

Artículo original

Detección de microorganismos en maíz tierno molido comercializado en Maracay, estado Aragua, Venezuela

Marleny Chavarri^{a,*}, Viannely Rojas^b, Nohants Rumbos^a, Rosmar Narcise^a

^aFacultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, núcleo Aragua. ^bRed Mercal, estado Aragua, Venezuela.

Recibido 15 de junio de 2013; aceptado 13 de enero de 2014

Resumen: Con el fin de evaluar la microbiota asociada al maíz tierno molido, se analizaron 20 muestras provenientes de varios centros de distribución de Maracay, estado Aragua. A cada muestra se le realizó un análisis físico-químico (medición de pH y acidez). Se utilizó el método de contaje en placa para la cuantificación de mohos y levaduras (Norma Covenin 1337:1990) y bacterias mesófilas (Norma Covenin 902:1978). Para la estimación de coliformes totales y fecales se usó el método NMP (Norma Covenin 1104:1996). Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de pH, acidez, contajes de mohos, levaduras y bacterias mesófilas, ni en la estimación de coliformes totales y fecales en las muestras analizadas. Los valores de pH se encontraron entre 6,1-6,4 y los de acidez entre 2,6-2,8. Los contajes de mohos, levaduras y la estimación de coliformes totales y fecales excedieron el límite permitido por la norma mexicana NOM-147-SSA1-1996 de cereales y sus productos y la venezolana Covenin 1452:1993, evidenciándose una elevada contaminación de las muestras analizadas, a excepción de los contajes de bacterias mesófilas. El elevado crecimiento de coliformes en todas las muestras analizadas representa un riesgo para la salud humana.

Palabras clave: masa de maíz, mohos, levaduras, bacterias mesófilas, coliformes, Normas Covenin de alimentos.

Detection of microorganisms in tender ground corn commercialized at Maracay, Aragua State, Venezuela

Abstract: With the purpose of evaluating the macrobiotic population associated with tender ground corn, we analyzed 20 samples obtained at several distribution centers in Maracay, Aragua State. Each sample was submitted to a physical-chemical analysis (pH and acidity measurements). For quantification of molds and yeasts we used the NMP method (Covenin Regulation 902:1978). The data obtained were analyzed through a variance analysis. There were no statistically significant differences in pH and acidity values, or in mold, yeasts or mesophilic bacterial counts, or in the estimation of total and fecal coliforms in the samples analyzed. pH values were between 6.1 – 6.4, and acidity values between 2.6 – 2.8. Molds and yeasts counts and estimation of total and fecal coliforms exceeded the limits allowed by the Mexican Regulation NOM-147-SSA1-1996 for cereals and their products, and the Venezuelan Regulation Covenin 1452-1993, showing a high contamination of the samples analyzed, except for the mesophilic bacterial counts. The high coliform growth in all the samples analyzed represents a risk for human health.

Keywords: cornmeal, molds, yeasts, mesophilic bacteria, coliforms, Food Covenin Regulations.

* Correspondencia:

E-mail: marlenycoromoto@gmail.com

Introducción

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales más cultivados a nivel mundial, con un amplio aprovechamiento en el consumo humano y animal, así como en la industria. Se le puede explotar con varios fines, en forma directa y subproductos: harinas, grits (sémolas de maíz constituidas por la fracción del endospermo duro, ricas en almidón y

libres de grasa del grano de maíz), hojuelas (flakes), aceite, maíz tierno molido para cachapas, proteínas, almidón, bebidas alcohólicas y edulcorantes alimenticios, entre otros [1].

El cultivo de maíz se ve afectado por distintos factores abióticos, entre los que figuran las plagas y las enfermedades de origen viral, bacteriano y fúngico. Las bacterias, mohos y levaduras utilizan los elementos nutritivos contenidos en

el grano de maíz y en los subproductos para su crecimiento. Esto origina deterioro del grano y da como resultado cambios en la apariencia y pérdidas en el valor nutritivo, por la disminución del contenido de proteínas, lípidos y carbohidratos; la contaminación con las toxinas microbianas también ocasiona daños en la salud humana y animal [2].

Los mohos crecen bien en cualquier alimento, a valores bajos de actividad del agua (aw) y pH ácido, mientras que mayoría de las bacterias se desarrollan a valores altos de aw y pH cercano a la neutralidad [3,4]. El predominio de poblaciones fúngicas en los cereales está determinado por las condiciones ambientales imperantes en la pre y postcosecha, zona geográfica, prácticas culturales y por las asociaciones con otros hongos contaminantes. La contaminación fúngica de los alimentos puede causar problemas a través de la síntesis de metabolitos tóxicos llamados micotoxinas, las cuales son mutagénicas, teratogénicas y carcinogénicas para los humanos y animales [5].

Por otra parte, el grupo de bacterias coliformes ha sido siempre el principal indicador de calidad de los distintos alimentos y del agua; su cantidad en una muestra se usa como criterio de contaminación y por lo tanto, de calidad sanitaria de la misma. Los coliformes, entre los que se incluye los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*, proveen información importante sobre la fuente y el tipo de contaminación presente [3-5]. Así, la presencia de coliformes indica que los alimentos podrían estar contaminados con heces fecales humanas o de animales. Estos patógenos podrían representar un riesgo a la salud, especialmente para infantes y personas con sistemas inmunológicos gravemente comprometidos [3].

La flora microbiana en masa de cereales, puede tener su origen en el suelo, aire, agua, en el medio ambiente del almacén o en la fase de manipulación y elaboración. Los microorganismos presentes en la harina de maíz son relativamente escasos, pero una vez que ha sido hidratada se crean condiciones de actividad acuosa favorables para el crecimiento de bacterias, mohos y levaduras [4].

En los análisis de muestras de granos de maíz provenientes de varios estados de Venezuela, se han encontrado altos niveles de incidencia fúngica y contaminación con micotoxinas [2,6-9]. Así mismo, en harina de maíz precocida integral y no integral se han detectado mohos y levaduras [10,11].

En el ámbito nacional e internacional hay mucha información sobre la detección de hongos y micotoxinas en granos de maíz, pero no de hongos y bacterias en maíz tierno molido, el cual forma parte importante de la dieta del venezolano en forma de cachapas y atoles, entre otros; si está contaminado con microorganismos y/o sus toxinas, puede representar un riesgo para la salud humana. Por ello, se consideró de interés realizar esta investigación, con el objetivo de evaluar la microbiota (mohos, levaduras, bacterias mesófilas y coliformes) asociada a maíz tierno molido, comercializado en Maracay, estado Aragua, Venezuela.

Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Micotoxicología del Instituto de Química y Tecnología de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, en la ciudad de Maracay, estado Aragua.

Toma de muestra: Se evaluaron cuatro muestras de maíz tierno molido para elaborar cachapas y atoles, provenientes de diferentes sitios de expendio de la ciudad de Maracay, durante cinco semanas, para un total de veinte (20). Muestras de 500 g fueron colectadas con espátulas estériles, depositadas en bolsas plásticas estériles de cierre hermético y mantenidas en refrigeración hasta su traslado al laboratorio para el análisis, en un tiempo no mayor a 1 hora.

Análisis físico-químico: Se determinó la acidez valorable total (AVT) mediante valoración volumétrica, la cual indica en término de acidez qué ácidos libres predominan en el alimento [12]. Las muestras, diluidas a razón de 5:100 (5 g de muestra por 100 mL de agua destilada), se titularon con una solución de NaOH 0,1 N bajo agitación mecánica constante. Alcanzado el punto de equivalencia, observado por el viraje de color de la muestra a rosado, se leyó el volumen de NaOH 0,1 N gastado, el cual se corresponde con el valor de acidez de la muestra. La determinación del pH se realizó mediante un pHmetro JENWAY® (Staffordshire, OSA, UK). Se utilizó una muestra diluida en agua destilada a una relación de 5:5, verificándose su homogeneidad a fin de medir con exactitud el grado de alcalinidad del alimento [3].

Análisis microbiológico:

Cuantificación de mohos, levaduras y bacterias mesófilas: Se realizó mediante el método de recuento estándar en placa. Para ello se hicieron diluciones seriadas de la muestra, transfiriendo 10 g de la misma a una botella de dilución con 90 mL de diluyente (agua peptonada al 0,1%). Seguidamente, previa agitación por 5 minutos y con una pipeta estéril, alícuotas de 1 mL fueron incorporadas a tubos de ensayo con 9 mL del diluyente hasta obtener una batería de cinco diluciones consecutivas. Posteriormente, 1 mL de cada dilución fue incorporado a placas de Petri y se le agregó el medio de cultivo licuado y enfriado a 45 °C: agar extracto de malta para mohos, agar extracto de levadura para levaduras y agar nutritivo para bacterias mesófilas. Finalmente ya solidificado el agar, los mohos y levaduras fueron incubados a temperatura ambiente durante 5 días en alternancia de 12 horas luz/oscuridad y las bacterias a 37 °C durante 24 a 48 horas. Los ensayos se realizaron por duplicado. Transcurrido el proceso de incubación, se procedió, mediante el uso de lupa estereoscópica, al conteo de las colonias de mohos, levaduras y bacterias mesófilas presentes, tomando como criterio de conteo (placa contable) entre 15 y 150 unidades formadoras de colonias (UFC) para mohos y levaduras/g según Norma Covenin 1337:1990 [13] y de 30 a 300 UFC/g para bacterias mesófilas según Norma

Covenin 902:1978 [14].

Método de determinación del Número Más Probable (NMP) de coliformes totales y coliformes fecales: Consiste en inocular volúmenes conocidos de muestras y/o sus diluciones, en cada uno de 3 o 5 tubos de ensayo con tubos de fermentación (Durham) incorporados y medio de cultivo apropiado. Después del período de incubación a la temperatura correspondiente, se toma nota de los tubos que presentaron formación de gas y turbidez y luego se procede a confirmar el crecimiento bacteriano en un medio de cultivo selectivo adecuado, obteniendo el NMP de coliformes totales y fecales según la Norma Covenin 1104:1996 [15].

Determinación del NMP de coliformes: Para su realización se emplearon dos pruebas: la presuntiva y la confirmatoria. En la prueba presuntiva se inocularon tubos por triplicado de caldo lauril sulfatotriptosa (LST) simple con 1 mL de cada una de las 8 diluciones previamente preparadas. Se consideraron como tubos positivos en la prueba presuntiva aquellos que presentaron turbidez y/o gas en el tubo de Durham después de 48 horas de incubación. En la prueba confirmatoria se determinaron: (a) los coliformes totales y (b) los fecales. (a) Para la detección de los coliformes totales se inoculó una alícuota de cada uno de los tubos positivos de la prueba presuntiva anterior en tubos con caldo bilis verde brillante (BVB) al 2% y se incubaron a $35 \pm 0,5$ °C por 48 ± 2 h. Los tubos que presentaron turbidez y gas se consideraron positivos y se refirieron a las tablas de NMP, atendiendo a los procedimientos establecidos por la Norma Covenin 1104:1996 [15], reportándose los resultados como NMP confirmado de bacterias coliformes por gramo de muestra. (b) Para la detección de los coliformes fecales, de los mismos tubos considerados como positivos en la prueba presuntiva, se tomaron alícuotas y se inocularon tubos que contenían caldo EC (*Escherichia coli*) y se incubaron a $45 \pm 0,2$ °C durante 24-48 h. Los tubos que presentaron turbidez y gas se consideraron positivos y se refirieron a las tablas de NMP atendiendo a los procedimientos establecidos por la Norma Covenin 1104:1996 [15].

Análisis estadístico: El estudio se llevó a cabo bajo un diseño estadístico aleatorio, con cuatro muestras y cinco repeticiones, para un total de 20 muestras. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el análisis de varianza a través del programa Statistix 7.0, con un grado de confianza del 95%.

Resultados y discusión

pH y acidez: No hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores promedios de pH y acidez en las muestras evaluadas. Los valores promedios de pH oscilaron entre 6,1 y 6,4 (Tabla 1). Estos valores de pH cercanos a la neutralidad resultan ideales para el crecimiento óptimo de la mayoría de los microorganismos (bacterias, mohos y levaduras) [4]. Estos resultados difieren de los obtenidos en una investigación realizada en masa madre fresca y congelada para la elaboración de pizza, cuyos valores de pH

Tabla 1. Valores de pH y acidez promedios obtenidos en las muestras de maíz tierno molido para cachapas. Maracay, estado Aragua. Venezuela.

Muestras	Valores de pH	Valores de acidez (mL de NaOH 0,1 N)
1	6,4	2,7
2	6,2	2,8
3	6,1	2,6
4	6,3	2,7

estuvieron entre 5 y 6, respectivamente [16]. Los valores de acidez fluctuaron entre 2, 2,6 y 2,7 en las muestras analizadas (Tabla 1), resultando similares a los reportados en granos de maíz almacenados [17], pero inferiores a los encontrados en alimentos a base de cereales [18].

Cuantificación de mohos, levaduras y bacterias mesófilas:

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los contajes de mohos, levaduras y bacterias mesófilas en las muestras analizadas. Los contajes promedios de mohos oscilaron entre $8,6 \times 10^6$ y $1,2 \times 10^7$ UFC/g (Tabla 2); estos contajes excedieron el valor máximo establecido por la Norma Covenin 2135:1996 [19] para la harina de maíz precocida, que es de 1×10^4 UFC/g de muestra; por lo tanto, se encontró una elevada contaminación fúngica en las muestras analizadas.

Los niveles de contaminación de mohos obtenidos en este estudio difirieron de las investigaciones realizadas en los años 2007 y 2012 en harina de maíz precocida [10,11], dado que reportan contajes inferiores al valor máximo permitido por la norma antes mencionada, no obstante, resultan similares a los reportados en otras investigaciones, los cuales coinciden en señalar que las harinas con mayor contenido de germen y concha (integrales) se caracterizan por presentar alta contaminación fúngica, siendo a su vez determinantes las condiciones de almacenamiento [20].

Asimismo, numerosas investigaciones realizadas en maíz proveniente de varias instalaciones comerciales y experimentales de varios estados de Venezuela, han reportado alta incidencia fúngica en los granos desde el campo de cultivo, lo cual coincide con los elevados niveles de mohos encontrados en esta investigación [2,8,9].

Los contajes de levaduras oscilaron entre $9,3 \times 10^6$ y $1,1 \times 10^7$ UFC/g de muestra (Tabla 2); estos valores son superiores

Tabla 2. Contaje promedio de mohos, levaduras y bacterias mesófilas obtenidos en las muestras de maíz tierno molido para cachapas. Maracay, estado Aragua. Venezuela.

Muestras	Mohos UFC/g	Levaduras UFC/g	Mesófilos UFC/g
1	$1,2 \times 10^7$	$9,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^6$
2	$1,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$4,7 \times 10^6$
3	$8,6 \times 10^6$	1×10^7	$4,6 \times 10^6$
4	1×10^7	1×10^7	$3,6 \times 10^6$

al límite establecido por la Norma Covenin 2135:1996 [19], la cual señala que el máximo nivel de contaminación es de 1×10^4 UFC/g de muestra. Estos resultados son distintos a los detectados por investigaciones realizadas en Venezuela en harina de maíz precocida, ya que los contajes obtenidos se encontraron dentro de los valores establecidos por dicha norma [10,11].

Los contajes de bacterias mesófilas oscilaron entre $3,6 \times 10^6$ y $4,7 \times 10^6$ UFC/g de muestra (Tabla 2); estos valores se encuentran dentro del límite máximo permitido (1×10^7 UFC/g de muestra) por la Norma Covenin 2703:1990 [21] de harina integral de trigo y la Norma Mexicana NOM-147-SSA1-1996 para harina de cereales [22]. Resultados similares han sido reportados en alimentos a base de harina de cereales [18,23].

Determinación de coliformes totales y coliformes fecales: No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la estimación de coliformes totales y fecales en las muestras analizadas. Se detectó alta contaminación de coliformes totales y fecales en las muestras evaluadas (Tabla 3), sobrepasando en todos los casos el límite máximo de 2×10^3 NMP/g de muestra, establecido por la Norma Oficial Mexicana NOM-147-SSA1-1996 [22] y la Norma Covenin 1452:1993 [24], ambas para harinas de cereales. Los contajes promedios de coliformes totales obtenidos en las muestras analizadas son superiores a los reportados en alimentos a base de cereales [18]. Otros estudios realizados en maíz [17] reportaron valores dentro del nivel máximo permitido por la Norma Covenin 1104:1996 [15].

Tabla 3. Valores promedios de coliformes totales y fecales en las muestras de maíz tierno molido para cachapas. Maracay, estado Aragua. Venezuela.

Muestras	NMP de coliformes totales	NMP de coliformes fecales
1	$1,5 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
2	$8,4 \times 10^7$	$8,4 \times 10^7$
3	$5,4 \times 10^7$	$9,8 \times 10^7$
4	$6,5 \times 10^7$	$8,4 \times 10^7$

Conclusiones

El maíz tierno molido es un sustrato ideal para el crecimiento microbiano, ya que se evidenció elevada contaminación por mohos, levaduras y coliformes, sobrepasando los límites establecidos por las normas venezolanas y mexicanas para harinas y cereales.

El elevado crecimiento de microorganismos indicadores (coliformes) encontrados en todas las muestras analizadas, representa un riesgo para la salud humana.

Agradecimientos

Expresamos nuestro agradecimiento al Consejo de

Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) por el financiamiento de esta investigación.

Referencias

- Fontana H, González C. El maíz en Venezuela. Caracas, Venezuela: Fundación Polar; 2000.
- Mazzani C, Luzón O, Chavarri M, Fernández M, Hernández N. *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en maíz cosechado en pequeñas explotaciones y conucos de algunos estados de Venezuela. Fitopatol Venez. 2008; 21:18-22.
- Camacho A, Giles M, Ortégón A, Palao M, Serrano B, Velázquez O. Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. 2^{da} ed. México: Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México; 2009.
- Jay J. Microbiología Moderna de los Alimentos. España: Editorial Acribia; 2000.
- Silva J, Ramírez L, Alfieri A, Rivas G, Sánchez M. Determinación de microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Coliformes totales, coliformes fecales y aerobios mesófilos en agua potable envasada y distribuida en San Diego, estado Carabobo, Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol. 2004; 24:46-9.
- Krijghsheld P, Bleichrodt R, Van Veluw GJ, Wang F, Müller WH, Dijksterhuis J, Wösten HAB. Development in *Aspergillus*. Studies in Mycology. 2013; 74:1-29.
- Chavarri M, Mazzani C, Luzón O, Gonzales C, Alezones S, Garrido MJ. Mohos toxigénicos y micotoxinas en maíz de grano blanco cosechado bajo riego en los estados Yaracuy y Portuguesa. Venezuela. Fitopatol Venez. 2009; 22:2-7.
- Luzón O, Chavarri M, Mazzani C, Barrientos V, Alezones J. Principales mohos y micotoxinas asociadas a granos de maíz en campos de los estados Guárico, Portuguesa y Yaracuy. Venezuela. Fitopatol Venez. 2007; 20:25-30.
- Chavarri M. Contribución al conocimiento de los mohos toxigénicos y micotoxinas en maíz en Venezuela. Trabajo de Ascenso. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela; 2010.
- Chavarri M, Mazzani C, Luzón O, Garrido MJ. Detección de hongos toxigénicos en harinas de maíz precocidas distribuidas en el estado Aragua, Venezuela. Rev Soc Ven Microbiol. 2012; 32:126-30.
- Flores Y. Micobiota asociada a la harina de maíz precocida. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela; 2007.
- Flores Chávez H, Zamora de los S JE, Villareal López JL, Villareal Sánchez JA. Determinación y caracterización de microorganismos presentes en la masa para tortilla de maíz en tortillerías del municipio de Saltillo, Coahuila. México. Memorias de la Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, AIDIS. México, D.F: FEMISCA; 2006.
- Comisión de Normas Industriales Covenin. Alimentos. Método para recuentos de hongos y levaduras. Norma Venezolana N°1337:1990.
- Comisión de Normas Industriales Covenin. Método para recuento de microorganismos aerobios en placa de Petri. Norma Venezolana N° 902:1978.
- Comisión de Normas Industriales Covenin. Determinación del número más probable de coliformes, coliformes fecales y de *Escherichia coli*. Norma Venezolana N° 1104:1996.

16. Argüelles V, Cruz T, Gallardo Y. Elaboración de pan pizza a partir de masa madre fresca y congelada, adicionado con inulina como prebiótico. Memorias del VII Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Guanajuato, México; 2008.
17. Hernández C, Rodríguez Y, Nino Z, Pérez S. Efecto del almacenamiento de granos de maíz (*Zea Mayz L.*) sobre la calidad de aceites extraídos. *Inf Tecnol.* 2009; 20:21-30.
18. Ruíz G. Diseño e implementación de un sistema de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) en una planta de alimentos a base de cereales. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela; 2005.
19. Comisión de Normas Industriales Covenin. Harina de maíz precocida. Norma Venezolana N° 2135:1996.
20. García R. Cuantificación de hongos y micotoxinas en harina de maíz integral. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela; 2009.
21. Comisión de Normas Industriales Covenin. Harina integral de trigo. Norma Venezolana N° 2703:1990.
22. Norma Oficial Mexicana NOM-147-SSA1-1996. Bienes y servicios. Cereales y sus productos. Harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de cereales, de semillas comestibles, harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Disponible en: <http://vlex.com.mx/vid/semolas-semolinas-27892628#ixzz0nsA1v89X>. Acceso 25 de abril 2012.
23. Martino T, Leyva V, Puig Y, Machín M, Aportela N, Ferrer Y. *Bacillus cereus* y su implicación en la inocuidad de los alimentos. Parte I. *Rev Cub Salud Pública.* 2010; 36:128-38.
24. Comisión de Normas Industriales Covenin. Alimentos elaborados a base de cereales para niños de pecho y niños de corta edad. Norma Venezolana N° 1452:1993.