*, **47** (4): 435-440.
- Merck (1994). *Microbiology Manual*. E. Merck, Darmstadt, Alemanha.
- Middelhoven, W.J. e Notermans, S. (1993). Immuno-assay for detecting yeasts in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **19**: 53-62.
- Miles, A., Misra, S.S. e Irvin, J.O. (1938). The estimation of the bactericidal power of blood. *J. Hygiene (Cambridge)*, **38**: 732-749.

Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação e da Saúde: Decreto-Lei nº 261/86 de 1 de Setembro de 1986. Diário de República - I Série.

Ministério do Planeamento e da Administração do Território, da Agricultura, Pescas e Alimentação e do Comércio e do Turismo: Portaria nº 68/88 de 2 de Fevereiro de 1988. Diário de República - I Série.

Ministério do Planeamento e da Administração do Território, da Agricultura, Pescas e Alimentação e do Comércio e do Turismo: Portaria nº 110/88 de 15 de Fevereiro de 1988. Diário de República - I Série.

Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação e da Saúde: Decreto-Lei nº 93/89 de 28 de Março de 1989. Diário de República - I Série.

Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação e da Saúde: Portaria nº 65/90 de 26 de Janeiro de 1990. Diário de República - I Série.

Ministério do Planeamento e da Administração do Território, da Agricultura, Pescas e Alimentação e do Comércio e do Turismo: Portaria nº 73/90 de 1 de Fevereiro de 1990. Diário de República - I Série.

Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação e do Comércio e Turismo: Portaria nº 742/92 de 24 de Julho de 1992. Diário de República - I Série B.

Mislivec, P.B., Beuchat, L.R. e Cousin, M.A. (1992). Yeasts and molds. *In*: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. pp. 239-249. Vanderzant, C. e Splittstoesser D.F. (Eds.). American Public Health Association.

Mossel, D.A.A., Bonants-van Laarhoven T.M.G., Lichternberg-Merkus, A.M.T. e Werdler, M.E.B. (1983). Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts: an attempt at standarization at the international level. *J. Appl. Bacteriol.*, **49**: 439-454.

- Neves, L., Pampulha, M.E. e Loureiro-Dias, M.C. (1994). Resistance of food spoilage yeasts to sorbic acid. *Lett. Appl. Microbiol.*, **19**: 8-11.
- Norma Portuguesa NP 2078 (1985). Microbiologia alimentar. Cereais, leguminosas e produtos derivados. Contagem de bolores e leveduras. Instituto Português da Qualidade.
- Norma Portuguesa NP 1934 (1986). Microbiologia alimentar. Leites e produtos lácteos. Contagem de bolores e leveduras. Instituto Português da Qualidade.
- Norma Portuguesa NP 3277-1 (1988). Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras. Parte I: Incubação a 25°C. Instituto Português da Qualidade.
- Norma Portuguesa NP 3277-2 (1988). Microbiologia alimentar. Contagem de bolores e leveduras. Parte II: Incubação a 37°C. Instituto Português da Qualidade.
- Norma Portuguesa NP 4129 (1994). Microbiologia alimentar. Regras gerais para a elaboração de critérios de apreciação dos resultados de análises microbiológicas. Instituto Português da Qualidade.
- Pearson, B.M. e McKee, R. (1992). Rapid identification of *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii*. *Int. J. Food Microbiol.*, **16**: 63-67.
- Pichhardt, K. (1993). *Lebensmittelmikrobiologie*. 3rd Ed. Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York.
- Pitt, J.I. (1974). Resistance of some food spoilage yeasts to preservatives. *Food Technology in Australia*, **6**: 238-240.
- Querol, A., Barrio, E. e Ramón, D. (1992). A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *System. Appl. Microbiol.*, **15**: 439-446.

- Restaino, L., Lenovich, L.M. e Bills, S. (1985). Effect of acids and sorbate combinations on the growth of four osmophilic yeasts. *J. Food Prot.*, **45**(12): 1138-1142.
- Rodrigues, F. (1998). Estudos sobre a regulação do metabolismo intracelular de ácido acético na levedura *Zygosaccharomyces bailii*. Tese de Mestrado, Universidade do Minho.
- Samson, R.A., Hocking, A.D., Pitt, J.I. e King, D.A. (Eds.) (1992). *In: Modern methods in food mycology; Appendix - Media.* pp. 371-379. Elsevier.
- Silley, P. (1994). Rapid microbiology - is there a future? *Biosensors and Bioelectronics*, **9** (2): 15-22.
- Smith, M.T. e Yarrow, D. (1996). Identification of the common food-borne fungi: yeasts. *In: Introduction to food-borne fungi.* pp. 222-232. Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad J.C. e Filtenborg O. (Eds.) Centraalbureau voor Schimmelcultures; Baarn, Delft.
- Smittle, R.B. e Flowers, R.S. (1982). Acid tolerant microorganisms involved in the spoilage of salad dressings. *J. Food Prot.*, **45** (10): 977-983.
- Smittle, R.B., Krysinski, E.P. e Richter, E.R. (1992). Yeasts and molds. *In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods.* pp. 985-991. Vanderzant, C., e Splittstoesser D.F. (Eds.). American Public Health Association.
- Snowdon, J.A. e Cliver D.O. (1996). Microorganisms in honey. *Food Microbiol.*, **31**: 1-26.
- Sousa, M.J., Miranda, L., Côrte-Real, M. e Leão, C. (1996). Transport of acetic acid in *Zygosaccharomyces bailii*: effects of ethanol and their implications on the resistance of the yeast to acidic environments. *Appl. Env. Microbiol.*, **62**: 3152-3157.

- Sousa, M.J., Rodrigues, F., Côrte-Real, M. e Leão, C. (1998). Mechanism underlying the transport and intracellular metabolism of acetic acid in the presence of glucose in the yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology*, **144**: 665-670.
- Sousa-Dias, S., Gonçalves, T., Leyva, J.S., Peinado, J.M. e Loureiro-Dias, M.C. (1996). Kinetics and regulation of fructose and glucose transport systems are responsible for fructophily in *Zygosaccharomyces bailii*. *Microbiology*, **142**: 1733-1738.
- Stewart, G.G. (1987). Alcoholic beverages. *In: Food and beverage mycology* pp. 307-354. Beuchat, L.R. (ed.); Van Nostrand Reinhold.
- Stubbs, S., Hutson, R., James, S. e Collins, M.D. (1994). Differentiation of the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* from other *Zygosaccharomyces* species using 18S rDNA as target for a non-radioactive ligase detection reaction. *Lett. Appl. Microbiol.*, **19**: 268-272.
- Thomas, D.S. (1993). Yeasts as spoilage organisms in beverages. *In: The Yeasts. Vol 5 - Yeast Technology.* pp. 517-553. Rose, A.H. e Harrison J.S. (Eds.). Academic Press; London, San Diego, New York.
- Thomas, D.S. e Ackermann J.C. (1988). A selective medium for detecting yeasts capable of spoiling wines. *J. Appl. Bacteriol.*, **65**: 299-308.
- Thomas, D.S. e Davenport R.R. (1985). *Zygosaccharomyces bailii* - a profile of characteristics and spoilage activities. *Food Microbiol.*, **2**: 157-169.
- Tokuoka, K., Takasuke, I. e Goto, S. (1985). Identification of yeasts isolated from high-sugar foods. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **31**: 411-427.
- Tudor, E.A. e Board, R.G. (1993). Food-spoilage yeasts. *In: The Yeasts. Vol 5 - Yeast Technology.* pp. 436-508. Rose, A.H. e Harrison J.S. (Eds.). Academic Press; London, San Diego, New York.

- Ueckert, J., Breeuwer, P., Abee, T., Stephens, P., Nebe von Caron, G. e ter Steeg P.F. (1995). Flow cytometry applications in physiological study and detection of foodborne microorganisms. *Int. J. Food Microbiol.*, **28**: 317-326.
- van Uden, N. (1967). Transport-limited fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* and its competitive inhibition. *Arch. Microbiol.*, **58**: 155-168.
- van der Vossen, J.M.B.M e Hofstra, H. (1996). DNA based typing, identification and detection systems for food spoilage microorganisms: development and implementation. *Int. J. Food Microbiol.*, **33**: 35-49.
- van der Walt, J.P. e Yarrow, D. (1984). Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. *In: The Yeasts - A Taxonomic Study*. J. Lodder (Ed.), pp. 45-101. North-Holland Publishing Company: Amsterdam, London.
- Van Vuuren, H.J. e van der Meer, L. (1987). Fingerprinting of yeasts by protein electrophoresis. *American Journal of Enology and Viticulture*, **38**: 49-53.
- Vanne, L., Karowski, M., Karpinnen, S. e Sjöberg A.-M. (1996). HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control*, **7** (6): 263-276.
- Vaz de Oliveira, M., Roseira, M., Loureiro, V. e Barros, P. (1995). Análise microbiológica de vinhos e de mostos. Detecção, diferenciação e contagem de microrganismos. *In: Recueil de méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts*. Office International de la Vigne et du Vin (OIV).
- Weenk, G.H. (1995). Microbiological assessment of culture media: comparison and statistical evaluation of methods. *In: Culture media for food microbiology; Progress in industrial microbiology*, vol. **34**; pp. 1-23. Corry, J.E.L., Curtis, G.D.W. e Baird, R.M. (Eds.) Elsevier.

- Welthagen, J.J. e Viljoen, B.C. (1997). Comparison of ten media for the enumeration of yeasts in diary products. *Food Res. Internat.*, **30** (3/4): 207-211.
- Wind, C.E. e Restaino, L. (1995). Antimicrobial effectiveness of potassium sorbate and sodium benzoate against *Zygosaccharomyces bailii* in a salsa mayonnaise. *J. Food Prot.*, **58** (11): 1257-1259.
- Wyder, M.T. e Puhan, Z. (1997). A rapid method for the identification of yeasts from kefir at species level. *Milchwissenschaft*, **52** (6): 327-330.
- Zar, J.H. (1974). *Biostatistical Analysis*. 2nd Ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.