

Identificación de variedades de *Neosartorya fischeri* aisladas de jugos cítricos concentrados

Sobrero, María S.¹; Basílico, María de la Luz²; Sanchis, Juan C.¹; Basílico, Juan C.

1- Cátedra de Química General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

2- Cátedra de Microbiología, Dpto. Ingeniería en Alimentos. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional del Litoral. Santiago del Estero 2829. (3000) Santa Fe. Argentina. e-mail: sobrero@lbc.unl.edu.ar

RESUMEN: El aislamiento de *Neosartorya fischeri* a partir de jugos de frutas pasteurizados es frecuente. A la elevada resistencia térmica de los ascósporos de éste moho se suma su capacidad de producir micotoxinas, por lo cual es importante aislarlo e identificarlo correctamente.

El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar variedades de *N.fischeri* a partir de jugos cítricos concentrados. Los métodos empleados en la identificación fueron: microscopía electrónica de barrido, resistencia térmica de los ascósporos y evaluación de la capacidad toxicogénica de las cepas.

Se pudo aislar *N. fischeri* de los jugos estudiados independientemente del tipo de fruta usado en su elaboración (naranja, mandarina, pomelo y limón). En todos los casos las cepas resultaron pertenecer a la variedad *glabra*, siendo no productoras de fumitremorgenos A y B, ni de verruculígeno. La misma se caracteriza por elevados tiempos de reducción decimal ($D_{90} = 116$ a 140 minutos y $D_{99} = 4,1$ a 4,9 minutos).

Palabras claves: *Neosartorya fischeri*- identificación- jugos cítricos.

SUMMARY: Identification of varieties of *Neosartorya fischeri* isolated from concentrated citric juices. Sobrero, María S.¹; Basílico, María Z.²; Sanchis, Juan C.¹; Basílico, Juan C.². The isolation of *Neosartorya fischeri* from pasteurized fruit juices is frequent. Its capacity of producing micotoxins is added to the high temperature resistance of ascospores of this mould, reason by which it is important to be able to isolate and identify it correctly.

The object of this work was to isolate and identify varieties of *Neosartorya fischeri* from concentrated citric juices. The methods we employed in the identification were: ascospore temperature resistance, toxicogenic capacity and scanning electron microscopy. It was possible to isolate *Neosartorya fischeri* from juices studied independently of the type of fruit used in its elaboration (orange, lemon, grapefruit, mandarin). The strains resulted to belong to the *glabra* variety, not being neither of A and B fumitremorgenin nor of verruculogen producers. They were characterized by high time decimal reduction ($D_{90} = 116$ a 140 minutes and $D_{99} = 4,1$ a 4,9 minutes).

KEY WORDS: *Neosartorya fischeri* – Identification – Citric Juices.

Introducción

Neosartorya fischeri es un moho ampliamente difundido en suelo y es el agente causal de deterioro en numerosos alimentos procesados térmicamente que contienen frutas. Sus ascósporos han sido reportados como responsables del deterioro de frutillas enlatadas (1-2), frutas de papaya (3), uvas (4), frutas deterioradas en general, sus productos y los equipos utilizados en su elaboración (5-6).

La identificación de las variedades de *Neosartorya* es importante para los tecnólogos de alimentos por la elevada termoresistencia de sus ascósporos y por su potencial toxicidad. El aislamiento de *Neosartorya fischeri* a partir de jugos de frutas pas-

teurizados es frecuente (7-10), por este motivo el objetivo del presente estudio fue indagar la presencia de este moho en jugos cítricos concentrados e identificar las variedades utilizando tres métodos: microscopía electrónica de barrido, capacidad toxicogénica y resistencia al calor de los ascósporos.

Materiales y métodos

Muestras: Se utilizaron jugos cítricos (naranja, pomelo, limón y mandarina) concentrados que se comercializan en el mercado interno de la República Argentina. Se procesaron 6 muestras de cada tipo de jugo.

Aislamiento e identificación: Para el aislamiento de este mohó se siguió la metodología propuesta por Pitt, J.I. (11) y para la identificación de género y especie se utilizó el manual de *Aspergillus* de Klinch, M.A. and Pitt, J.I. (12).

Determinación de la capacidad toxicogénica de *Neosartorya fischeri*: Se determinó la capacidad de producción de fumitremorgeno A, B y verruculógeno de las cepas aisladas en condiciones de laboratorio. Se siguió el esquema propuesto por Cole y Cox (13). Para lo cual se incubaron los 6 aislados sobre arroz integral estéril durante un mes a 28 °C. Posteriormente se realizó la extracción de las toxinas con cloroformo.

Para la identificación de las toxinas se empleó la técnica de cromatografía en capa delgada unidireccional ascendente sobre soporte de sílica gel. Para fumitremorgeno A se utilizó como solvente tolueno – acetato de etilo – ácido fórmico (5:4:1) (v/v/v). Para fumitremorgeno B y verruculógeno acetona – cloruro de metileno (5:95) (v/v). El patrón de verruculógeno empleado pertenecía a la marca SIGMA con 95% de pureza. En el caso de fumitremorgeno A y B, fueron donados por el Dr. Haruhiro Fujimoto de Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Japón.

Resistencia de los ascospores al calor: Se siguió la metodología propuesta por Nielsen and Samson (14), que básicamente consiste en cultivar los aislados en agar avena durante 32 días a 28 °C. Luego se realiza la cosecha de ascospores y las suspensiones obtenidas se diluyen hasta obtener una concentración de 10^6 ascospores mL^{-1} en agua de peptona 0,1% (p/v).

El ensayo de resistencia al calor se realizó utilizando como vehículo jugo de manzana recién preparado y esterilizado por filtración. Se trabajó con una concentración final de 10^5 mL^{-1} ascospores de jugo. Se trató térmicamente a 80, 85 y 90°C, durante diferentes periodos de tiempo (que se prolongaron hasta 8 minutos a 90°C y hasta 180 minutos para 80 y 85°C). Luego los tubos correspondientes se enfriaron rápidamente y se realizaron diluciones en agua de peptona 0,1% (p/v). De cada una de las diluciones se sembraron 0,1 mL, en superficie, en medio Czapek – extracto de levadura – agar, a pH 3,5 y enriquecido con sacarosa (10 %) (p/v) y rosa de bengala (20 mg L^{-1}). Luego de la incubación durante

6 días a 28 °C se realizaron los recuentos expresando los resultados en unidades formadoras de colonia mL^{-1} (N). Se realizaron 4 réplicas para cada cepa y cada temperatura, en todos los casos se procedió por duplicado. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Statgraphics 3.0.

Para cada aislado se evaluó el ajuste de los resultados al modelo de cinética de primer orden, por lo cual se graficó el Log del número de unidades formadoras de colonias supervivientes vs. el tiempo. Se eligieron los tiempos para obtener 2 órdenes de reducción en los conteos. En todos los casos, los resultados se consideraron a partir de los tiempos donde mostraron franco descenso, ya que este tipo de curvas presentan desviaciones de la linealidad, propias de la activación de los ascospores por el choque térmico. Se aplicó el modelo de regresión lineal para construir las curvas. Se analizaron los residuos para definir la necesidad de descartar valores y por último se calcularon los tiempos de reducción (D) para cada aislado a las tres temperaturas. Finalmente con los valores de D calculados para cada réplica a las diferentes temperaturas, se construyeron las curvas: Log D vs. Temperatura para obtener los valores de z, para cada aislado.

Los valores de los parámetros D y z de cada aislado se compararon con los datos bibliográficos para las diferentes variedades de *N. fischeri* (14).

Morfología de los ascospores a través de microscopía electrónica de barrido: Los aislados se cultivaron en agar avena durante 32 días a 28 °C, hasta madurez de los ascospores, luego se cortaron varios trozos del agar de cada uno de los cultivos y se procedió a su fijación con glutaraldehído al 6% en tampón de fosfato 0,1 M (v/v). Luego se fijaron con tetróxido de osmio al 2% en tampón de fosfato 0,1 M (v/v), se deshidrataron con etanol y a continuación con acetato de isoamilo. Posteriormente las muestras fueron secadas al vacío mediante el Sistema de Punto Crítico (Modelo CPD 030, Bal-Tec, España). El montaje de los trozos de agar así tratados sobre los soportes de aluminio se realizó con resina epoxi y se recubrió con oro (sputtering) con el equipo para metalización (Modelo SCD 004, Bal -Tec, España) a 30 mA.

Las muestras fueron luego examinadas en un microscopio electrónico de barrido (Modelo JSM 6400, JEOL), computarizado y se fotografiaron las muestras a diferentes aumentos.

Resultados y discusión

Se logró aislar *Neosartorya fischeri* de todos los tipos de jugos estudiados, con una incidencia de 2/6 para jugos de naranja y mandarina y 1/6 para limón y pomelo, respectivamente. Con lo cual se confirma que la metodología utilizada para su aislamiento es adecuada y que dicho moho se puede encontrar en este tipo de productos tal como se mencionó anteriormente.

Las cepas aisladas de los diferentes jugos cítricos no revelaron manchas con Rf y color similares a las de los patrones utilizados. Por lo que se puede concluir que, las variedades de *Neosartorya fischeri* presente en los jugos cítricos no son productoras de verruculógeno, ni de fumitremorgenos A o B. Sin embargo podría ser que aún en estas condiciones óptimas de producción de las micotoxinas, la concentración de las mismas haya sido por debajo del límite de detección de las técnicas de TLC. Los datos de metabolitos secundarios correlacionan muy bien con la morfología (14), por esto son útiles para la identificación, la única variedad capaz de producir fumitremorigeno A, B y verruculógeno es *Neosartorya fischeri* variedad *fischeri* (14- 15), hecho que fue con-

firmado por distintos investigadores (16-18). Las variedades *glabra* y *spinosa*, que son las más frecuentemente aisladas de productos a base de frutas tratados térmicamente, no los producen. Por lo tanto los resultados obtenidos conducen a suponer que las cepas aisladas de jugos cítricos podrían pertenecer a estas variedades.

En todos los casos se constató que a temperaturas más altas se logra una reducción más rápida del número de unidades formadoras de colonias. Para las temperaturas de 80 y 85°C los resultados mostraron mayor variabilidad que para 90°C. A dicha temperatura se logró un ajuste del modelo superior al 90%, con un 95% de confianza.

Comparando los resultados con los valores de referencia de la Tabla 1 se puede descartar la variedad *fischeri*, las *glabra* II y III, ya que todas ellas muestran valores de D_{80} muy inferiores a los obtenidos en estos ensayos. Por último se puede ubicar a las cepas aisladas de los jugos cítricos entre variedad *glabra* I o *spinosa*. Estos estudios preliminares de muerte térmica, confirman la presunción a la que se arribó con la determinación de la capacidad toxicogénica, descartando la posibilidad de estar en presencia de variedad *fischeri*.

tabla 1: Valores de D y z para diferentes variedades de *Neosartorya Fischeri* y cepas aisladas de jugos cítricos concentrados

<i>Neosartorya fischeri</i>	Aislado	D ₈₀ (minutos)	D ₈₅ (minutos)	D ₉₀ (minutos)	Z (°C)
v. <i>fischeri</i>	IBT 3023	23	6	2	9
v. <i>fischeri</i>	IMI 16143	23	10	2	10
v. <i>glabra</i> I	IBT 3004	>120	20	4	6
v. <i>glabra</i> I	IMI 102173	>120	21	3	7
v. <i>glabra</i> I	CBS 582.90	>120	16	5	6
v. <i>glabra</i> II	CBS 112.55	27	14	6	14
v. <i>glabra</i> II	IBT 11025	32	-	-	-
v. <i>glabra</i> III	H 73	34	10	6	13
v. <i>spinosa</i>	H 37	>120	96	9	5
v. <i>spinosa</i>	FRR 2334	>120	21	5	7
v. <i>spinosa</i>	CBS 483.65	>120	11	3	6
cepas en estudio	Jugos cítricos	116-140	63-105	4,1-4,9	6,2-6,6

Al realizar estas experiencias (resistencia térmica de los ascosporos al calor) se observó que la suspensión de ascosporos debe ser preparada cada vez que se realiza la experiencia, ya que cuando se ensayó dejar la misma en heladera a 4°C, los resultados (recuentos de unidades formadoras de colonias luego de diferentes tiempos de tratamiento térmico a 80, 85 y 90°C) obtenidos fueron muy superiores a los que se logran trabajando con la suspensión fresca. Esto confirma que el envejecimiento de los ascosporos aumenta su resistencia al calor (19).

Para concluir con la identificación de estas cepas se realizó la observación de la superficie de los

ascosporos con microscopio electrónico de barrido. Al comparar las fotografías de la superficie de los ascosporos de las cepas aisladas de los jugos cítricos (Fotografía 1), con la bibliografía (14) se pudo notar que la semejanza se establece con la variedad *glabra* en todos los casos. Sus ascosporos que parecen lisos al microscopio óptico se observan finamente rugosos y se diferencian de los de la variedad *spinosa* que muestra diferentes grados de rugosidad que oscilan entre rugoso a espinoso. Este resultado confirma los hallazgos anteriores, sobre capacidad toxicogénica y termoresistencia.

Figura 1: Ascosporos de *Neosartorya fischeri* variedad *glabra*



Nota: Se utilizó microscopio electrónico de barrido (Modelo JSM 6400, JEOL). La foto corresponde a 8000 aumentos

Conclusiones

En los jugos cítricos concentrados estudiados fue posible aislar *Neosartorya fischeri*, independientemente del tipo de fruta que los componen (naranja, limón, pomelo o mandarina).

En todos los casos se trató de *N. fischeri* variedad *glabra* que no produce fumitremorgenos A y B, ni verruculógeno. Siendo su principal característica los elevados tiempos de reducción decimal que lo convierten en un gran inconveniente para los tecnólogos alimentarios.

Las técnicas de evaluación de la capacidad toxicogénica y los estudios de resistencia térmica de

los ascosporos no resultaron suficientes por si solos para la identificación definitiva de las cepas, que si se logra por microscopía electrónica de barrido. De todos modos la primera es una técnica orientadora sencilla que se adapta a laboratorios de baja infraestructura y la segunda es laboriosa pero brinda información valiosa para definir el proceso en planta.

Agradecimientos

Al Dr. H. Fujimoto, por donar gentilmente las toxinas.

Al Dr. J. Guarro y al Servicio de Microscopía de electrónica de la Unidad de Microbiología de la Fa-

cultad de Medicina i Ciencias de la Salut. Universitat Rovira i Virgili, Reus, España.

A la Magíster en Ciencias de los Alimentos Laura Frisson y a la cátedra de Inglés de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas.

Bibliografía

- 1- Kavanagh, J. 1963. Occurrence of a resistant species of *Aspergillus* in canned strawberries. *Nature*. London 198: 1322.
- 2- Mc Evoy, L.J. and Stuart, M.R. 1970. Temperature Tolerance of *Aspergillus fischeri* var. *glaber* in canned strawberries. *Ir. J. Agric. Res.* 9: 59-67
- 3- Rajashekhara, E.; Suresh, E. and Ethiraj, S. 1998. Thermal death rate of ascospores of *Neosartorya fischeri* ATCC 200957 in the presence of organic acids and preservatives. *Journal of Food Protection*. 61: 1358 - 1362.
- 4- Rajashekhara, E.; Suresh, E. and Ethiraj, S. 2000. Modulation of thermal resistance of ascospores of *Neosartorya fischeri* by acidulants and preservatives in mango and grape juice. *Food Microbiology*. 17: 269 - 275
- 5- Samson, R.A.; Hoekstra, E.S; van Oorschot, C. 1984. Introduction to food - borne fungi. 2nd Edition. CBS, Netherlands.
- 6- Beuchat, L.R. 1986. Extraordinary heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri*. ascospores in fruit products. *Journal of Food Science*, 51: 1506 - 1510.
- 7- Splittstoesser, D and Splittstoesser, C. 1977. Ascospores of *Byssosclamyces fulva* compared with those of heat resistant *Aspergillus*. *Journal of Food Science*. 42: 685 - 688.
- 8- Jesenska, Z. and Petrikova, D. 1985. Microscopic fungi as the cause of deterioration of canned fruit. *Cesko-Slov. Hyg.* 30: 175-177.
- 9- Scott, V.N. and Bernard, D.T. 1987. Heat resistance of *Talaromyces flavus* and *Neosartorya fischeri* isolated from commercial fruit juice. *J. Food Prot.* 50: 18-30.
- 10- Beuchat, L.R. 1992^o. Supervival of *Neosartorya fischeri* and *Talaromyces flavus* in fruit powders. *Lett. Appl. Microbiol.* 14: 238 - 240.
- 11- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 1997. Fungi and food spoilage. 2 ed. Blackie A. & P. London U.K.
- 12- Klinch, M.A.; Pitt, J.I. 1994. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Science. Australia.
- 13- Cole, R.J. and Cox, R. H. 1981 Handbook of toxic fungal metabolites. Academic Press. New York.
- 14- Samson, R.A., Nielsen, P.V. and Frisvad, J.C. 1990. The genus *Neosartorya*: Differentiation by scanning electron microscopy and mycotoxin profiles. Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Edited by Samson and Pitt, J.I. Plenum Press. New York. pág. 455-467.
- 15- Nielsen, P.; Samson, R.A. 1992. Differentiation of food - borne taxa of *Neosartorya*. Modern methods in food mycology. Elsevier. pág. 159 - 168.
- 16- Beuchat, L.R. 1988^o. Influence of organic acids on heat resistance characteristics of *Talaromyces flavus* ascospores. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 97-105.
- 17- Nielsen, P., Beuchat, L. & Frisvad, J. 1989. Growth and fumitremorgin production by *Neosartorya fischeri* as affected by food preservatives and organic acids. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 197- 207.
- 18- Frivad, J.C and Samson, R.A. 1991. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and micotoxin production. In Handbook of Applied Micrology. Vol 3. Foods and Feeds. Eds. Arora, D.K., Mukerji, K.G. and Marth, E.H. New York. Marcel DeKker, pág. 31-68.
- 19- Conner, D. 1992. Factors contributing to variations in D values of *N. fischeri*. In Modern methods in food mycology. Eds. Samson, Hocking, Pitt and King. Elsevier. Amsterdam. pág. 189 - 193.