

Identificación de la microbiota asociada a la trufa blanca o de verano (*Tuber aestivum*)

M. Rubio, C.S. Rivera, R. Oria y D. Blanco

Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013, Zaragoza

Palabras clave: *Tuber aestivum*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Listeria*, mohos, levaduras.

Resumen

Se ha caracterizado la microflora asociada a la trufa blanca de verano (*Tuber aestivum*) para valorar la calidad y seguridad de este carpóforo desde un punto de vista microbiológico. Dentro de la flora bacteriana, destacan *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter amnigenus* y *Listeria seeligeri* por su frecuencia. También se identificó *Listeria monocytogenes*, pero con una incidencia muy baja. En cuanto a la flora fúngica, cabe destacar *Debaryomyces hansenii* y el G° *Trichoderma*. Teniendo en cuenta la actividad alterante de la mayoría de los microorganismos identificados, y su capacidad para comportarse como patógenos oportunistas, es altamente recomendable una descontaminación previa a su comercialización en fresco.

INTRODUCCIÓN

La trufa blanca o de verano, *Tuber aestivum*, es un hongo hipogeo que crece asociado principalmente a plantas del género *Quercus*, con las que establece simbiosis, denominadas micorrizas, y que se recolecta en trufas naturales durante los meses de junio a noviembre (Reyna, 2000). Es, junto con la trufa negra (*Tuber melanosporum*), la de mayor importancia comercial en España.

El consumo de trufas ha aumentado considerablemente en los últimos años, siendo un integrante cada vez más común de nuestra gastronomía. A pesar de ello, existe un gran desconocimiento de este hongo debido generalmente a la poca transparencia que rodea su producción, recolección y comercio. Y obviamente entre los factores desconocidos se encuentra la flora microbiana asociada a estos carpóforos.

El objetivo de este trabajo ha sido caracterizar la microflora asociada a la trufa blanca de verano, *Tuber aestivum*, para valorar su calidad y salubridad y, en definitiva, tipificar a este alimento desde una perspectiva microbiológica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 10 muestras de trufas blancas procedentes de diferentes zonas trufas naturales de Sarrión (Teruel). Las trufas fueron transportadas al laboratorio refrigeradas y con tierra de cobertura. Ésta se eliminó mediante lavado con agua de red y cepillado. Se hizo además un control de calidad para utilizar en la investigación sólo trufas con aptitud comercial, eliminando aquéllas con traumatismos, excesivamente parasitadas o en estado de senescencia. Posteriormente se sometieron a analítica microbiológica: F^a *Enterobacteriaceae* (ISO 7402), G° *Pseudomonas* (ISO 13720), G° *Listeria* (ISO 11290-1) y microflora fúngica (Mohos y Levaduras) (ISO 21527-1).

Las cepas fueron aisladas de los medios empleados en la investigación de los mencionados grupos microbianos.

Identificación de las especies pertenecientes al G° *Pseudomonas*

Las cepas presuntivas fueron aisladas en base a aspectos morfológicos del medio selectivo para pseudomonas Agar CFC, y confirmadas en base a la presencia del enzima citocromo-oxidasa y a la fermentación de azúcares (triple sugar iron, Merck). Las pruebas realizadas para su identificación han sido: test de fermentación u oxidación de la glucosa (medio OF, Difco); producción de pigmentos fluorescentes (Agar Ps F, Difco); presencia del enzima arginina dehidrolasa (medio de Thornley); producción de lecitinasa (agar yema de huevo); producción de lipasas (medio base con Tween 80); licuación de la gelatina (medio base con gelatina); hidrólisis de la caseína (agar nutritivo con leche descremada al 10%); producción de levano (agar nutritivo con sacarosa al 5%) y crecimiento a 41° C (agar tripticasa soja, Merck). Se identificó a nivel de especie utilizando el libro Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Brenner et al., 2005), dado que la capacidad discriminante del sistema API 20NE (bioMérieux) es reducida.

Identificación de las especies pertenecientes a la Fª *Enterobacteriaceae*

Las cepas presuntivas, aisladas del medio VRBG, se confirmaron en base a la presencia de la enzima citocromo-oxidasa y a la fermentación de la glucosa. La identificación de las enterobacterias se llevó a cabo mediante las siguientes pruebas bioquímicas: hidrólisis de la urea (caldo rápido urea); fermentación de la glucosa, lactosa y sacarosa, y producción de sulfhídrico (medio triple sugar iron, Merck); descarboxilación de la lisina (lysine iron agar, Merck); movilidad, producción de indol y descarboxilación de la ornitina (medio movilidad indol ornitina, Difco); descarboxilación de la arginina (caldo base descarboxilasa, Difco); utilización del citrato (agar citrato de Simmons, Merck); fermentación del sorbitol, lactosa y sacarosa (caldo púrpura de bromocresol, Difco); prueba del rojo de metilo y prueba de Voges-Proskauer (caldo MR-VP, Merck). En base a estas pruebas, las cepas fueron agrupadas y confirmada su identificación mediante galerías API 20E (bioMérieux). La lectura del código numérico se efectuó con el sistema informático APILAB Plus (bioMérieux).

Identificación de las especies pertenecientes al G° *Listeria*

Se aislaron del Agar Palcam aquellas colonias que presentaban aspectos macroscópicos característicos del género *Listeria*. Las cepas aisladas se identificaron en base a las siguientes pruebas: fermentación de manitol, xilosa y ramnosa (caldo base rojo fenol, Merck); tipo de hemólisis (agar sangre cordero, AES); el test de Camp (agar sangre cordero, AES); morfología (agar Aloa, AES); y confirmadas mediante observación microscópica en fresco de la movilidad y la morfología. En base a estos resultados, se agruparon las cepas y se identificaron mediante galerías API Listeria (bioMérieux). La lectura del código numérico se efectuó con el sistema informático APILAB Plus.

Identificación de las especies de Levaduras aisladas

Las cepas seleccionadas se aislaron principalmente en base a aspectos morfológicos del medio DRBC (Merck) reforzado con gentamicina al 0,1% para incrementar su poder selectivo.

Para su identificación se tuvo en cuenta el aspecto morfológico macroscópico de las colonias de un cultivo puro en agar de patata dextrosa (Merck), valorando color, forma, diámetro, textura, producción de pigmentos, etc. Para la determinación de los caracteres morfológicos microscópicos, se realizaron preparaciones con azul de lactofenol (Merck), valorándose forma y tamaño celular, tipo de reproducción vegetativa, formación de micelio o pseudomicelio, presencia de esporas asexuales, y formación de ascosporas. Esta información se debe complementar con tests bioquímicos y fisiológicos. Las pruebas seleccionadas son las establecidas por el SIM (Handbook of Food Spoilage Yeasts, Deak y Beuchat, 1996). Se trata de un sistema simple de identificación de levaduras de origen alimentario, en el que el microorganismo se encuadra en uno de los siete grupos que se forman, tras aplicarle seis tests: hidrólisis de la urea, asimilación del nitrato, asimilación del eritritol, asimilación de la celobiosa, asimilación del manitol y crecimiento con cicloheximida. Identificamos a nivel de especie utilizando claves dicotómicas y el manual “Yeasts: Characteristics and identification” (Barnett et al., 2000).

Identificación de las especies de Mohos aisladas

Las cepas seleccionadas se aislaron en base a aspectos morfológicos del medio DRBC (Merck) reforzado con gentamicina.

Se estudian las características macroscópicas y microscópicas. Para el estudio de las primeras, se hizo una siembra por punción mediante la técnica de los tres puntos equidistantes sobre agar de patata dextrosa (Merck) y agar Czapek-Dox (Merck), y se valoró diámetro colonial, aspecto y color de la colonia en el haz y el envés, producción de pigmento y difusión del mismo, presencia de exudado y coloración, olor y presencia de estrías en forma de radios. Para la observación de los caracteres microscópicos, se realizaron preparaciones mediante la técnica de la cinta adhesiva y tinción con azul de lactofenol (Merck). Observamos existencia o no de septos en el micelio; forma y tamaño de los órganos de fructificación, de las esporas y de las hifas; color y forma de las esporas. Se identificaron las cepas a nivel de género utilizando los manuales “Manual and Atlas of the Penicillia” (Ramírez, 1982), “Identification of common Aspergillus species” (Maren, 2002), “Introduction to food-borne fungi” (Samson et al., 1996), y CBS Course of Mycology”, Fourth Edition (Gams et al., 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

G° *Pseudomonas*

Según estudios previos, la carga microbiana de *Tuber aestivum* es alta (10^8 ufc/g), y está constituida principalmente por especies del G° *Pseudomonas* (Rivera et al., 2005). Las pseudomonas son consideradas como alterantes comunes de los productos frescos, seguidos de las enterobacterias y las levaduras, produciendo olores pútridos y pérdida de textura.

Se identificaron 54 pseudomonas, con un claro predominio de la especie *Ps. fluorescens* (50%), seguida de *Ps. chlororaphis aureofaciens*.

Todas las especies identificadas se han encontrado previamente en productos vegetales frescos (Heard, 2002); *Ps. fluorescens* y *Ps. corrugata* fueron halladas asociadas a *Tuber borchii* (Sbrana et al., 2002) y *Ps. fluorescens*, *Ps. putida* y *Ps. chlororaphis* fueron encontrados en setas comercializadas en fresco (Reyes et al., 2005).

F^a Enterobacteriaceae

De las 42 especies aisladas y confirmadas como enterobacterias, un 60% se identificó como *Enterobacter amnigenus*.

Reyes et al. (2003) encontraron *Enterobacter amnigenus* y *Enterobacter cloacae* en champiñones frescos.

G^o Listeria

Se detectó *Listeria* en la mitad de las muestras investigadas. De las ocho cepas aisladas, seis se identificaron como *L. seeligeri*, una como *L. welshimeri* y otra como *L. monocytogenes*. La incidencia de esta última es muy baja (10%), quizás porque es inhibida por *Ps. fluorescens* (Heard, 2002), especie microbiana predominante en los ascocarpos analizados.

Levaduras

Debaryomyces hansenii ha resultado ser la especie predominante en *Tuber aestivum*. Reyes et al. (2005) también la han aislado de otras especies de carpóforos frescos.

Mohos

Son tres los principales géneros asociados a estos cuerpos fructíferos: G^o *Trichoderma*, G^o *Penicillium* y G^o *Fusarium*.

Los principales microorganismos que forman parte de la microbiota de la trufa blanca son: *Ps. fluorescens* y *Enterobacter amnigenus* dentro de la flora bacteriana, y *Debaryomyces hansenii* y G^o *Trichoderma* en la flora fúngica. La carga microbiana es alta, pero la variabilidad de especies es reducida, puesto que se trata de un hongo hipogeo, disminuyendo las posibilidades de contaminación por otras fuentes.

Dada la elevada presencia de microorganismos con capacidad alterante, algunos de los cuales además pueden comportarse como patógenos oportunistas (Berg, 2005), y la presencia eventual de *Listeria monocytogenes*, es casi “obligada” la descontaminación de estos alimentos antes de su comercialización en fresco.

Referencias

- Barnett, J.A. et al. 2000. Yeasts: Characteristics and identification, Third Edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- Berg, G. et al. 2005. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 7 (11), 1673-1685.
- Brenner, D.J. et al. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Volume Two, Part Two. Editorial Board, New York.
- Deak, T. y Beuchat, L.R. 1996. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, NY.
- Gams, W. et al, 1998. *CBS Course of Mycology*”, Fourth Edition. CBS, Netherlands.
- Heard, G.M. 2002. Microbiology of Fresh-cut Produce. p.187-248. En: O. Lamikanra (ed.), *Fresh-cut Fruits and Vegetables. Science, Technology and Market*. CRC Press, NY.
- Klich M.A., 2002. Identification of common *Aspergillus* species. CBS, Netherlands.
- Ramírez, C. 1982. *Manual and Atlas of the Penicillia*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Reyna, S. 2000. *Trufa, truficultura y selvicultura trufera*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.

- Reyes, J.E. et al. 2003. Prevalence of *Ewingella americana* in retail fresh cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*) in Zaragoza (Spain). FEMS Microbiology Ecology, 47 (3), 291-296.
- Reyes, J.E. et al. 2005. Caracterización de la microflora asociada a setas comercializadas en estado fresco. III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Burgos, 29 mayo–1 junio 2005. p.250.
- Rivera, C. et al. 2005. Microbiological characterization, decontamination and preservation of *Tuber aestivum* Vitt. IV International Works on Edible Mycorrhizal Mushrooms. Murcia, 28 nov-2 dic 2005. p.110.
- Samson, R.A. et al. 1996. Introduction to food-borne fungi. CBS, Netherlands.
- Sbrana C. et al. 2002. Diversity of culturable bacterial populations associated to *Tuber borchii* ectomycorrhizas and their activity on *T. borchii* mycelial growth. FEMS Microbiology Letters, 211 (2), 195-201.

Tabla 1. Microbiota bacteriana identificada asociada a *Tuber aestivum*

G° <i>Pseudomonas</i> (54 cepas)	F ^a <i>Enterobacteriaceae</i> (42 cepas)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (28)	<i>Enterobacter amnigenus</i> (25)
<i>P. chlororaphis aureofaciens</i> (16)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (7)
<i>Pseudomonas putida</i> (5)	<i>Enterobacter cloacae</i> (6)
<i>Pseudomonas corrugata</i> (2)	<i>Klebsiella ornitinolytica</i> (2)
<i>Pseudomonas spp.</i> (3)	<i>K. pneumoniae pneumoniae</i> (2)

Tabla 2. Microbiota fúngica identificada asociada a *Tuber aestivum*

Levaduras (27)	Mohos (25)
<i>Debaryomyces hansenii</i> (13)	<i>Trichoderma</i> (8)
<i>Trichosporon cutaneum</i> (6)	<i>Penicillium</i> (6)
<i>Candida versatilis</i> (5)	<i>Fusarium</i> (5)
<i>Cryptococcus laurentii</i> (3)	<i>Aspergillus</i> (2)
	<i>Cladosporium</i> (1)
	<i>Micelia sterilia</i> (3)