

Identificación de flora fúngica en una empresa procesadora de alimentos del estado Carabobo

Identification of Fungal Flora in a Food Processing Company in the State of Carabobo

**González, Luís¹; Manrique, Milagros²;
Montilla, Prince²; Rojas, Tomás¹;
Perelli, Amarily²; Calzolaio, Vita²**

Universidad de Carabobo, FCS. Escuela de Bioanálisis-sede Carabobo.

¹Laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología.

²Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional.

E-mail: aperelli@uc.edu.ve, amarilyp@yahoo.com

Resumen

Los hongos se encuentran difundidos en el medio ambiente y son contaminantes frecuentes de los alimentos, siendo éste, el medio más fácil y rápido de transporte. Sus efectos nocivos dependerán de las condiciones externas que se brinden para que ellos puedan producir toxinas que afecten la salud del consumidor y el deterioro de los productos finales. El objetivo fue la identificación de la flora fúngica que pudiese estar presente en una empresa procesadora de alimento. La muestra estuvo constituida por áreas y superficies de interés para la empresa: áreas de empaque, rodillos de secado, piso 1, piso 2, piso 3 y la azotea, ubicada en el estado Carabobo, Venezuela. Se tomaron un total de 19 hisopados, para ser sembrados en agar Sabouraud y 49 placas empleando la técnica de sedimentación con el mismo agar, posteriormente fueron contabilizadas las *UFC/mm³*. Para la identificación por género y especie de los microorganismos se emplearon diferentes métodos y técnicas como: Cinta Adhesiva Transparente, Tubo Germinativo, Microcultivos y Pruebas API 20C. Los resultados obtenidos arrojaron que el mayor número de *UFC/mm³* aisladas correspondieron a *Cladosporium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus Spp* y a *Cándida albicans*.

Palabras clave: Flora fúngica, empresa procesadora, materia prima.

Abstract

Fungi are found spread throughout the environment and are frequent contaminants of food, since this is the fastest and easiest means for transport. Their injurious effects depend on the external conditions provided so that they can produce toxins affecting the health of the consumer and deterioration of the end products. The objective of this study was to identify the fungal flora that could be present in a food processing company. The sample consisted of areas and surfaces of interest to the company: packing areas, drying rollers, floor 1, floor 2, floor 3 and the roof, located in the state of Carabobo, Venezuela. A total of 19 swabs were taken, which were sown in Sabouraud agar and 49 plates, using the sedimentation technique with the same agar; later, the UFC/mm³ were counted. For identification of the microorganisms by genre and species, different methods and techniques were used, such as: transparent sticky tape, germinating tubes, microcultures and* API 20C tests. Results indicated that the greatest number of UFC/mm³ isolates corresponded to *Cladosporium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus Spp* and *Cándida albicans*.

Key words: Fungal flora, processing company, raw material.

Introducción

La presencia de algunos mohos o levaduras en el proceso de recolección de los alimentos pueden afectar la calidad del producto, variar el tiempo de conservación y ocasionar daños a la salud humana y animal, especialmente aquellos agentes micotoxigénicos, capaces de producir micotoxinas [1]; estos metabolitos pueden entrar a la cadena alimentaria de humanos y animales, por contaminación directa o indirecta. En la directa, el hongo toxicógeno crece sobre el material alimenticio, mientras que en la contaminación indirecta, el alimento es contaminado por una micotoxina [2].

Cabe destacar que los hongos productores de estos metabolitos están ampliamente difundidos en el medio ambiente y son contaminantes frecuentes de los alimentos siendo el medio más fácil y rápido de transporte, especialmente los de origen vegetal, estos pueden contaminarse cuando los hongos se desarrollan durante la cosecha, el almacenamiento o el procesamiento de los alimentos. Las especies toxicogénicas de mayor importancia pertenecen a tres géneros: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* [3].

Los cultivos que se contaminan frecuentemente son: maíz, sorgo, cebada, trigo, centeno, millo, arroz, maní, nueces y semillas de algodón, esta contaminación con micotoxinas en los granos, generalmente es un proceso aditivo; puede iniciarse en el campo, aumentar durante la cosecha y operaciones de secado y continuar acumulándose durante el almacenamiento. El contenido de agua y la temperatura del grano son factores críticos que afectan la producción de micotoxinas [3].

Dentro de este marco, es importante resaltar que la calidad del producto puede verse afectada dependiendo del hongo que ahí se encuentre y del mismo modo el tiempo de preservación, ya que dichos agentes capaces de causar estos tipos de cambios, por lo general son patógenos para el ser humano. Al mismo tiempo es necesario tener claro que estas no son únicamente consecuencias para el consumidor, también esta implicada la economía y moralmente la integridad de la organización, por ende conocer cuales pueden ser y si están presenten estos microorganismos, contrarrestarlos de una manera eficiente y eficaz, y por supuesto mantener este esquema de seguridad e higiene contra estos agentes. Por lo anteriormente expuesto, en la pre-

sente investigación se trazó como objetivo: Identificar la flora fúngica presente en áreas de producción de una empresa procesadora de alimentos del Estado Carabobo, Valencia.

Materiales y Métodos

Se tomó muestra de la flora fúngica presente en las superficies de interés de la planta procesadora, en las áreas de empaque, rodillos de secados, pisos 1, 2, 3 y azotea.

Las técnicas empleadas para la recolección y procesamientos de las muestras fueron: **Técnica de sedimentación:** Se realizó colocando placas de Petri con agar Sabouraud en diferentes áreas de la planta: en la entrada, en el área de almacenamiento, empaque, rodillos de secado, áreas de procesamiento y en todos los pisos. Las placas fueron expuestas por 15 ó 20 minutos, identificándolas luego con los datos inherentes a las áreas para llevar un registro [4].

Técnica de hisopado [5]: se utilizó un hisopo estéril humedecido con solución salina 0,85% de NaCl, el cual se pasó por las superficies de interés a estudiar y luego transportados al laboratorio, con la finalidad de realizar un examen directo y el aislamiento en placas de Agar Sabouraud.

Las muestras se procesaron en el Laboratorio de Micología de la Universidad de Carabobo. Se incubaron en estufa a 25°C todas las placas y tubos, con observación en un periodo de 72 horas, del crecimiento y las características macroscópicas de las colonias que crecieron en las placas. Se procedió a contar las unidades formadoras de colonias (UFC/mm³), y determinar las características macroscópicas de las colonias como, textura, color, pigmentación, tanto al anverso como al reverso de la placa, además se realizó el estudio microscópico utilizando la tinción de Azul de Lactofenol [6] para lograr el contras-

te de las estructuras para su mejor identificación al observarlas al microscopio con objetivo de 10x y luego a 40x.

Para el estudio microscópico se utilizaron los siguientes métodos:

El método del asa de platino doblada en forma de L, con la cual se pudo obtener las pequeñas porciones de las colonias a estudiar, este material se colocó en una lamina portaobjetos y luego se le añadió 1 ó 2 gotas de azul de Lactofenol, se cubrió con una laminilla y se sellaron los bordes de las lamina con esmalte de uñas transparente. Se dejaron en reposo un tiempo determinado mientras el colorante teñía las estructuras fúngicas (hifas aéreas, vegetativas, conidióforos, conidias) y se observaron al microscopio con objetivos de 10x y 40x [7,8].

El método de Cinta adhesiva transparente, consistió en poner en contacto un trozo de cinta no mayor de 4 cm. y sosteniéndose entre los dedos pulgar e índice, presionar, con el lado adhesivo, sobre la superficie de las colonias a estudiar de forma suave, para no dañar la colonia y así se adhieran las estructuras de los micelios aéreos principalmente. La cinta se coloca sobre una lámina portaobjeto con una o dos gotas de Azul de Lactofenol, se hace presión y se observó al microscopio con objetivos de 10x y 40x, para determinar las características propias de cada uno de los hongos desarrollados [6,8]

El método de Microcultivo, según la técnica de Riddel [9] consistió en preparar una cámara húmeda estéril: una placa de Petri, en cuyo fondo se coloca agua estéril y dos varillas de vidrio, sobre éstas varillas se coloca el portaobjeto, y sobre éste el bloque del medio de cultivo: Harina de Maíz con Tween 80 para las levaduras y Agar Sabouraud para los mohos, los bloques del medio se obtienen mediante cortes con bisturí. La muestra se inocula sobre el bloque en cuatro cuadrantes,

mediante el asa de platino en forma de L, sobre el bloque del medio ya inoculado se coloca una laminilla cubreobjetos e incuba por 7 días a 25°C. Una vez terminado el periodo de incubación, se retira el cubreobjetos y se coloca en una lámina con una o dos gotas de Azul Lactofenol y se observa al microscopio con objetivos de 10x y 40x las estructuras características de las especies aisladas. La identificación se hizo según los criterios descritos por Weitzman y Kane [10]. Todas las cepas aisladas se mantuvieron Agar Sabouraud.

Para las colonias de levaduras se utilizaron las siguientes pruebas: **Tubo Germinativo**, consiste en colocar en un tubo de ensayo 0,5 ml de suero humano y una pequeña porción de la colonia a estudiar, se incuba a 37°C, en Baño de María, por 2 horas. Transcurrido el tiempo se procede a colocar en una lámina portaobjeto una gota de la muestra, se cubre con laminilla cubreobjeto y se observó al microscopio con objetivo de 10x y 40x. Se determina la elongación que puede experimentar la blastoconidia, este crecimiento o formación de una prolongación tubular que se extiende 3-4 veces más que la blastoconidia que la originó es sugestivo de *Cándida albicans* [11].

API 20 C AUC, el sistema API 20C AUX esta constituido por 20 cúpulas con sustratos

deshidratados (carbohidratos) que permiten efectuar 19 pruebas de asimilación. Las cúpulas son inoculadas con 100ul de una suspensión de la levadura a estudiar, preparada con NaCl al 0,85% y a una concentración equivalente al patrón N° 2 Mc Farland. Se incuba a 25°C por 48 a 72 horas. Se verifica la positividad o negatividad de las cúpulas, la capacidad de utilizar por vía oxidativa el sustrato. La lectura de la prueba genera un código numérico que se compara con un catálogo analítico que determina el género y la especie de la levadura.

Resultados

En la Tabla 1 se puede apreciar el número de unidades formadoras de colonias por milímetros cúbicos (UFC/mm³) que se contabilizaron de las áreas muestreadas de la empresa procesadora de alimentos; observándose que en el área de la azotea se encontró el mayor número de UFC/mm³ con un total de 20 UFC/mm³, mediante la técnica de hisopado, sin embargo es necesario hacer notar las cifras significativas de los pisos 1 y 3 con un total de 16 y 14 UFC/mm³. Se pudo constatar que a través del método por sedimentación en placa de agar Sabouraud las

Tabla 1. Recuento de flora fúngica y UFC/mm³ contabilizadas en placas de Agar Sabouraud, a partir de la Técnica de Hisopado y la Técnica de Sedimentación.

Área	Método Hisopado Número de UFC/mm ³	Método Sedimentación Número de UFC/mm ³
Área de empaque	8	15
Rodillos de secado	12	8
Piso # 01	16	16
Piso # 02	10	10
Piso # 03	14	12
Azotea	20	19
Total	80 UFC/mm ³	80 UFC/ ³

áreas que experimentaron mayor predominio de unidades formadoras de colonias fueron la azotea, piso 1, 3 y área de empaque, obteniéndose en cada una de ellas de 19,16, 15 y 12 UFC/mm³, respectivamente.

En la Tabla 2 se puede observar las diferentes especies aisladas e identificadas de las distintas áreas y superficies de interés muestreadas; obteniéndose un mayor número de aislamiento de *Cladiosporum oxysporum*, seguida de *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y *Geotrichum candidum* con un total 18, 14, 13 y 11 respectivamente. Mientras que las especies de menor hallazgo fueron *Fusarium concolor* y *Cladiosporum sphaerospermum* con tan solo 3 y 1. Por otra parte, es necesario resaltar el aislamiento que se obtuvo de *Cándida albicans* el cual corresponde a un total de 10.

En la Tabla 3, la identificación de la flora fúngica aislada a partir de los cultivos de agar Sabouraud obtenidos por el método de sedimentación mostró como resultado que las especies con mayor número de aislamiento fue-

ron *Aspergillus niger* con 18, *Cladiosporum oxysporum* 15, *Aspergillus flavus* 14 y *Rhizopus spp* 13. Por otra parte es necesario señalar que las otras especies de *Aspergillus* encontradas como: *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans* y *Aspergillus niger* estuvieron en menor cantidad y hubo aislamiento de *Cándida albicans* y *Cándida glabrata* con un número de 12 y 8 respectivamente.

Discusión

Los resultados aportados en el presente estudio son de gran importancia ya que la mayoría de los agentes contaminantes aislados pertenecen a la categoría de los mohos, los cuales están ampliamente distribuidos en el medio ambiente debido a su tipo de reproducción, ya que las esporas pueden viajar con mayor facilidad y colonizar los alimentos, alterando la salud del consumidor. De este modo, de acuerdo con Bleve y col. [1], en el

Tabla 2. Identificación y diferenciación por género y especies de la flora fúngica aislada en los cultivos de Agar Sabouraud, a partir de la Técnicas de Hisopado.

Género	Especie	Número de aislamientos
<i>Aspergillus</i>	<i>niger</i>	14
	<i>fumigatus</i>	8
<i>Rhizopus</i>	<i>spp</i>	13
<i>Penicillium</i>	<i>nigricans</i>	9
	<i>chrysogenum</i>	8
<i>Cladiosporum</i>	<i>oxysporum</i>	18
	<i>sphaerospermum</i>	1
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	11
<i>Curvularia</i>	<i>lunata</i>	7
<i>Fusarium</i>	<i>solani</i>	5
	<i>concolo</i>	3
<i>Alternaria</i>	<i>tenuis</i>	8
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	10
	<i>glabrata</i>	6

Tabla 3. Identificación por género y especies de la flora fúngica aislada en los cultivos de Agar Sabouraud, a partir del Técnica por Sedimentación.

Género	Especie	Número de aislamientos
<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	14
	<i>niger</i>	18
	<i>terreus</i>	2
	<i>fumigatus</i>	5
	<i>nidulans</i>	1
	<i>ruber</i>	1
<i>Rhizopus</i>		13
<i>Syncephalastrum</i>	<i>racemosum</i>	3
		3
<i>Penicillium</i>	<i>nigricans</i>	6
	<i>chysogenum</i>	3
<i>Drechslera</i>		1
<i>Cladiosporum</i>	<i>oxysporum</i>	15
	<i>sphaerospermum</i>	5
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	4
<i>Curvularia</i>	<i>lunata</i>	1
<i>Fusarium</i>	<i>solani</i>	3
	<i>concolor</i>	1
<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	12
	<i>glabrata</i>	8

proceso de recolección de las cosechas entre ellos cereales o frutos, se debe considerar la presencia de algunos, mohos o levaduras que pueden afectar la calidad del producto, variar el tiempo de conservación y afectar adversamente la salud humana y animal, especialmente agentes micotoxigénicos; aquellos que son capaces de producir micotoxinas las cuales se han relacionado a ciertas patologías.

En la Tabla 1, se pudo observar que en cuanto al número de unidades formadoras de colonias (UFC/mm³) que se contabilizaron por la técnica de hisopado y sedimentación, se aprecia que dichas UFC/mm³ se encuentran dentro de lo permitido por las normas COVENIN (1337-90), las cuales pueden ser un máximo de 20 UFC/mm³. Es de interés tener en cuenta que a pesar de que las UFC es-

tén dentro de lo permitido, esto no garantiza la totalidad de la calidad de los productos, ya que una sola espora puede alterar los caracteres del producto y así causar daños a los seres humanos consumidores del mismo [9].

Como se puede ver en la Tabla 2, en el presente estudio los agentes identificados con mayor predominio fueron: *Cladiosporum oxysporum*, *Aspergillus niger* y *Rhizopus spp.*, estos están asociados a contaminación de los alimentos y posterior daño a la salud de los consumidores. Sin embargo, es importante tomar en cuenta el resto de los agentes identificados que aunque estén en menor proporción, también pueden encontrarse involucrados en el deterioro de los alimentos. Cabe destacar que Rainer y col. [3] establecieron que los hongos productores de meta-

bolitos tóxicos están ampliamente difundidos en el medio ambiente y son contaminantes frecuentes de los alimentos siendo el medio más fácil y rápido de transporte, especialmente los de origen vegetal, estos pueden contaminarse cuando los hongos se desarrollan durante la cosecha, el almacenamiento o el procesamiento de los alimentos. Las especies toxicogénicas de mayor importancia pertenecen a tres géneros: *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. En este sentido la presencia de mohos pertenecientes a estos géneros fue preponderante en el presente trabajo por lo cual esto pudieran ocasionar problemas durante el procesamiento, almacenamiento y consumo de los alimentos.

A nivel ambiental los análisis realizados, depende de la existencia de gran variedad de hongos filamentosos entre ellos la distinta especie del género *Aspergillus* los cuales se asocian como contaminantes comunes en distintos alimentos sobre todo los cereales, causando problemas de deterioro y lo más grave produciendo micotoxinas [12]. La presencia de estos hongos como: *Aspergillus niger*, *Cladiosporum oxysporum*, *Aspergillus flavus* y *Rhizopus spp.*, tal como se observa en la Tabla 3 quienes fueron los de mayor número de aislamientos, poseen la potencialidad de inducir deterioro si llegan a colonizar a los cereales almacenados, así mismo ellos presentan la capacidad de causar alergias en el consumidor del producto. Los síntomas que se pueden desarrollar ante una reacción alérgica o intoxicación por micotoxinas son muy variados van desde erupciones en la piel hasta problemas hepáticos, estos pueden variar entre los individuos al igual que la gravedad de los síntomas, el principal causante de esto es el *Aspergillus flavus* [9], y es de gran importancia destacar este agente debido a su alto número de aislamientos.

Conclusiones

Los resultados obtenidos fueron los suficientemente característicos de la flora fúngica ambiental, debido a su diversidad y su amplia distribución, ya que en todas las áreas se encontraron microorganismos. La existencia de estos agentes corrobora su amplia distribución a nivel mundial y al mismo tiempo que es muy difícil poder eliminar a estos del ambiente laboral.

El total de unidades formadoras de colonias que se lograron contabilizar, están dentro de los valores permitidos, haciendo hincapié que esto no garantiza que los productos estén libre de estos agentes.

La especie con mayor número de aislamiento fue *Cladiosporum oxysporum*, siendo éste de interés, por ser productor de micotoxinas y por lo tanto, capaz de poner en riesgo la producción, la calidad del producto y la salud de los consumidores. Otra especie importante aislada productora de micotoxinas fue el *Aspergillus niger*, siendo necesario mantener el monitoreo constante de estas especies.

Mediante la técnica de sedimentación por placa el número de unidades formadoras de colonias, mantienen el control según lo exige la ley. Dentro de las áreas de producción específicamente el área de empaque experimenta el mayor número de unidades formadoras de colonias (UFC/mm³), esto se debe a su cercanía con la entrada y salida de la planta.

Dentro de los alimentos manufacturados por la empresa se encuentran cereales, frutos, entre otros, teniendo los mismos un alto riesgo de contaminación por estos microorganismos, por lo tanto, es difícil para la empresa erradicar por completo a estos agentes.

Referencias Bibliográficas

- (1) Bleve, G., Rizzotti, L., Dellaglio, F., Torriani, S. *Development of Reverse Transcription (RT)-PCR and Real-Time RT-PCR Assays for Rapid Detection and Quantification of Viable Yeasts and Molds Contaminating Yogurts and Pasteurized Food Products*. J. Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69 (7), 4116-4122.
- (2) Bennett, J., Klich, M. *Mycotoxins*. Rev. Clin. Microbiol. (2003); 16 (3), 497-516.
- (3) Rainer J, Peinther U, Pöder R. Biodiversity and concentration of airborne fungi in a hospital environment. [Versión Electrónica] 2001. [Citado 01Mayo 2007] Disponible: <http://www.aaem.pl/pdf/13099.pdf>
- (4) Silva S, Sepúlveda M, Vásquez R, Teperman J, Rodríguez L, Parra M, Kimmelman G. Compendio de aspectos teóricos, prácticos en el manejo de áreas de contaminación controlada. Instituto de Salud Pública de Chile. Chile: Editorial Universitaria; 1984, p 25-28.
- (5) Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. 5^{ta} Ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1999.
- (6) Campbell C. Identification of Pathogenic Fungi Madrid Public Health. *Laboratory Service London*. 1996. [Citado: 02 Marzo 2007] Disponible: http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_488.htm
- (7) Pontón J, García M, López-Medrano R. Diagnóstico basado en métodos independientes del cultivo. Revista Iberoamericana de Micología. Asociación Española de Micología. [Revista en Línea]. 2001; 14; 1pp [Citada: 2007, Mayo 19].
- (8) Koneman, R. *Micología Practica de Laboratorio*. 3ra Edición. Argentina. Editorial. Médica Panamericana. 1997. 47-182 pp.
- (9) Casas, R. *Micología General*. 2da Edición. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca. Caracas, 1994. 430-431 pp.
- (10) Weitzman Y, Kane J. Dermatophytes and agents of superficial mycosis. En: Balows A, Hausler W J, Hermann K L, et al (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. Washington DC, American Society for Microbiology, 1991. 601-616 pp.
- (11) Scott B. *Diagnóstico Microbiológico*. 11ava. Edición Buenos Aires-Argentina. Editorial Médica Panamericana. 2004.
- (12) Abouzied, M., Azcona, J., Braselton, W., Pestka, J. *Immunochemical Assessment of Mycotoxins in 1989 Grain Foods: Evidence for Deoxynivalenol (Vomitoxin) Contamination*. J. Appl. Environ. Microbiol. 1991; 57 (3), 672-677.