

# GRANOS y HARINAS

La microbiota de los granos de cereales y leguminosas es la proveniente del suelo y el ambiente del depósito, además de la adquirida durante el procesamiento. Aunque tienen alta concentración de carbohidratos y proteínas, su baja actividad de agua restringe el crecimiento microbiano si se almacenan adecuadamente (1).

Las condiciones de almacenamiento, tales como el contenido de humedad de los granos, la temperatura y el tiempo de almacenamiento, son factores críticos en el control de los microorganismos.

Las distintas variedades de granos no presentan grandes diferencias entre sí, respecto a las poblaciones microbianas. Los mohos, las levaduras y la mayoría de las bacterias mesofílicas presentes, son indígenas de las plantas. Algunos tipos de granos están constantemente contaminados con mohos tales como *Cladosporium*, mientras que otros contienen *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* y otros.

Los contaminantes bacterianos (coliformes, enterococos, *E. coli*) son aportados por los pájaros, insectos y roedores, los cuales están ecológicamente asociados a los granos (2).

Para prevenir el crecimiento de mohos, el contenido de humedad de los cereales debe ser tan bajo como sea posible. Un aumento de 0,5% en el rango de 14,2 a 15,5% eleva la cantidad del desarrollo de *Aspergillus amstelodami*, *A. repens* y otros en un período de un mes.

El ataque fúngico de los granos comienza en el campo antes que el grano esté maduro. La contaminación con micotoxinas puede ocurrir en el campo o durante el almacenamiento y no está limitada a una región geográfica o climática particular (3).

La población bacteriana en los granos es alta, pero el número de patógenos es bajo y suele incluir *B. cereus*, *C. perfringens*, *C. botulinum* y en algunos casos *Salmonella* spp. Los niveles de mohos y levaduras también son elevados, y si los granos están secos mueren lentamente. La baja actividad de agua de los granos de cereales evita el desarrollo de las

bacterias, pero estos organismos pueden sobrevivir durante la molienda y contaminar las harinas (2).

El número de microorganismos de las harinas de cereales es relativamente bajo debido a los agentes blanqueadores. Cuando las condiciones de humedad favorecen el crecimiento aparecen por lo común las bacterias del género *Bacillus* y diversos tipos de mohos. Varias especies aeróbicas formadoras de endosporos, son capaces de producir amilasa, la que les permite usar la harina y productos relacionados. Con una humedad algo menor puede haber crecimiento micelial y formación de esporas fúngicas (1).

Los panes caseros pueden presentar una alteración limosa debida a especies amilolíticas de *B. subtilis* y ocasionalmente *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. firmus* y *B. firmus* provenientes de la harina (4).

Los panes producidos comercialmente carecen de humedad suficiente para permitir el crecimiento de microorganismos, excepto los mohos. Éstos aparecen cuando el pan es almacenado en un ambiente húmedo o envuelto mientras aún está caliente, los más comunes son *Rhizopus stolonifer* que crece a una  $a_w > 0,93$  y *Neurospora sitophila*, pero también suelen desarrollar especies de *Penicillium* o *Aspergillus* cuyas esporas germinan a una  $a_w$  entre 0,90 y 0,84 (1). Las levaduras amilolíticas de los géneros *Saccharomyces* e *Hyphopichia* producen el pan yesoso (5).

El deterioro de los productos de pastelería refrigerados, por ejemplo la masa de pizza, es causado principalmente por bacterias lácticas (*Lactobacillus*, *Leuconostoc* y en menor proporción *Streptococcus*), alcanzando valores de  $10^8$  ufc/g en los productos alterados, pero los mohos se hallan en bajo número. Las tortas, en cambio, rara vez sufren un deterioro bacteriano debido a la alta concentración de azúcares pero son alteradas por los mohos; éstos provienen de cualquiera de los ingredientes (1).

#### ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

La microbiota normal de los granos de cereales comprende mohos ( $10^2 - 10^4$  /g), levaduras y hongos levaduriformes ( $10^2 - 10^4$  /g), bacterias aerobias ( $10^2 - 10^6$  /g), coliformes ( $10^2 - 10^4$  /g), *E. coli* ( $<10^2 - 10^3$  /g), actinomicetos ( $10^3 - 10^6$  /g).

### RECUESTO DE *Bacillus cereus*

Sembrar en sendas placas del medio de cultivo con 0,1 mL de las diluciones decimales del alimento (comúnmente  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ) y extender el inóculo con una varilla de vidrio doblada en L. Incubar a 30°C durante 24 hs. Si es necesario incubar otras 24 hs.

Observar las colonias redondas, chatas, secas, de color rosado a violeta pues no ha sido fermentado el manitol, rodeadas de un precipitado causado por la actividad lecitinasas.

Repicar 5 colonias en agar nutritivo e incubar a 30°C durante 24 hs. Colorear las preparaciones; observar el endosporo verde, central a subterminal, que no deforma la célula y los glóbulos pseudolipídicos dentro del citoplasma teñido de azul oscuro.

**AGAR MYP.** Extracto de carne 1 g, peptona 10 g, D-manitol 10 g, cloruro de sodio 10 g, rojo de fenol 0,025 g, agar 15 g, agua 900 mL. Distribuir en porciones de 200 mL Esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Enfriar a 50°C, agregar 10 mL de la emulsión de yema de huevo y 2 mL de la solución de polimixina.

**SOLUCIÓN DE POLIMIXINA.** Disolver 500.000 unidades de sulfato de polimixina B estéril en 50 mL de agua destilada estéril.

**COLORACIÓN DE ENDOSPOROS Y GLOBULOS DE POLIHIDROXI-BUTIRATO.** Cubrir con verde de malaquita al 5% y calentar dos o tres veces sin que se seque. Lavar, secar con papel y cubrir durante 20 minutos con solución de negro Sudan B al 0,3% en etanol al 70%. Volcar y cubrir con xileno durante 10 segundos. Secar y colorear con safranina al 0,5% durante 20 segundos (2).

La microbiota normal de las harinas y sémolas de cereales contiene mohos ( $<10^2 - 10^4$  /g), levaduras y hongos levaduriformes ( $<10 - 10^2$  /g), bacterias aerobias ( $10^2 - 10^6$  /g), coliformes ( $<10 - 10^2$  /g), endosporas del limo ( $<10 - 10^2$  /g). Las harinas de soja a veces contienen *Salmonella* (2).

El análisis de los subproductos de cereales (salvado, harinas, etc) comprende el recuento de mohos ( $n = 5$ ,  $c = 2$ ,  $m = 10^2$  /g y  $M = 10^4$  /g), la investigación de endosporos de bacterias formadoras de limo ( $n = 5$ ,  $c = 2$ ,  $m = 10^2$  /g y  $M = 10^4$  /g), la de endosporas de bacterias termófilas ( $n = 5$ ,  $c = 2$ ,  $m = 10^2$  /g y  $M = 10^4$  /g), la de *B. cereus* ( $n = 5$ ,  $c = 1$ ,  $m = 10^3$  /g y  $M = 10^5$  /g) y la de *C. perfringens* ( $n = 5$ ,  $c = 1$ ,  $m = 10^2$  /g y  $M = 10^4$  /g), mediante métodos normalizados (6).

Los límites dados por el art 720 del Código Alimentario Argentino (CAA) para las pastas frescas refrigeradas y

vendidas dentro de las 48 hs son *Salmonella* ausente en 25 g y *S. aureus* coagulasa positiva  $< 10^3$  ufc/g, y para las rellenas además de estos valores, clostridios sulfito-reductores  $< 10^3$  ufc/g. Las pastas frescas adicionadas de propionato o sorbato, con o sin relleno, deben cumplir (art 721) con mohos y levaduras  $< 10^4$  ufc/g, además las pautas establecidas en el art anterior.

Otras bacterias esporuladas anaerobias sulfito-reductoras además de *C. perfringens*, son *C. absonum*, *C. baratii*, *C. celatum*, *C. bifementans*, *C. botulinum*, *C. sporogenes* (2).

#### RECuento DE *Clostridium perfringens*

Preparar diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  en un diluyente con cisteína.\* Distribuir 10 mL de cada dilución en 10 tubos estériles con tapa a rosca y volcar de inmediato en cada uno 10 mL de agar sulfito fundido y a 50°C. Una vez gelificado cubrir con una capa de agar-agua de 3 cm de espesor. Incubar a 46°C durante 14-18 hs.

Contar el número de colonias negras y multiplicar por el factor de dilución correspondiente.

Confirmar mediante observación de la inmovilidad de las células, la reducción de nitratos, la licuación de gelatina en 24-48 horas y la producción de ácido y gas por fermentación de lactosa pero no de rafinosa.

**DILUYENTE CON CISTEINA.** Peptona 1 g, cloruro de sodio 9 g, clorhidrato de cisteína 1 g, agua 1 litro. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

**AGAR-AGUA.** Agar 15 g, agua 1 litro. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos.

**AGAR SULFITO.** Triptona 15 g, extracto de levadura 10 g, citrato férrico 0,5 g, agar 15 g, agua 1 litro, pH 7,0. Esterilizar a 120°C durante 20 minutos. Enfriar a 50°C. Añadir 10 mL de sulfito de sodio heptahidratado al 5% y 10 mL de D-cicloserina al 4%, esterilizados por filtración (5).

**MEDIO GELATINA LACTOSA.** Triptosa 15 g, extracto de levadura 10 g, lactosa 10 g, gelatina 120 g, rojo de fenol 0,05 g, agua 1 litro, pH 7,5. Distribuir en tubos con tapa a rosca. Esterilizar a 120°C durante 10 minutos. La licuación se observa luego de enfriar el cultivo.

**MEDIO FERMENTACION.** Tripticase 10 g, neopeptona 10 g, agar 2 g, tioglicolato de sodio 0,25 g, agua 1 litro, pH 7,4. Distribuir en tubos con tapa a rosca. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos. Agregar 1 mL de solución estéril de rafinosa al 10% (2).

\* No calentar la dilución porque esta bacteria esporula muy poco en los alimentos.

El CAA establece en el art. 1497 para la harina de soja los límites siguientes: bacterias totales  $\leq 20.000/g$ , bacterias termófilas  $\leq 1.500/g$ , endosporos  $\leq 10 /10g$ , coliformes negativo /g, *E. faecalis* negativo /g, *Staphylococcus* negativo /g, *C. perfringens*  $\leq 100/g$ , *Salmonella* negativo /50g, levaduras y mohos  $\leq 50/g$ , aflatoxinas  $<30 \text{ ng/g}$  (7).

#### RECUESTO DE *Bacillus* FORMADORES DE LIMO

Pesar 50 g de harina u otro ingrediente en un recipiente estéril, agregar 450 mL de solución de peptona al 0,1%, agitar enérgicamente durante 2 minutos y colocarlo en un baño de agua hirviente durante 20 minutos. Preparar las diluciones  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ . Sembrar 0,1 mL en sendas placas de agar triptona glucosa, extendiendo con una varilla de vidrio en L. Incubar a 35°C durante 48 hs.

Contar las colonias blanco grisáceo, que se vuelven secas y arrugadas. Multiplicar por el factor de dilución correspondiente, para obtener el número de endosporos de bacterias formadoras de limo por gramo.

**AGAR TRIPTONA GLUCOSA.** Triptona 5 g, extracto de levadura 2,5 g, glucosa 1 g, agar 15 g, agua 1 litro, pH 7. Esterilizar a 120°C durante 15 minutos (2).

#### REFERENCIAS

1. Jay MJ *et al.* 2005. Modern Food Microbiology. 7ª ed. Springer, New York, p. 199.
2. Downes FP, Ito K, eds. 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4ª ed. APHA, Washington, p. 223, 327, 549.
3. ICMSF. 1998. Microorganisms in food. Vol 6: Microbial Ecology of Food Commodities. Blackie Academic & Professional, London, p. 313.
4. Pepe O *et al.* 2003. Appl Environ Microbiol 69: 2321.
5. Mossel DAA *et al.* 2003. Microbiología de los Alimentos. Acribia, Zaragoza, p. 548.
6. ICMSF. 1981. Microorganismos de los Alimentos. Vol 2. Acribia, Zaragoza, p.109.
7. Código Alimentario Argentino. <http://www.anmat.gov.ar/codigoo/caal.htm> cap 9.