

3. TÉCNICAS

HOMOGENEIZACIÓN DEL MATERIAL

El material blando es agitado enérgicamente durante 2 minutos en un matraz con perlas de vidrio, o tratado en una licuadora durante 30 segundos o en un homogeneizador peristáltico durante 1 minuto, usando como diluyente una solución de peptona al 0,1% p/v (King 1992) adicionado de 0,05% de tween 80 p/v (Jarvis & Williams 1987). El material duro se muele en un molinillo de granos. También se puede emplear en algunos casos solución fisiológica, solución reguladora de fosfatos o agua destilada con o sin humectante (Hocking & Pitt 1992).

Para evitar el choque osmótico en los productos secos o jugos concentrados, se diluye con una solución de sacarosa o glucosa al 20% p/v y si se trata de productos salados se emplea un diluyente con 5% p/v de NaCl. Si la muestra tiene gran cantidad de azúcares y es muy ácida, se diluye (1 + 1) con solución de peptona al 0,1% p/v y se ajusta el pH a 3,5 - 4,0 (Jarvis & Williams 1987).

RECUESTO

Se hace una dilución seriada con el mismo diluyente, agitando continuamente el líquido y transfiriendo con rapidez las alícuotas para evitar la sedimentación de los esporos o células. Se deposita 0,1 mL de cada dilución en la superficie de una placa de medio vaciada en una caja de Petri de 9 cm de diámetro, y se extiende por la superficie con una fina varilla de vidrio doblada en ángulo. Se incuba dentro de una bolsa plástica acompañada de un vaso con agua para evitar la desecación, durante 3 a 7 días a 25°C en las regiones subtropicales, a 30°C en las tropicales y a 22°C en las templadas (Jarvis & Williams 1987). Se consideran las placas que tengan entre 10 y 100 colonias de mohos o levaduras (King 1992).

AI SLAMI ENTO

La técnica de dilución es también útil para el aislamiento de los hongos en los productos agrícolas, pero a veces conviene sembrar el inóculo tomado directamente de la superficie de material en estudio. En otros casos se depositan sobre el medio los granos o trozos de muestra, previamente desinfectados por inmersión sucesiva en etanol 70% v/v y en una solución al 10% v/v de agua lavandina concentrada durante 2 minutos, y enjuagados una vez con agua estéril (Akerstrand 1992).

CULTIVOS PUROS

Un cultivo puro de levaduras se obtiene dispersando el material tomado de la colonia a estudiar, mediante estrías sucesivas sobre la placa de medio. En cambio, un cultivo puro de mohos se obtiene por repique de un pequeño manojito de hifas o grumo de esporos en varios puntos de la placa de medio selectivo. En algunos casos esta técnica no es satisfactoria y entonces conviene hacer una dispersión de los esporos sobre la superficie de agar estéril. Si son suficientemente grandes se ven con una lupa estereoscópica y con una aguja se toma el trozo de agar que contiene al espora y se lo transfiere al medio de cultivo (Pitt & Hocking 1997).

MEDIOS PARA RECUESTO Y AI SLAMI ENTO

Con el fin de evitar el desarrollo exuberante de los mucorales se usa alguno de los medios de cultivo siguientes (Jarvis & Williams 1987).

El medio Rosa de Bengala-Dicloran es selectivo para el aislamiento y recuento de levaduras y mohos significativos en el deterioro de alimentos (Frisvad *et al.* 1992), pero también el medio Rosa de Bengala es conveniente para aislar los hongos porque reduce la extensión de las colonias sin afectar la germinación de las esporas (Jarvis & Williams 1987).

Rosa de Bengala

agua	1 L	fosfato dipotásico	1 g
peptona	5 g	glucosa	10 g
sulfato de magnesio heptahidrato	0,5 g	rosa de Bengala (5% p/v agua)	0,5 mL
cloranfenicol	0,1 g	agar	15 g
pH	7,2		

Rosa de Bengala- Diclorán

agua	1 L	fosfato monopotásico	1 g
peptona	5 g	glucosa	10 g
sulfato de magnesio heptahidrato	0,5 g	rosa de Bengala (5% p/v agua)	0,5 mL
cloranfenicol	0,1 g	diclorán (0,2% p/v etanol)	1 mL
agar	15 g	pH	5,8

Se esterilizan a 120°C durante 15 minutos y se guardan en la oscuridad para evitar la formación de un compuesto inhibidor por degradación fotoquímica del colorante. Las soluciones de dicloran y rosa de Bengala se conservan en el refrigerador y no es necesario esterilizarlas. El diclorán se conoce también como botrán y es la 2,6 dicloro 4-nitroanilina (Jarvis & Williams 1987). El cloranfenicol es termoestable, pero puede ser reemplazado por otros antibióticos que se agregan asépticamente al medio estéril fundido, tal como clortetraciclina (10 mL de solución acuosa al 1% p/v en 1 L de medio). Se incuba comúnmente a 25°C durante 5 días (Pitt & Hocking 1997).

Glicerol- Diclorán

agua	1 L	glucosa	10 g
peptona	5 g	fosfato monopotásico	1 g
sulfato de magnesio heptahidrato	0,5 g	cloranfenicol	0,1 g
glicerol	220 g	agar	15 g
dicloran (0,2% p/v etanol)	1 mL	pH	5,6

Se esteriliza a 120°C durante 15 minutos. Se usa para las muestras con una actividad del agua menor que 0,95. Se incuba comúnmente a 25°C durante 7 a 21 días (Hocking 1992). Crece la mayoría de los hongos xerófilos pues tiene una actividad del agua de 0,95 y un pH 5,6 (Kinderlerer & Phillips-Jones 1992). Por otra parte suprime las bacterias y restringe los mohos permitiendo el crecimiento, pero con lentitud, de levaduras (Deák 1992).

MEDIOS COMUNES

Papa-Glucosa / Papa-Sacarosa

Se ralla 250 g de papa con cáscara blanca y se agrega 1 L de agua. Se calienta en autoclave a ½ kg/cm² durante 45 minutos. Luego se filtra por gasa, se repone el agua perdida y se agrega 20 g de glucosa o sacarosa y 20 g de agar. Se esterilizan 15 minutos a 120°C (Seifert 2000).

Czapek-Levadura

agua	1 L	fosfato dipotásico	1 g
solución concentrada de sales	10 mL	extracto de levadura	5 g
sacarosa	30 g	agar	15 g

Se esteriliza 15 minutos a 120°C. Es utilizado junto con Malta-Glucosa y Czapek-Glicerol (Pitt 1988, Klich & Pitt 1988) para la identificación de *Penicillium* y *Aspergillus*

Solución concentrada de sales (Pitt 1988)

agua destilada	100 mL	nitrate de sodio	30 g
cloruro de potasio	5 g	sulfato de magnesio heptahidrato	5 g
sulfato ferroso heptahidrato	5 g	Se conserva al ambiente en frasco cerrado.	

Malta-Glucosa

agua	1 L	extracto de malta	20 g
peptona	1 g	glucosa	20 g
agar	20 g	Se esteriliza 15 minutos a 120°C.	

Este medio es utilizado junto con Czapek-Levadura y Czapek-Glicerol (Pitt 1988, Klich & Pitt 1988) para la identificación de *Penicillium* y *Aspergillus*, pero también se emplea en el aislamiento y recuento de las especies de *Fusarium* (Jarvis & Williams 1987).

Czapek-Glicerol

medio Czapek	750 mL	glicerol p.a.	250 mL
--------------	--------	---------------	--------

Se esteriliza 15 minutos a 120°C. Es utilizado junto con Czapek-Levadura y Malta-Glucosa para la identificación de *Penicillium* y *Aspergillus* (Pitt 1988, Klich & Pitt 1988)

Czapek- Sacarosa 20

agua	1 L	fosfato dipotásico	1 g
extracto de levadura	5 g	solución concentrada de sales	10 mL
agar	15 g	sacarosa	200 g

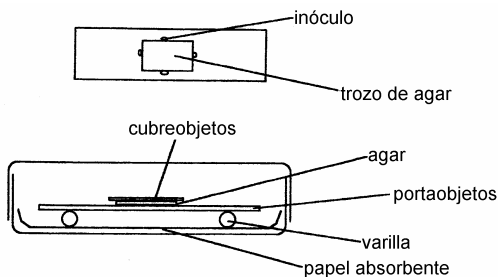
Se esteriliza 20 minutos a 110°C. Es utilizado para la identificación de *Penicillium* y *Aspergillus* xerófilos (Pitt & Hocking 1997).

Zapallo

Se pica 250 g de zapallo, calabaza o cayote y se agrega 1 L de agua. Se calienta a ebullición durante 30 minutos. Luego se filtra por gasa, se repone el agua perdida y se agrega 20 g de agar. Se esteriliza 15 minutos a 120°C. Se logra una buena esporulación de *Fusarium* y otros hongos toxigénicos incubando a temperatura ambiente con alternancia de luz solar indirecta y oscuridad (Carrillo 1977).

Método de Pitt para identificación de *Penicillium*, *Aspergillus* y otros hongos

Se deposita el inóculo en tres puntos equidistantes de cada placa de los medios Malta-Glucosa, Czapek-Levadura y Czapek-Glicerol vaciados en sendas caja de Petri medianas, que se incuban a 25°C durante 7 días y si es necesario se prolonga hasta 14 ó 21 días. También se inoculan dos placas de Czapek que se incuban a 5 y 37°C, respectivamente, durante 7 días. Con los resultados obtenidos se accede a las claves (Pitt 1988, Klich & Pitt 1988, Pitt & Hocking 1997).



Microcultivo

Se deposita un cuadrado del medio Zapallo o Papa estéril sobre un portaobjetos previamente flameado y frío. Se siembra el hongo en sus bordes. Se coloca un cubreobjetos que también fué flameado y enfriado. Se apoya el conjunto sobre dos varillas de vidrio, dentro de una caja de Petri en cuyo fondo hay un papel absorbente estéril embebido en agua. Se incubaba a

temperatura ambiente con alternancia luz solar indirecta y oscuridad durante el tiempo necesario (Dade & Gunnell 1969). La figura 3.1. muestra un esquema de la preparación de un microcultivo.

Malta-Sacarosa

agua	1 L	sacarosa	30 g
extracto de malta	15 g	bilis desecada	2 g
extracto de levadura	5 g	nitrate de sodio	0,5 g
triptona	2 g	agar	20 g

Se esteriliza 20 minutos a 110°C, se enfría a 45-50°C y se agrega 10 mL de solución estéril de cloranfenicol al 0,5% y 10 mL de solución estéril de clortetraciclina al 0,5%. Es un medio para aislamiento y recuento de mohos y levaduras (Skaar & Stenwig 1996).

Papa-Zanahoria

Se rallan 150 g de papa sin pelar y 150 g de zanahoria. Se agrega 1 litro de agua y se cuece durante una hora. Se cuela por un tamiz o gasa. Se repone el agua perdida y se agrega 20 g de agar. Se esteriliza a 120°C durante 15 minutos (Dade & Gunnell 1969). Se incuba a 25°C con alternancia de luz fluorescente y oscuridad para favorecer el crecimiento de hongos dematiáceos. Es especialmente útil para observar la morfología de las especies de *Alternaria* (Andersen *et al.* 2002).

MEDIOS SELECTIVOS

Medio para *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* (Pitt & Hocking 1997)

agua	1 L	extracto de levadura	20 g
peptona	10 g	citrate férrico amoniacal	0,5 g
cloranfenicol	0,1 g	dicloran (0,2% p/v etanol)	1 mL
agar	15 g	pH final	6,2

Se esteriliza a 120°C durante 15 minutos. En este sustrato las colonias de *A. flavus* y *A. parasiticus* tienen el reverso de color amarillo anaranjado, notable después de incubar 48 hs a 30°C por la presencia de los ácidos aspergílicos. También *A. oryzae* produce esa pigmentación, pero su distribución está casi restringida a los productos fermentados asiáticos. Dentro de las 48 hs de crecimiento las colonias de *A. niger* se ven de color amarillo, pero luego comienzan a madurar los conidios negros (Pitt 1992).

Peptona-Diclorán para *Fusarium* (Andrews & Pitt 1986)

agua	1 L	peptona	15 g
fosfato monopotásico	1 g	sulfato de magnesio heptahidrato	0,5 g
cloranfenicol	0,1 g	agar	15 g
dicloran (0,2% p/v en etanol)	1 mL	Se esteriliza 15 minutos a 120°C.	

Favorece la formación de los conidios de *Fusarium* y además es útil para el aislamiento de hongos de micelio oscuro tales como *Alternaria*, *Curvularia* y *Drechslera* (Pitt & Hocking 1997). El agregado de violeta cristal (0,5 mg/L) refuerza la inhibición de *Aspergillus* y *Penicillium*, mejorando el recuento de *Fusarium*. Se incuba a 25°C durante 5 días (Conner 1992).

Papa-Glucosa-Diclorán

Papa-Glucosa (ver página anterior)	1 L	sulfato de zinc heptahidrato (1%p/v)	1 mL
sulfato de cobre pentahidrato (1 % p/v)	0,5 mL	cloranfenicol	0,1 g
dicloran (0,2% p/v en etanol)	1 mL	pH	6,5-7

Se esteriliza a 120°C durante 15 minutos. Después de enfriar a 60°C se agrega 1 mL de la suspensión de prodiona al 0,3% p/v. Se incuba a temperatura ambiente durante 7 días bajo la alternancia de luz fluorescente + luz negra (o luz solar indirecta) con oscuridad. Este es un medio selectivo para *Fusarium* pero también desarrolla *Alternaria* (Thrane *et al.* 1992).

Medio de esporulación para *Fusarium*

agua	1L	almidón	0,2g
glucosa	0,2 g	sacarosa	0,2 g
fosfato monopotásico	1 g	nitrate de potasio	1 g
cloruro de potasio	0,5 g	sulfato de magnesio heptahidrato	0,5 g
agar	20 g	trozos de papel de filtro	20 g

Se esteriliza a 120°C durante 15 minutos. Se incuba a temperatura ambiente durante 7 días bajo la alternancia de luz fluorescente + luz negra con obscuridad (Booth 1977).

Agar Agua

agua corriente	1 L	agar	15 g
----------------	-----	------	------

Se esteriliza a 120°C durante 15 minutos y se distribuye en placas. Se colocan unos trozos de hojas de clavel u bananero previamente esterilizadas por vapores de formaldehído. Es un medio especial para *Fusarium* y algunas especies dematiáceas. Se incuba a temperatura ambiente bajo la alternancia de luz fluorescente + luz negra con obscuridad (Seifert 2000). También útil para aislar endófitos de granos cuya superficie fue desinfectada.

Malta-Diclorán

agua	1 L	extracto de malta	10 g
agar	20 g	cloranfenicol	0,1 g
diclorán (0,2% p/v etanol)	1 mL	Se esteriliza 15 minutos a 120°C.	

Incubar a 25°C durante 7 días con alternancia de luz fluorescente + luz negra (o luz solar indirecta) y obscuridad. Este medio permite el aislamiento de *Alternaria* y diferenciación de algunas especies comunes en cereales, así como de otros hongos dematiáceos (Andrews 1992b).

Sacarosa- Dicloran

agua corriente	1 L	extracto de levadura	20 g
sacarosa	150 g	cloranfenicol	0,1 g
agar	15 g	rosa de Bengala (5% p/v)	0,5 mL
dicloran (0,2% en etanol)	1 mL	pH final	5,6

Se esteriliza 20 minutos a 110°C. En este medio las colonias de *P. verrucosum* (productor de ocratoxinas) tienen un reverso pardo violáceo o pardo rojizo, mientras que las de los otros *Penicillium* terverticilados *P. viridicatum*, *P. aurantiogriseum* presentan el reverso amarillo. La pigmentación de *P. verrucosum* también se observa sobre el medio sin inhibidores. Los recuentos de *Penicillium* no tienen una diferencia significativa con los obtenidos en Rosa de Bengala-Diclorán (Frisvad *et al.* 1992). Se incuba comúnmente a 25°C durante 1 semana.

Creatina- Diclorán (Frisvad *et al.* 1992)

agua	1 L	creatina monohidrato	3 g
sacarosa	30 g	fosfato monopotásico	1 g
cloruro de potasio	0,5 g	sulfato de magnesio heptahidrato	0,5 g
sulfato ferroso heptahidrato (1% p/v)	1 mL	sulfato de zinc heptahidrato (1% p/v)	1 mL
sulfato de cobre pentahidrato (1% p/v)	0,5 mL	púrpura de bromocresol	50 mg
cloranfenicol	0,1 g	agar	20 g
dicloran (0,2% p/v en etanol)	1 mL	pH	4,8

Se esteriliza 20 minutos a 110°C. Este medio permite la recuperación de *P. roqueforti*, *P. expansum* y otros penicilios terverticilados, así como de los *Aspergillus versicolor* y *A. sydowii*. Se incuba comúnmente durante 7 días a 25°C (Filténborg *et al.* 1992).

Creatina-Sacarosa

Es el medio anterior sin dicloran. Se usa para identificación de los *Penicillium* terverticilados (Pitt & Hocking 1997).

Malta-Sal

El medio Malta (ver página anterior) con 7,5% de NaCl tiene aproximadamente la misma actividad de agua que el Glicerol- Diclorán, pero no permite el desarrollo de los conidios afectados por el calor (Hocking 1992). Los hongos toxigénicos *A. alutaceus* (= *A. ochraceus*), *A. flavus*, *A. parasiticus*, *P. aurantiogriseum* y *P. viridicatum* pueden crecer sobre ambos medios. Se incuba a 25-27°C durante 1 a 4 semanas.

Malta-Sal-Glucosa

agua	1 L	extracto de malta	20 g
extracto de levadura	5 g	cloruro de sodio	100 g
glucosa	120 g	agar	20 g

Se calienta en autoclave con vapor fluente durante 30 minutos o en baño de agua hirviendo, y se usa de inmediato. La actividad del agua de este medio es 0,88 y favorece el crecimiento de los hongos provenientes de productos salados, una modificación del mismo contiene solamente 5% de NaCl y una actividad acuosa de 0,93. Se incuba a 25-27°C durante 1 a 4 semanas (Pitt & Hocking 1997).

Malta-Glucosa 50

agua	500 mL	extracto de malta	10 g
extracto de levadura	2,5 g	agar	20 g
glucosa	500g		

Se calienta en autoclave con vapor fluente durante 30 minutos y se usa de inmediato. Los hongos xerófilos extremos desarrollan mejor sobre este medio que tiene una actividad de agua de 0,89. Se incuba a 25-27°C durante 7 a 21 días (Pitt & Hocking 1997).

Medio para *Wallemia sebi*

agua	100 mL	cloruro de sodio	10 g
glicerol p.a.	0,5 g	glucosa	1 g
peptona	1,5 g	jugo fresco de naranja	1-3 mL
pH	4,8	Se esteriliza a 110°C durante 20 minutos.	

Incubar a 20-30°C durante 5 a 15 días. El medio de Schoop permite el desarrollo de hongos xerófilos (Jarvis & Williams 1987).

Medios para hongos termorresistentes

Se emplean matraces conteniendo 25 mL del medio Papa-Glucosa (ver página anterior) con una doble concentración de sus ingredientes sólidos y adicionado de 0,2% p/v de cloranfenicol. Una vez esterilizado y aún fundido, se mezcla con igual volumen de la dilución 1+1 de la muestra previamente mantenida a 80°C durante 10 minutos, se agita y vuelca en las cajas de Petri. Se incuban a 30°C durante 7 a 28 días dentro de las bolsas plásticas junto a un vaso con agua para evitar la desecación (Pitt *et al.* 1992).

Glucosa-Nitrato (Bullerman & West 1992)

agua	1 L	glucosa	20 g
fosfato monopotásico	0,5 g	nitrato de sodio	2 g
sulfato de magnesio heptahidrato	0,5 g	sulfato ferroso (1% p/v agua)	1 mL
agar	20 g	Se esteriliza 15 minutos a 120°C	

Las levaduras que pueden asimilar los nitratos crecen en este medio.

Medio de Wallerstein para levaduras

agua	1 L	glucosa	50 g
fosfato monopotásico	0,55 g	hidrolizado de caseína	5 g
cloruro de calcio dihidrato	0,125 g	extracto de levadura	4 g
sulfato de magnesio heptahidrato	0,125 g	cloruro de potasio	0,425 g
cloruro férrico hexahidrato	2,5 mg	sulfato de manganeso tetrahidrato	2,5 mg
verde de bromocresol	22 mg	agar	20 g
pH	5,5	Se esteriliza a 110°C durante 20 minutos.	

Se emplea este medio para la prueba de esterilidad dado que el medio Rosa de Bengala-Dicloran puede reducir el crecimiento de algunas levaduras (Andrews 1992a).

Malta-Cloranfenicol para levaduras

Para el recuento y aislamiento se emplea el medio Malta (ver página anterior) adicionado de 0,1 g de cloranfenicol /L, que se incuba a 25-30°C en anaerobiosis 3 días con el fin de inhibir el crecimiento de los mohos y luego 2 días en el aire (Pitt & Hocking 1997).

Triptona-Glucosa para levaduras (Pitt & Hocking 1997)

agua	1 L	triptona	5 g
extracto de levadura	5 g	glucosa	100 g
cloranfenicol	0,1 g	agar	15 g
pH final	5,5-6	Se esteriliza 20 minutos a 110°C.	

Malta- Acético

Para obtener levaduras de materiales muy ácidos se agrega 5 mL de ácido acético glacial a 1 L del medio Malta estéril, fundido y tibio. Se mezcla y vuelca inmediatamente en las cajas de Petri. Las cepas productoras de ácido acético desarrollan en este medio (Pitt & Hocking 1997).

Acetato para esporulación de levaduras

agua	1 L	acetato de sodio	3 g
agar	15 g	pH (ajustado con ácido acético)	6,5

Se esteriliza 15 minutos a 120°C. Se deposita abundante inóculo y se incuba a 25-30°C. Este medio favorece la formación de basidiosporos en las levaduras teleomórficas (Collins *et al.* 1999).

Prueba de fermentación para levaduras

agua	1 L	extracto de levadura	2,5 g
peptona	7,5 g	pH	7

Se reparte en tubos (13 x 130 mm) con un tubito (6 x 40 mm) invertido dentro, a razón de 4 mL en cada uno. Se esteriliza a 120°C durante 15 minutos. A cada tubo se agrega 2 mL de una solución al 10% p/v de glúcido (glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, rafinosa u otra) esterilizada por filtración. Se incuba a 25-30°C. El gas producido durante la fermentación queda atrapado en el tubito invertido (Collins *et al.* 1999).

Prueba de asimilación para levaduras

agua corriente	1 L	sulfato de amonio	5 g
fosfato monopotásico	1 g	sulfato de magnesio heptahidrato	0,5 g
extracto de levadura	0,1 g	Se reparte a razón de 4 mL en cada tubo.	

Se esteriliza 15 minutos a 120°C. A cada tubo se agrega 2 mL de una solución al 10% p/v de glúcido u otro (celobiosa, eritritol, galactosa, inositol, maltosa, manitol, melibiosa, rafinosa, trehalosa o xilosa) esterilizada por filtración. Se utiliza glucosa como testigo positivo. Se incuba a 25-30°C. Este

medio se usa para observar la asimilación de un determinado compuesto como única fuente de carbono (Collins *et al.* 1999).

Prueba de ureasa

agua	1 L	peptona	1 g
glucosa	5 g	cloruro de sodio	5 g
fosfato monopotásico	3 g	fosfato disódico	3 g
agar	15 g	rojo de fenol	0,01 g

Se reparte a razón de 10 mL en cada tubo y se esteriliza a 120°C durante 15 minutos. A cada tubo con el medio fundido se agrega 1 mL de una solución de urea al 10% p/v, esterilizada por filtración. En este medio la hidrólisis de la urea se manifiesta por un color rojo (Collins *et al.* 1999).

Sinonimia

AFPA: Medio para *A. flavus-A. parasiticus*

CSN: Creatina-Sacarosa

CY20S: Czapek-Sacarosa 20

DCPA: Peptona-Diclorán

DRBC: Rosa de Bengala-Diclorán

DRYS: Sacarosa-Diclorán

MAA: Malta-Acético

MSA: Malta-Sal

MY50: Malta-Glucosa 50

PDID: Papa-Glucosa-Diclorán

RBC: Rosa de Bengala

CREAD: Creatina-Diclorán

CYA: Czapek-Levadura

DCMA: Malta-Diclorán

DG18: Glicerol-Diclorán

DRYES: SacaRosa-Diclorán

G25N: Czapek-Glicerol

MEA: Malta-Glucosa

MY10-12: Malta-Sal-Glucosa

PDA: Papa-Glucosa

PSA: Papa-Sacarosa

MYSa: Malta-Sacarosa

OTROS PROCEDIMIENTOS

Pruebas Inmunológicas

Los *Aspergillus* y *Penicillium* pueden ser detectados por la técnica de ELISA (ensayo de un inmunoabsorbente unido a una enzima) o el método de aglutinación de partículas de látex (sensibilizadas con inmunoglobulinas específicas). Los exopolisacáridos implicados tienen por epitopes unos oligómeros de galactofuranosa con uniones β (1,5), que son estables al calor y extraíbles con agua, facilitando la detección de estos mohos aún después de un tratamiento térmico del alimento (Kamphuis & Notermans 1992). También los *Fusarium*, Mucorales y otros hongos pueden ser determinados por la técnica de ELISA que es sensible, rápida y confiable para numerosos productos alimenticios (DeRuiter *et al.* 1992, Nicholson 2001).

Ergosterol

El ergosterol es un componente de la membrana celular que está relacionado con la biomasa de los hongos aunque el contenido varía según las condiciones de crecimiento y el método de valoración (Charcosset & Chauvet 2001). Para un cultivo sin esporular de *Fusarium* sp. hay correlación entre longitud hifal, recuento de colonias y contenido de ergosterol, pero en el caso *Penicillium* sp. o *Rhizopus* sp. que forman numerosas esporas no existe una buena correspondencia entre los tres valores (Schnurer 1993).

Otras técnicas

El método impedimétrico para el recuento de mohos es una técnica rápida, aplicable en condiciones definidas para un alimento determinado (Moss 1992). La valoración de la quitina de las paredes fúngicas permite estimar la biomasa fúngica si no hay insectos (Bishop *et al.* 1982). La microscopía de las preparaciones fluorescentes se usa por ejemplo para diferenciar levaduras vivas de muertas (Jarvis & Williams 1987).

Coloración de ascosporas

Se hace un extendido de la levadura en portaobjetos y se fija por calor. Se con verde de malaquita al 1% y se calienta varias veces hasta que salgan vapores, durante unos 5 minutos. Luego se lava con agua y se coloca safranina al 1% dejándola un minuto. Se lava y seca la preparación antes de observar al microscopio (Collins *et al.* 1999).

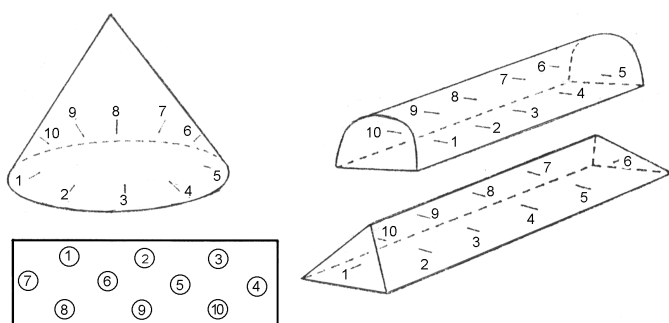
Preparación húmeda

Se coloca una gota de lactofenol o azul-lactofenol sobre un portaobjetos. Se toma con un alambre doblado en gancho, una pequeña porción del hongo y se lo pone en la gota. Se dilacera y acomoda el material con la ayuda de dos agujas. Luego se calienta suavemente el portaobjetos sobre una llama pequeña y se deposita el cubreobjetos. Las espora secas y pulverulentas son difíciles de humedecer y pueden incorporar burbujas de aire al líquido. Esta dificultad se evita tocando la gota de lactofenol, después de haber incorporado el hongo, con una varilla de vidrio mojada en alcohol pero no goteando. El lactofenol se prepara mezclando 20 g de cristales de fenol, 16 mL (20 g) de ácido láctico, 31 mL (40 g) de glicerina pura y 20 mL de agua. Para preparar el azul-lactofenol se reemplaza el agua por una solución acuosa de azul de algodón al 0,05% p/v (Dade & Gunnell 1969).

MUESTREO PARA ANÁLISIS DE MICOTOXINAS

En los cereales, oleaginosas, harinas, alimentos mixtos, almacenados a granel se suelen encontrar bolsillos de contaminación debido, entre otras causas, a la inadecuada ventilación del lugar de almacenamiento o a las variaciones de la temperatura exterior que posibilitan corrientes convectivas moviendo la humedad hacia la parte superior del producto o el techo donde se condensa, y el goteo posterior permite el desarrollo de los hongos cuyos esporos están naturalmente en las superficies de los

granos o las paredes. Al muestrear un lote se debe tomar un número de pequeñas muestras de diferentes lugares, como se observa en la figura 3.2, para reducir los errores posibles en esta etapa (Campbell *et al.* 1988). El cuadro 3.1 indica, a modo de ejemplo, el tamaño de muestra utilizado en algunos casos para el análisis de micotoxinas.



Cuadro 3.1. Tamaño de las muestras a tomar en lotes de varios productos (Campbell *et al.* 1988).

PRODUCTO	TAMAÑO DEL LOTE	N° UNIDADES DE MUESTRA	TAMAÑO (kg)	
			UNIDAD	TOTAL
Nueces de Parácon cáscara	<200 bolsas	20	0,5	10
	201-800 "	40	0,5	20
	801-2000 "	60	0,5	30
Nueces, inicial	a granel	10	0,5	5
" presencia presuntiva de toxinas	"	50	0,5	25
Maníes	"	48	0,5	24
Semillas algodón	"	15	2	30
Maíz, sorgo, trigo, cebada	"	10	0,5	5
Alimento mixto molido fino	"	10	0,5	5
Frutas secas	"	50	0,5	25
Leche	"	"	"	5

Unos 25 kg pueden ser representativos tanto de un lote de 50 toneladas como de uno de 2 toneladas. Un mayor tamaño de la muestra hace más confiable al resultado pero está limitado por el costo. Otro factor son las dimensiones de cada grano o pepita. Debido a que el error es inversamente proporcional al número de partículas es necesario, por ejemplo, una muestra mayor de nueces de Pará (8-10 g cada una) que de maníes (0,5 g cada uno) (Campbell *et al.* 1988). Un grano de maíz, por ejemplo, puede contener entre 0 y 250 µg de aflatoxinas y se requiere un gran número de semillas contaminadas para que la concentración de toxina en la muestra determine el rechazo del lote (Whitaker 1994).

El paso siguiente es la preparación de la muestra. Consiste en una molienda gruesa del material (tamiz 3,1 mm) y la toma de una submuestra de 0,5 - 1 kg para molerla nuevamente (tamiz 1,0 mm) antes de sacar la porción de 50 - 100 g que se analizará (Whitaker 1994).

Cuadro 3.2. Niveles máximos aceptados de algunas micotoxinas (Van Egmond 1991, Ramos & Santis 1996).

PAÍS	PRODUCTO	TOXINA	TOLERANCIA µg/kg	MÉTODO DE ANÁLISIS
Argentina	maníes	aflatoxinas	20	...
	leche y derivados	"	0,1-5,0	...
Brasil	harina mani exportac.	"	50	...
	maíz	ocratoxina A	50	...
	"	zearalenona	200	...
Australia	harina lupino	fomopsina	5	...
Bélgica	alimentos	esterigmatocistina	no detectable	...
Canadá	forrajes	aflatoxinas	20	HPLC
	trigo	DON*	2.000	...
España	alimentos	aflatoxina B ₁	5	...
	pienso lecheras	"	10	TLC
	otros forrajes	"	50	TLC
E.E.U.U.	alimentos trigo	DON	1.000-2.000	TLC, HPLC
	forrajes	aflatoxinas	20	TLC, HPLC
	trigo p/piensos	DON	4.000	TLC
Dinamarca	derivados cerdo	ocratoxina A	25	...
Francia	jugo manzana	patulina	50	...
	granos p/piensos	aflatoxina B ₁	300	...
Israel	forrajes	toxina T-2	100	...
	"	DAS*	100	...
Italia	maníes	aflatoxinas	50	...
Rumania	forrajes	toxinas <i>Stachybotrys</i>	no detectables	...
	"	quetomina	no detectable	...
Senegal	maníes p/piensos	aflatoxinas	300	TLC
Suecia	leche	aflatoxina M ₁	0,05	...
	pienso pollos	aflatoxinas	5	TLC
	"	ocratoxinas	1.000	fluorométrico
	"	DON	2.000	TLC
	pienso cerdos	ocratoxinas	200	fluorométrico
	"	DON	400	TLC
Taiwan	torta mani	aflatoxinas	1000	...

* DAS: diacetoxiscirpenol, DON: desoxinivalenol

El procedimiento analítico comúnmente tiene cuatro pasos: extracción de las toxinas, limpieza del extracto, concentración y determinación cuantitativa. La extracción se hace moliendo la submuestra o una porción de la misma con un solvente. Se toma una alícuota para proceder a la limpieza eliminando grasas u otros compuestos que interfieren con el proceso cuantitativo. Éste se hace por alguno de los tres métodos corrientes: cromatografía en capa fina, inmunoensayo o cromatografía líquida de alta resolución. Aún cuando, por ejemplo, el lote es de 25 toneladas, la muestra de 25 kg y la submuestra de 250 g, el resultado del análisis proviene de 1 g de muestra. Este valor se usa para estimar la concentración en el lote. El error analítico se puede reducir aumentando las alícuotas cuantificadas o usando una técnica más

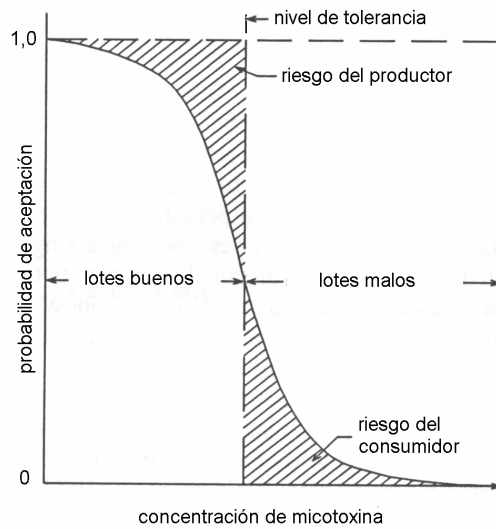


Figura 3.3. Curva de operación para evaluar los planes de muestreo.

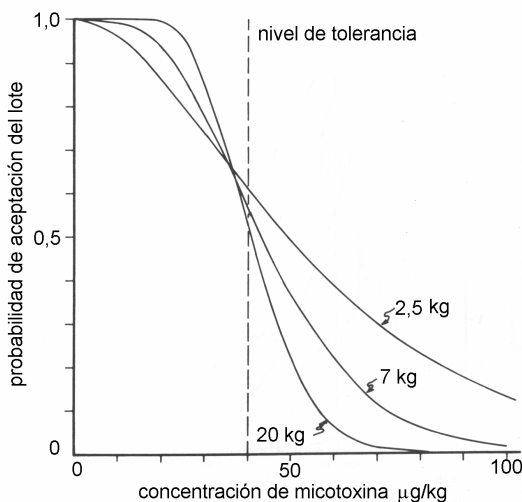


Figura 3.4. Efecto del tamaño de la muestra sobre la curva de operación.

probabilidad en función de la concentración da la curva de operación que se observa en la figura 3.3. Para un determinado plan de muestreo, la forma de la curva está definida por el tipo de producto, el tamaño de la muestra, el grado de la molienda, el tamaño de la submuestra, el tipo de método analítico, la concentración de toxina en el lote, el nivel de tolerancia y la distribución probable de la toxina dentro del lote (FAO 1993).

sensible (Whitaker 1994). En el cuadro 3.2 se dan los niveles de tolerancia de algunas micotoxinas en alimentos y forrajes en varios países.

Cuando se usa un plan de muestreo, los lotes del producto con una determinada concentración de micotoxina serán aceptados de acuerdo a la probabilidad de que el resultado del análisis hecho sobre la muestra, sea menor o igual al nivel de tolerancia establecido. Un gráfico de la

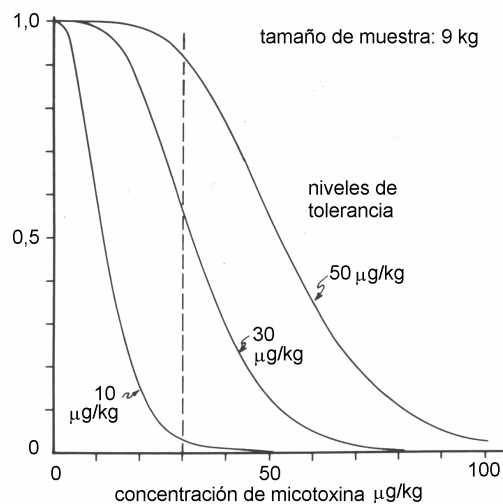


Figura 3.5. Efecto del nivel de tolerancia sobre la curva de operación.

Una curva de operación óptima es aquella donde los riesgos del productor y el consumidor (áreas sombreadas de la figura 3.3) han sido reducidos a niveles aceptables para ambos. Un aumento en el tamaño de la muestra trae como consecuencia un incremento de la pendiente alrededor del valor máximo permitido de toxina, reduciendo las áreas de riesgo. La figura 3.4 representa las curvas de operación al variar el tamaño de las muestras (Whitaker *et al.* 1991). Por ejemplo con un nivel de tolerancia de 25 μg de aflatoxinas/kg, cuando el tamaño de las muestras de semillas de algodón aumenta de 0,9 a 18 kg la probabilidad de aceptación de un lote con 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ decrece desde 44,5 a 1,4% mientras que la de un lote de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ aumenta desde 87,5 a 99% (Whitaker & Whitten 1977).

Por otra parte, cuando varía la definición de la calidad por un cambio del valor máximo de tolerancia de la toxina en la muestra, por ejemplo de 50 a 30 ó 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, disminuye la probabilidad de aceptación de la partida. La desventaja de reducir el valor máximo de toxina permitido, para evitar la posibilidad de aceptar lotes con alto contenido de la misma, es que disminuye también la probabilidad de aceptación de aquellos con bajas concentraciones como se observa en la figura 3.5 (Whitaker *et al.* 1991). El intento de armonización entre las naciones respecto a los valores de tolerancia de las micotoxinas para diversos productos alimenticios es llevado a cabo por la FAO y otras organizaciones.

REFERENCIAS

- Akerstrand K. 1992. Influence of medium on grain mycoflora observed by direct plating. pp. 341-343 en: *Modern Methods in Food Mycology*. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Andersen B *et al.* 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species-groups. *Mycological Research* 106: 170-182.
- Andrews S. 1992a. Comparative study of WL nutrient agar with DRBC and OGY for yeast enumeration in foods. pp. 61-65 en: *Modern Methods in Food Mycology*. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Andrews S. 1992b. Differentiation of *Alternaria* species isolated from cereals on dichloran malt extract agar. pp. 351-355 en: *Modern Methods in Food Mycology*. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Andrews S, Pitt JI. 1986. Selective media for *Fusarium* species and dematiaceous Hyphomycetes from cereals. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 1235-1238.
- Bishop RH *et al.* 1982. Estimation of fungal contamination in tomato products by a chemical assay for chitin. *Journal of Food Science* 47: 437 – 444.
- Booth C. 1971. The Genus *Fusarium*. CMI, Kew. cap. 2.
- Bullerman LB, West DI. 1992. Comparison of several media and methods for detection and enumeration of toxigenic *Fusarium* species. pp. 293-297 en: *Modern Methods in Food Mycology*. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Campbell AD, Whitaker TB, Pohland AE, Dickens JW, Park DL. 1988. Sampling, sample preparation and sampling plans for foodstuffs for mycotoxin analysis. *Pure & Applied Chemistry* 58: 305 – 314.
- Carrillo L. 1977. Búsqueda de cepas toxinogénicas de *Fusarium* en cayote y zapallo. pp. 286-287 en: *Actas de las VIII Jornadas y Primer Congreso Argentino de Micología*. Córdoba.
- Charcosset JY, Chauvet E. 2001. Effect of culture conditions on ergosterol as an indicator of biomass in the Hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2051-2055.
- Collins CH *et al.* 1999. Collins and Lyne's Microbiological Methods. 7^o ed. Butterworth-Heinemann, Oxford. cap. 5, 9.
- Conner DE. 1992. Evaluation of methods for selective enumeration of *Fusarium* species in feedstuffs. pp. 299-302 en: *Modern Methods in Food Mycology*. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Dade HA, Gunnell J. 1969. *Classwork with Fungi*. CMI, Kew.
- Deák T. 1992. Media for enumerating spoilage yeasts. pp. 31-38 en: *Modern Methods in Food Mycology*. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.

- De Ruiter GA *et al.* 1992. Immunochemical detection of Mucorales species in foods. pp. 221-227 en: Modern Methods in Food Mycology. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- FAO.1993. Sampling plans for aflatoxin analysis in peanuts and corn. Roma. pp. 29 - 35
- Filtenborg O *et al.* 1992. Simple indentation procedure for spoilage and toxigenic mycoflora of foods. pp. 263-273 en: Modern Methods in Food Mycology. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Frisvad JC *et al.* 1992. New selective media for the detection of toxigenic fungi in cereal products, meat and cheese. pp. 275-284 en: Modern Methods in Food Mycology. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Hocking A. 1992. Collaborative study on media for enumeration of xerophilic fungi. pp. 121-125 en: Modern Methods in Food Mycology. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Hocking A, Pitt JI. 1992. Introduction and summary of the first international workshop on SMMEF. pp. 3-7 en: Modern Methods in Food Mycology. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Jarvis B, Williams AP. 1987. Methods for detecting fungi in foods and beverages. pp. 599-636 en: Food and Beverage Mycology. Beuchat LR, editor. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Kamphuis HJ, Notermans S. 1992. Development of a technique for the immunological detection of fungi. pp.197-203 en: Modern Methods in Food Mycology. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Kinderlerer J, Phillips-Jones M. 1992. Mycology and spoilage of hazelnuts. pp. 133-139 en: Modern Methods in Food Mycology. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- King AD. 1992. Methodology for routine mycological examination of food. pp. 11-20 en: Modern Methods in Food Mycology. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Klich MA, Pitt JI. 1988. A Laboratory Guide to Common *Aspergillus* Species and their Teleomorphs. CSIRO, North Ryde.
- Moss MO. 1992. Use of impedimetry to study the effect of antifungal agents on fungal growth. pp.321-325 en: Modern Methods in Food Mycology. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Nicholson P. 2001. Molecular assays as aids in the detection, diagnosis and quantification of *Fusarium* species in plants. pp. 176-192 en: *Fusarium*. Summerell BA *et al.*, eds. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Pitt JI. 1988. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. 2^o ed. CSIRO, North Ryde.
- Pitt JI. 1992. Collaborative study on media for detection and differentiation of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*, and the detection of aflatoxin production. pp. 303-308 en: Modern Methods in Food Mycology. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Pitt JI *et al.* 1992 Recommended methods for mycological examination of foods. pp. 365-368 en: Modern Methods in Food Mycology. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Pitt JI, Hocking AD. 1997. Fungi and Food Spoilage. 2^o ed. Blackie Academic & Professional, London. cap. 4.
- Ramos AJ, Sanchis V. 1996. Micotoxinas: Principales criterios para el establecimiento de su legislación. Revista Iberoamericana de Micología 13: 76-84.
- Schnurer J. 1993. Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. Applied Environmental Microbiology 59: 552-555.
- Seifert K. 2000. Fuskey. *Fusarium* Interactive Key. Agriculture and Agri-Food Canada. (<http://res.agr.ca/brd/fusarium/>)
- Skaar I, Stenwig H. 1996. Malt-yeast extract-sucrose agar, a suitable medium for enumeration and isolation of fungi from silage. Applied and Environmental Microbiology 62: 3614 - 3619.
- Thrane U *et al.* 1992. Improved methods for detection and identification of toxigenic *Fusarium* species. pp. 285-291 en: Modern Methods in Food Mycology. Samson RA *et al.*, editores. Elsevier, Amsterdam.
- Van Egmond HP. 1991. Limits and regulations for mycotoxins in raw materials and animal feeds. pp. 423 - 436 en: "Mycotoxins and Animal Foods" Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Raton.
- Whitaker TB, Whitten ME. 1977. Evaluation of cottonseed aflatoxin testing programs. Journal of the American Oil Chemist' Society 54: 436 - 441.
- Whitaker TB *et al.* 1991. Testing animal feedstuffs for mycotoxins: sampling, subsampling, and analysis. pp. 153-164 en: "Mycotoxins and Animal Foods" Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Raton.