

Aislamiento e identificación de hongos resistentes al calor en frutillas

Vincenzini, Alicia Zulma; Luque, Ana; Basílico, María de la Luz Zapata; Basílico, Juan Carlos

Cátedra de Microbiología - Dto. Biotecnología - Facultad de Ingeniería Química - U.N.L. - Santiago del Estero 2829 - (3000) Santa Fe, Argentina - Fax: 042-571162 - e-mail: jcbasili@fiqus.unl.edu.ar

RESUMEN: Las ascosporas fúngicas pueden permanecer en estado latente largos períodos de tiempo en desechos de frutas y en el suelo, pudiéndose aislar de frutas que hallan estado en contacto con el suelo y de los recipientes y equipos utilizados para su cosecha, transporte o procesamiento. Estas ascosporas pueden sobrevivir a tratamientos de pasteurización y su posterior germinación, producir el deterioro de la fruta y la síntesis de toxinas.

Se realizaron estudios respecto a la flora fúngica contaminante de frutillas prestando especial atención a especies productoras de ascosporas. Se analizaron frutillas provenientes de Coronada (Pcia. de Santa Fe), las que fueron estudiadas sin tratamiento térmico (STT) y con tratamiento térmico (CTT), a las temperaturas de 50, 80, y 90°C, durante 15 y 30 min. Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento fueron: PDA (Agar Papa Dextrosa) y MEA (Agar Extracto de Malta). Las muestras se incubaron hasta 30 días a 28°C. Los aislados fueron identificados según Pitt y Hocking.

Los hongos encontrados en frutillas STT corresponden a géneros relacionados con contaminación con tierra, estos mismos estaban presentes en frutillas CTT (50°C, 15 min). Para la temperatura de 80°C se obtuvieron aislados de *Neosartorya fischeri*. Estas ascosporas no se detectaron en frutillas STT por necesitar ser activadas por calor. A 90°C no se observó desarrollo fúngico. Las variedades *Neosartorya fischeri* fueron identificadas según su resistencia térmica.

SUMMARY: Ascospores may remain dormant in decaying fruit debris or in the soil. They can thus be isolated both from harvested fruits which have been in contact with the soil and from the containers and equipment used for their harvest, transport and processing. These ascospores may survive pasteurization treatments and thus, spoilage and toxin synthesis may occur due to post-pasteurization germination of ascospores.

The strawberry-contaminating fungi flora was studied, specially ascospore-producing species. Strawberries from Coronada (Santa Fe province) were analysed, both with (WHT) and without heat treatment (WOHT), for 15 and 30 minutes, at 50, 80 and 90 °C. Fungi were isolated in PDA (Potatote Dextrose Agar) and MEA (Malt Extract Agar), samples being incubated for 30 days at 28°C. Isolates were identified according to Pitt and Hocking.

Fungi found in WHT and WOHT (at 50°C, for 15 minutes) strawberries correspond to genus related to soil contamination. At 80°C, isolates of *Neosartorya fischeri* were found, but these were not detected in WOHT strawberries for they need to be activated by heat. No fungi development was observed at 90°C.

Neosartorya fischeri varieties were identified according to their heat resistance.

Introducción

En los años recientes, hubo un incremento en el volumen y variedad de productos a base de frutas en el mercado. Las nuevas tecnologías de packaging y el aumento en la demanda del consumidor han provocado una mayor comercialización de jugos, jugos, helados, etc.

Las frutillas tienen un lugar importante en este sentido. Casi la totalidad del cultivo de frutilla en nuestra provincia se encuentra en la zona de Coronada, la cual aporta el 45% de la producción nacional de frutilla. Se destina 50% al consumo fresco y 50% a industrias elaboradoras de dulces, pulpas, congelados, cubeteados. (1)

En la búsqueda de productos exentos de riesgos para la salud de los consumidores, el sistema de Análisis de Peligros y Control de Puntos Críticos (HACCP) plantea un planeamiento sistemático para

la identificación, valoración y control de peligros de naturaleza física, química y microbiológica en toda la cadena alimentaria, logrando alcanzar y mantener los niveles deseados de sanidad y calidad.

Desde el punto de vista de los peligros microbiológicos, las frutas, por su elevada acidez (pH: 1,8 - 5,0), tienen reducido al mínimo el ataque bacteriano, por lo que mohos y levaduras son la flora predominante en los procesos de alteración. (2)

Debido a que las esporas bacterianas no son un problema, los procesos de calor para alimentos ácidos tales como frutas y productos con frutas tradicionalmente han sido suaves. Para la mayoría de las frutas, la pasteurización a temperaturas entre 70- 75°C es efectiva para inactivar la mayoría de las enzimas, levaduras, y las esporas de los hongos contaminantes comunes. (3)

Las ascosporas fúngicas pueden permanecer en estado latente por meses e inclusive años en

deshechos de frutas y en suelo, en el cual se hallan ampliamente distribuidas, y por lo tanto, pueden ser aisladas de frutas cosechadas que hayan estado en contacto con el suelo y de recipientes y equipos utilizados para su cosecha, transporte y procesamiento. Estas ascosporas pueden sobrevivir a tratamientos de pasteurización y su posterior germinación puede producir el deterioro de la fruta y la síntesis de toxinas (4).

Las ascosporas de *Byssoschlamys fulva* y *Neovaea*, *Talaromyces flavus* y *Neosartorya fischeri* son extremadamente resistentes al calor comparadas con otras ascosporas fúngicas y producen daño en frutas procesadas por calor y sus productos. (4,5)

El género *Neosartorya* incluye 7 especies, pero sólo aislados de *N. fischeri* se encontraron en alimentos y bebidas dañados tratados por calor. (6)

Esta especie presenta tres variedades: *N. fischeri* var. *fischeri*, *N. fischeri* var. *glabra* y *N. fischeri* var. *spinosa*.

Los metabolitos secundarios producidos por *N. fischeri* son:

* *N. fischeri* var. *fischeri*: Fumitremorgin A, B, C; Verruculogen; Terrein; Tryptoquivalin.

* *N. fischeri* var. *glabra*: Avenaciolide, Mevinolins, Tryptoquivalin, Trypacidin.

* *N. fischeri* var. *spinosa*: Tryptoquivalin, Terrein. (6)

Las tres variedades de *N. fischeri* son de diferente relevancia en la industria de procesamiento de frutas debido a que *N. fischeri* var. *glabra* y *N. fischeri* var. *spinosa* son más frecuentemente aisladas de frutas procesadas por calor que *N. fischeri* var. *fischeri*. (7)

Existen diferencias en la resistencia térmica de las distintas variedades, siendo *N. fischeri* var. *fischeri* menos resistente al calor que las variedades *glabra* y *spinosa*.

En teoría todo aislado de *N. fischeri* es capaz de causar daño en productos de frutas procesados por calor, pero en realidad sólo las variedades más estables al calor han sido encontradas como hongos causantes de daño en alimentos, excluyendo la potencialmente más tóxica variedad: *N. fischeri* var. *fischeri*.

Diferencias en la producción de metabolitos secundarios y en la resistencia al calor resaltan la importancia de una correcta identificación del hongo aislado del alimento durante el control de calidad del mismo. (6)

En el presente trabajo se plantearon como objetivos estudiar la flora fúngica contaminante de frutillas frescas y la flora resistente a diferentes

tratamientos térmicos empleando métodos de observación macroscópica y microscópica de los cultivos. En el caso de ser aisladas cepas de *N. fischeri*, determinar las variedades según su resistencia térmica.

Materiales y métodos

Se trabajó con frutillas frescas cosechadas a granel provenientes de la región de Coronda - Pcia. de Santa Fe, las que se conservaron congeladas a -20°C hasta el momento de ser analizadas.

Las alícuotas (de 100 g c/u) se descongelaron en heladera la noche anterior a su análisis.

Las muestras fueron estudiadas:

* sin tratamiento térmico (STT)

* con tratamiento térmico (CTT) a las temperaturas 50, 80 y 90°C durante 15 y 30 minutos.

Los medios utilizados para el aislamiento fueron PDA (Agar Papa Dextrosa) y MEA (Agar Extracto de Malta), ambos con agregado de antibiótico (Cloranfenicol: 100 mg/l) para inhibir el desarrollo de bacterias. (7)

Recuento de flora fúngica en frutillas sin tratamiento térmico (STT)

Se prepararon diluciones en agua de peptona (0,1%) de las frutillas trituradas y se sembraron en superficie (0,1 ml) en cajas de Petri con medios MEA y PDA simple concentración. Se incubaron 5 días a 28°C (7). Se realizó el recuento de mohos y levaduras y se identificaron los géneros fúngicos contaminantes.

Recuento de flora fúngica en frutillas con tratamiento térmico (CTT)

Se tomaron dos alícuotas de frutillas de 100 g c/u, se trituraron y se dejaron alcanzar las temperaturas de cada tratamiento a baño maría agitando permanentemente.

Luego de permanecer los tiempos determinados se procedió a un rápido enfriamiento a 50°C en baño de hielo. Inmediatamente la pulpa se mezcló 1:1 con MEA (100 g:100 ml) y PDA (100 g:100 ml) ambos doble concentración con agregado de antibiótico y luego se distribuyó la mezcla en cajas de Petri. Las muestras se incubaron 30 días a 28°C (7).

Luego al recuento e identificación de géneros fúngicos.

Identificación de géneros y especies fúngicas

Se llevó a cabo la identificación de los géneros de mohos de acuerdo a Pitt y Hocking (7) mediante la observación macroscópica y microscópica de las cepas aisladas.

Se utilizó como bibliografía accesoria Barnett y col. (8), Carmichel y col. (9) y las guías de laboratorio de Klich y Pitt (10) y Pitt (11).

Identificación de variedades de *Neosartorya fischeri* según su resistencia térmica

Fueron analizadas dos cepas de *N. fischeri* aisladas de frutillas tratadas a 80°C durante 15 min. (aislado Nro. 1) y a 80°C 30 min (aislado Nro. 2).

Las ascosporas fueron cosechadas de la superficie de placas de OA (Agar Avena) incubado a 28°C por 32 días. Luego fueron suspendidas en agua de peptona (0,1%) con Tween 80 (0,1%) y fueron tratadas en un baño sonicador con agua helada para romper los cleistotecios y ascos. Después de sedimentada (2 min), la suspensión de ascosporas fue filtrada a través de lana de vidrio estéril y diluida con agua estéril hasta una concentración total de 10^6 esporas por mililitro.

Alícuotas de 0,20 ml de la suspensión de ascosporas fueron depositadas en tubos de tapa rosca conteniendo 1,80 ml de jugo de manzana estéril mantenido a 80, 85 y 90°C. Las suspensiones fueron mantenidas a esas temperaturas bajo constante agitación a baño maría. Después de distintos tiempos de calentamiento, los tubos fueron retirados e inmediatamente enfriados en un baño de hielo.

Las ascosporas viables fueron sembradas en superficie (0,1 ml) en CYA enriquecido con sacarosa (10%) y rosa de bengala (20 mg/l). Las colonias fueron contadas después de 48 h de incubación a 28°C. (6)

Se construyeron las rectas de resistencia térmica (Logaritmo de la concentración de ascosporas vs. Tiempo) a cada una de las temperaturas ensayadas para cada aislado. Luego fueron determinados los valores D.

El valor D es el tiempo expresado en minutos necesario para disminuir en un orden la concentración de ascosporas presente; y su cálculo se expre-

sa como la inversa de la pendiente de la recta de resistencia térmica.

Los valores D de cada aislado a las diferentes temperaturas fueron comparados con los valores D correspondientes a las cepas analizadas por Nielsen y Samson (6) usadas como referencia en este estudio.

Resultados y Discusión

El total de colonias contadas en las muestras STT fue 30 UFC/100g en PDA y 38 UFC/100g en MEA (Tabla 1). Los géneros hallados corresponden a los habitualmente encontrados en tierra (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Torula*, *Penicillium*, *Mucor*, *Emericella*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Rhizopus*). (12)

Las muestras sometidas al tratamiento de 50°C no presentaron diferencias importantes respecto a las STT en cuanto al recuento y a los géneros hallados (Tablas 2 y 3).

Después de haber sido tratadas las muestras a 80°C, los recuentos decrecieron en relación a STT en un 85% en PDA y en un 90% en MEA para ambos tiempos de tratamiento. La única especie fúngica presente fue *N. fischeri* (Tabla 3), la cual no fue detectada con tratamientos a menores temperaturas debido a la necesidad que tienen sus ascosporas de ser activadas por calor (por lo menos 15 min a 80-85°C (4)).

Las muestras tratadas a 90°C no presentaron desarrollo fúngico (Tabla 3).

Se puede señalar además que el medio de cultivo utilizado (MEA/PDA) no influyó en los recuentos ni en la recuperación de los géneros fúngicos, tanto para las muestras STT como para las CTT a las diferentes temperaturas.

Las variedades de *N. fischeri* de dos aislados fueron identificadas según su resistencia térmica. Los resultados obtenidos en los calentamientos a 80, 85 y 90°C se muestran en la Tabla 4 e ilustran en las figuras de los aislados N°1 y N°2. Para cada temperatura fueron calculados los valores D (Tabla 4) con los cuales, al ser comparados con los valores D de referencia se logró identificar al aislado N°1 como *N. fischeri* var. *fischeri*. En cuanto al aislado N°2 no se pudo determinar con certeza si se trata de *N. fischeri* var. *glabra* o *N. fischeri* var. *spinosa*, ya que dos de los valores D coinciden con los de referencia para las dos variedades en cuestión; para su identificación deberían efectuarse otros tipos de determinaciones como microscopía electrónica de barrido para observar la ornamentación de sus as-

Tabla 1. Recuento de la flora fungica STT.

Cultivo	Totales*	Mohos*	Levaduras*
PDA	152	30	122
MEA	184	38	146

(*) UFC / 100 g

Generos identificados:*Aspergillus, Cladosporium, Torula, Penicillium, Mucor, Emericella, Alternaria, Fusarium, Rhizopus.*

Se aislaron hongos que no pudieron ser identificados por no haber esporulado (20%).

Tabla 2. Recuento de la flora fungica CTT.

Tratamiento térmico		Totales mohos [UFC / 100 g]	
T [°C]	Tiempo [min]	PDA	MEA
50	15	50	37
	30	28	30
80	15	4	4
	30	5	3
90	15	No fueron	
	30	observadas colonias	

Tabla 3. Estudio de la flora fungica CTT

Tratamiento térmico		Flora fúngica identificada
T [°C]	Tiempo [min]	
50	15	<i>Aspergillus clavatus, A. flavipes, A. niger, Emericella nidulans, Rhizopus spp., Cladosporium spp.</i>
	30	<i>Aspergillus terreus, A. parasiticus, Penicillium glabrum, Trichoderma viride, Mucor piriformis, Aspergillus sp., Penicillium spp., Emericella sp., Rhizopus sp.</i>
80	15	<i>Neosartorya fischeri</i>
	30	<i>Neosartorya fischeri</i>
90	15	Ausencia de mohos resistentes al calor
	30	

Tabla 4. Resistencia térmica de los aislados de *N. fischeri* estudiados

Aislado	T(°C)	r	k	D(min)
Nº 1	80	-0,8018	0,050	20,0
	85	-0,9498	0,092	10,8
	90	-0,9744	0,457	2,2
Nº 2	80	-0,8100	0,006	153,8
	85	-0,9316	0,053	19,0
	90	-0,9049	0,650	1,5

r: coeficiente de correlación

k: pendiente

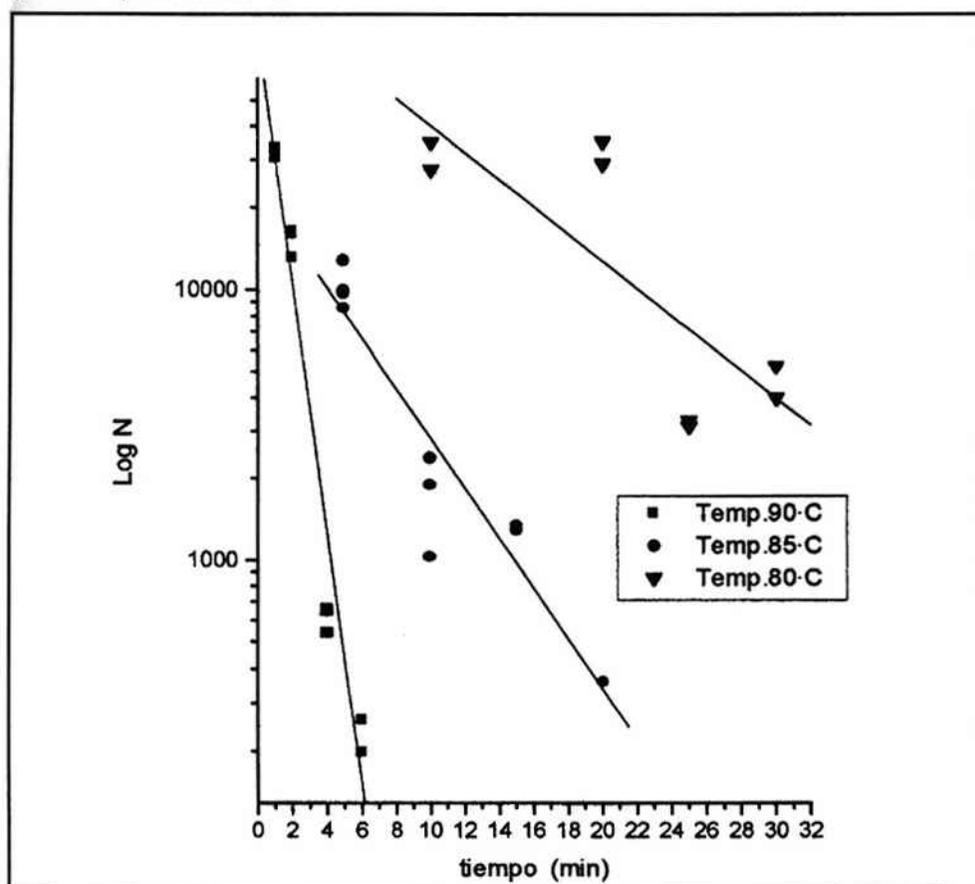
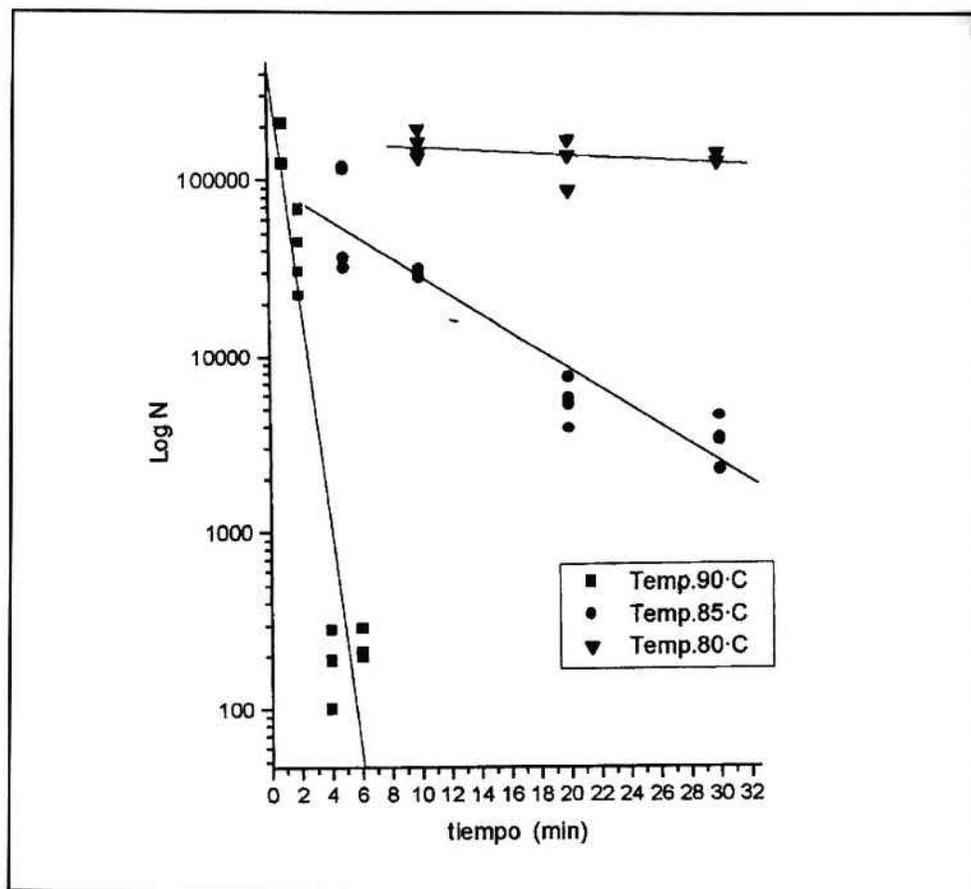
Figura 1. Curvas de muerte térmica y puntos experimentales para ascosporas de *Neosartorya fischeri* (aislado N° 1) desde 80 a 90 °C

Figura 2. Curvas de muerte térmica y puntos experimentales para ascosporas de *Neosartorya fischeri* (aislado N^o 2) desde 80 a 90 °C



cosporas, o estudiar los perfiles de metabolitos secundarios; pero sí se puede afirmar que no se trata de la variedad *N. fischeri* var. *fischeri*.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos se puede concluir que:

1) El esquema de procesamiento de calor usado en la manufactura de algunos tipos de productos con frutas no es suficiente para destruir las ascosporas fúngicas de ciertas especies y que al contrario es capaz de activar estas ascosporas que se encontraban en estado latente.

2) Se hace necesario someter a las muestras

a un choque térmico cuando se desea analizar población fúngica en frutas frescas, para evitar que las ascosporas resistentes al calor puedan no ser detectadas y así, el resultado del análisis diera bajo o nulo.

3) En la región de Coronda - Santa Fe (Argentina) está presente la variedad *Neosartorya fischeri* var. *fischeri* no descripta en la literatura internacional como contaminante de frutillas y que es capaz de producir metabolitos tóxicos tales como Fumitremorgin A, B, C, Verruculogen, Terrein y Tryptoquivalin. Los autores de este trabajo queremos agradecer la colaboración recibida por la Dra. Valeria Iacona en la puesta a punto de la metodología llevada a cabo para la obtención de la curva de muerte térmica de *Neosartorya fischeri*

Bibliografía

- 1- Censo Hortícola en el departamento San Jerónimo año 93/94 SAGyP-MAGIC-INTA-IPEC.
- 2- Pitt, J.I.; Hocking, A.D., 1997. "Fungi and Food Spoilage". Great Britain at the University Press. (Britain):469-470.
- 3- Pitt, J.I.; Hocking, A.D., 1997. "Fungi and Food Spoilage". Great Britain at the University Press. (Britain):504.
- 4- Beuchat, L.R., 1986. Extraordinary Heat Resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* Ascospores in Fruit Products. J. Food Sci. **51**, 6: 1506- 1510.
- 5- Conner, D. E., 1992. Factors contributing to variations in D values obtained for ascospores of *Neosartorya fischeri*. In Modern methods in food mycology. Elsevier. (The Netherlands): 189-193.
- 6- Nielsen, P.V., Samson, R. A., 1992. Differentiation of food-borne taxa of *Neosartorya*. In Modern methods in food mycology. Elsevier. (The Netherlands):159-168.
- 7- Pitt, J.I.; Hocking, A.D., 1997. "Fungi and Food Spoilage". Great Britain at the University Press. (Britain):21-53.
- 8- Barnett, H.L. and Hunter, B.B., 1972. "Illustrated Genera of Imperfect Fungi". Burgess Publishing Co. (USA).
- 9- Carmichel, J.W.; Kendrick, W.B.; Connors, I.L.; Sigler, L., 1980. "Genera of Hyphomycetes". The University of Alberta Press. (Canada).
- 10- Klich, M.A. and Pitt, J.I., 1994. "A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* species and their Telemorphs". CSIRO Division of Food Science. (Australia).
- 11- Pitt, J.I., 1991. "A Laboratory Guide to Common *Penicillium* species". CSIRO Division of Food Science. (Australia).
- 12- Barron, G. L., "The genera of Hyphomycetes from soil", 1983. Robert E. Krieger Publishing Co. Inc. (USA).