

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE HONGOS EN ALIMENTOS PROCESADOS

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FUNGI FROM PROCESSED FOODS

L. Mesa C.; S. Rodríguez V.*; M. Delmonte V.**;
 M. Fonseca R.**; y C. Villalobos R.***

RESUMEN

Se hizo un estudio micológico en alimentos procesados de consumo masivo (yogurt, mermelada, mortadela y salchicha de pollo), aparentemente inalterados y dentro de su fecha de vencimiento, provenientes de diferentes supermercados de la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Para el procesamiento de las muestras y el recuento de los hongos se usó la metodología indicada en las Normas COVENIN. Se aislaron las levaduras *Cándida parapsilosis* en los yogurts y *C. diddensii* en mermelada de una marca comercial. Los resultados obtenidos muestran un nivel de contaminación relativamente bajo (4.3%) en los alimentos analizados. El mayor aisla-

* Profesora Titular. Cátedra de Micología. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Apdo. postal 526. CP. 4001. A. Maracaibo-Venezuela. Autora de Correspondencia.

** Asistentes de Investigación. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. LUZ.

miento de levaduras se observó en el medio Rosa de Bengala Clo-ramfenicol Agar en comparación con el medio Extracto de Malta Agar, recomendado por las Normas.

Palabras claves: Hongos, alimentos procesados.

ABSTRACT

A micology study was carried out in samples of massive consume processed food (yogurt, jelly, bologna and chicken sausage). They were all apparently in good conditions and before the expiration date. These samples were obtained from different supermarkets, Maracaibo, Venezuela. The methodology used for the sample treatment and fungi counting was the are established by COVENIN Norms. It was isolated *Candida parapsilosis* in yogurts and *C. diddensii* in jellies of a commercial brand. The obtained results showed a relatively low proportion of contamination (4.3%) in the studied foods. The main yeast isolated was observed in Rose Bengal Chloramphenicol Agar medium, in comparison with the Malt Extract Agar medium, recommended by Covenin Norms.

Key words: Fungus, processed food.

INTRODUCCIÓN

La importancia del estudio de los hongos filamentosos y las levaduras no sólo radican en su participación en los procesos de bioproducción de alimentos, sino también por su capacidad de actuar en el biodeterioro de los mismos, originando una disminución en su calidad.³ La contaminación micótica de los alimentos suele llamar la atención del consumidor por cambios en la apariencia, sabor y color. En ocasiones las materias primas y los productos alimenticios pueden estar contaminados con esporas, conidias o frag-

mentos de micelio, que se encuentran en el ambiente sin que pueda ser visiblemente observada, ésto es de suma importancia, ya que algunos hongos que contaminan los alimentos son capaces de producir metabolitos tóxicos, micotoxinas,^{12,13} que pueden ocasionar daños a la salud de los individuos que los ingieren,¹⁴ de allí el valor que tiene el empleo de medidas de control de calidad en la producción y almacenamiento de alimentos procesados.

En nuestro país, la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), es el organismo encargado de coordinar y programar las actividades de normatización y calidad de los productos industriales. Para el análisis microbiológico de los productos alimenticios ha establecido normas de identificación, preparación de los alimentos, y el procesamiento de las muestras; así como también la cuantificación de mohos y levaduras.^{15,16}

En alimentos procesados y almacenados se han reportado: *Penicillium expansum* en frutas, *Aspergillus flavus*, *Fusarium sp* en cereales, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y *A. ochraceus* en especias, *A. repens* en productos cárneos; los Géneros *Geotrichum*, *Fusarium* y *Aspergillus* en leche cruda y pasteurizada.^{4,9,10,20}

En esta investigación se evalúa si el nivel en que se encuentran los hongos en alimentos procesados como carnes industrializadas (mortadela y salchicha de pollo), mermeladas y yogurts, exceden los límites permisibles establecidos por las Normas COVENIN y comparar el medio de cultivo Agar Extracto de Malta, recomendado por las normas, con el medio Rosa de Bengala Cloramfenicol Agar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se estudiaron 10 unidades de lotes diferentes de dos marcas comerciales de yogurt, mermelada, mortadela y 10 unidades de salchichas de pollo, aparentemente inalterados, en fecha anterior a su vencimiento y obtenidos de diversos supermercados de la ciu-

dad de Maracaibo, Venezuela. Las muestras fueron transportadas al laboratorio bajo refrigeración. Se usó Agar Extracto de Malta (pH 3.5) de Laboratorios Difco y Agar Rosa de Bengala Cloramfenicol (pH 7.2 ± 0.2) de Laboratorios Oxoid, como medios de cultivo de aislamiento.

Métodos

1. Preparación de los medios de cultivo: Se prepararon según indicaciones de las casas fabricantes.
2. Procesamiento de los alimentos: se realizó en base a los lineamientos establecidos por las Normas COVENIN 1126-77¹⁵ y 1337-78¹⁶.

A.- Codificación: Se consideraron las siguientes características; condiciones en que se recibió la muestra (temperatura, aspecto externo del envase, etc.), información contenida en el envase (tipo de producto, marca comercial, fabricante, número de lote de fabricación, contenido neto del envase, tipo de rótulo, fecha de fabricación y/o vencimiento, llegada al laboratorio, asignación de un número para el análisis) y el aspecto de la muestra (color, olor, consistencia, textura, etc.).

B.- Análisis de las muestras: Se pesó asépticamente 10 gramos de cada uno de los alimentos a investigar, en un "beaker" estéril, previamente tratado. Se homogenizó con 90 ml de agua peptonada al 0.1%, colocada gradualmente en licuadora a máxima velocidad, durante 2 minutos. A partir de esta dilución se prepararon diluciones seriadas hasta 1: 10.000. De cada una de las diluciones previamente agitadas (25 veces) se colocó, por duplicado, 10 ml en placas de Petri que contenían los medios Extracto de Malta Agar (EMA) y Rosa de Bengala Cloramfenicol Agar (RBCA), previamente fundidas y estabilizados a 45 °C - 50 °C. Cada placa se mezcló por rotación y se dejó solidificar por 8 a 10 minutos sobre una superficie plana; posteriormente las placas se sellaron con tirro e incubaron a 28 °C durante 7 días.

C.- Cuantificación de mohos y levaduras: luego del período de incubación se seleccionaron las placas donde aparecían entre 10 y 100 colonias de hongos (mohos y levaduras), anotándose la di-

lución correspondiente. El número de colonias de una misma dilución se promedió y luego se multiplicó por la dilución correspondiente. Se reportó por separado mohos y levaduras. Los resultados se expresan como unidades formadoras de colonias por milímetros de muestra (ufc/ml).

D.- Identificación: Una vez aislados los hongos (mohos y levaduras) en cantidades significativas, se procedió a la identificación según el caso. Para las levaduras se empleó los parámetros de Lodder,¹¹ y para los hongos filamentosos se utilizó el examen micromorfológico, mediante cultivo en lámina,² en el medio Czapeck Dox Agar. Se usó lactofenol claro como líquido de montaje.

RESULTADOS

Positividad y negatividad de los alimentos investigados. Se observó que de un total de 70 muestras analizadas, 3 (4.3%) resultaron positivas (un yogurt casero, un yogurt comercial y una mermelada "A"), y 67 (95.7%) fueron negativas (mortadela, salchichas de pollo y mermelada "B").

Porcentaje de positividad de las muestras de alimentos analizadas según los medios de cultivo y el rango de contaminación. (Cuadro 1): Se observó en el 10% de las muestras de yogurt casero, el mismo rango de ufc/ml (10^3 - 10^4) en los medios de aislamiento utilizados (EMA y RBCA). En el 10% de las muestras de yogurt comercial y mermelada "A" se aislaron hongos sólo en el medio RBCA, en el rango de 10^2 - 10^3 ufc/ml.

Hongos aislados según tipo de alimento procesado, (Cuadro 2): Se detectó la presencia de especies de Género *Cándida*, *C. parasilopsis* en los yogurts y *C. diddensii* en mermelada.

Cuadro 1

Porcentaje de positividad de las muestras de los alimentos analizados distribuidos según los medios de cultivo* y el rango de contaminación (ufc/ml)

Alimentos	EMA **	RBCA	
	$10^3 - 10^4$	$10^2 - 10^3$	$10^3 - 10^4$
Yogurt casero	10	-	10
Yogurt comercial	-	10	-
Mortadela "A"	-	-	-
Mortadela "B"	-	-	-
Mermelada "A"	-	10	-
Mermelada "B"	-	-	-
Salchichas de pollo	-	-	-

* Extracto de Malta Agar (EMA) y Rosa de Bengala Cloramfenicol Agar (RBCA)

** El rango de $10^2 - 10^3$ ufc/ml, no se detectó en el medio EMA.

Cuadro 2

Hongos aislados según tipo de alimento procesado

Alimento procesado	Especie fúngica aislada
Yogurt casero	<i>Cándida parapsilosis</i>
Yogurt comercial	<i>Cándida parapsilosis</i>
Mermelada "A"	<i>Cándida diddensii</i>

DISCUSIÓN

Los resultados de esta investigación demuestran que de setenta muestras procesadas, tres (4.3%) fueron positivas: la especie de hongo aislada excedía los límites establecidos por las Normas COVENIN. Setenta y siete muestras (95.7%) resultaron negativas,

lo cual evidenció el cumplimiento de los lineamientos establecidos en las mencionadas Normas, en la mayoría de las muestras estudiadas.

En el 20% de las muestras procesadas de yogurt, alimento cuyo límite establecido por la Norma es de 10 ufc/ml para mohos y levaduras.¹⁷ Se observó la presencia de *Cándida parapsilosis* en un rango mayor de este límite. El aislamiento de *Cándida parapsilosis* en el yogurt, podría atribuirse a la habilidad de esta especie para crecer a temperatura de refrigeración, fermentar la lactosa y sacarosa, e hidrolizar la caseína de la leche.²¹ La prevalencia del Género *Cándida* sobre los Géneros *Torulopsis*, *Kluyveromyces*, *Sacharomyces*, *Rhodotorula*, *Pichia* y *Sporobolomyces* en los yogurts se ha reportado previamente,^{7,21} tal como se observó en esta investigación.

En la mortadela "A" se detectó el moho *Penicillium sp* en un rango que no excedía los límites (10^2 - 10^3 ufc/ml) establecido por la Norma,¹⁸ sin embargo la cuantificación fue significativa.¹⁶ La escasa presencia fúngica en la mortadela, probablemente se debe a la adición de sustancias químicas como nitrato de sodio y nitrato de potasio,⁶ aunque el Género *Penicillium* puede ser aislado con frecuencia de carnes y sus productos.⁸ Estudio previo³ reporta en mortadela el aislamiento de *Cándida apis*, *C. bombicola* y *C. diddensii*; sin embargo, no expresa los niveles detectados, de allí la diferencia con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

La presencia de *Cándida diddensii* en el 10% de las muestras de mermelada "A", en el medio Rosa de Bengala Cloramfenicol Agar, en el rango de 10^2 - 10^3 ufc/ml, el cual excede el límite permitido: 10 - 10^2 ,^{2 19} probablemente se debe a un insuficiente tratamiento térmico durante la pasteurización del producto.⁵

En las salchichas de pollo, el 100% de las muestras no presentaron crecimiento fúngico, posiblemente por los aditivos químicos utilizados en su elaboración; no obstante el Género de levadura *Debariomyces* puede ser aislado de este alimento.¹

En las Normas COVENIN¹⁶ se sugiere para el procesamiento de las muestras de alimentos, el medio de cultivo Extracto de Mal-

ta Agar; sin embargo, los resultados obtenidos en esta investigación mostraron un mejor comportamiento del medio Rosa de Bengala Cloramfenicol Agar, en el aislamiento de hongos de los alimentos analizados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARNETT, J.; PAYNE, R. and YARROW, D. **A guide to identifying and classifying yeast**. Cambridge University Press. Cambridge. London. 1979. p. 160.
2. BORELLI, D. Nota teórica sobre cultivo en lámina de los hongos frágiles. **Rev. Policlínica de Caracas**. 1954; XXII, 131:285-290.
3. CORREIA, O. y ACIOLE de QUEIROZ L. Levaduras aisladas de diversos tipos de alimentos. **Boletín Micológico**. 1991; 6:49-54.
4. DELCOURT, A.; ROUSSET, A. and LEMAITRE, J. Microbial and mycotoxic contamination of pappers and food safety. **Boll Chin Farm**. 1994; 133:235-258.
5. FRAZIER, W.C. **Microbiología de los alimentos**. 2^{da}. Edición. Edit. Acribia S. A. Zaragoza, España. 1972; p. 356.
6. FRAZIER, W.C. y WESTHOFF, D.C. **Microbiología de los alimentos**. 3^{ra}. Edición. Edit. Acribia. S. A. Zaragoza, España. 1978. pp. 154-156.
7. IVO, M. **Levaduras do abocaxi**. (Tese maestrado). Escola Paulista de Medicina, Sao Paulo. 1982.
8. JAY, J.M. **Microbiología moderna de los alimentos**. 2da. Edición. Edit. Acribia S.A. Zaragoza, España. 1987; pp. 25 y 124.
9. JODRAL, M.; LIÑAN, E.; ACOSTA, L.; GALLEGOS, C.; ROJAS, F. and BENTABOL, A. Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish milks. **Inst. J. Food Microbiol**. 1993; 18:171-174.
10. L'VOVA, L.; ORLOVA, N.; BYSTRIAKOVA, Z.; OMELCHENKO, M.; REMELE, V. Propagation fungi and mycotoxina in varius grains. **Prikl Biokhin Microbiol**. 1993; 29:70-79.
11. LODDER, J. (Editor). **The yeasts, a Taxonomic Study**. 2da. Edición. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. 1970. pp. 34-83.
12. LOZADA, A.F. Isolation and identification of mycotoxigenic fungi in selected foods and feeds. **Food Addit. Contam**. 1995; 12:509-514.
13. MAHMOUND, A.L. Toxigenic fungi and mycotoxin content in poultry feedstuff ingredients. **J. Basic Microbiol**. 1993; 33:101-104.
14. MARASAS, W.F. Fumonisin: their implications for human and animal health. **Nat. tox**. 1995; 3:193-198.

15. Norma COVENIN 1126-77. Alimentos. Codificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico.
16. Norma COVENIN 1337-78. Alimentos. Método para recuento de hongos y levaduras.
17. Norma COVENIN 4-005. Yogurt.
18. Norma COVENIN 1949-82. Mortadela.
19. Norma COVENIN 2592-89. Mermeladas y jaleas de frutas.
20. SAMSON, R.; KOEKSTRA, E.; CONMIE, A.; VAN, O. **Introduction to food borne fungi**. 2^{da}. Edición Centralbureau Voor Schimmel cultures. Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences 1984. pp. 212, 216 y 217.
21. SURIYARACHCHI, V. and FLEET, G. Occurrence and growth of yeasts in yoghurts. **Appl. and Environmental Microbiol.** 1991; 42:574-579.