

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

**MCC P/A**  
**CRIOTECA®**  
**PLAQUIS®**  
**M-IDENT®**  
**NEOGRAM**

**COSMETIKIT®**  
**CHROMOSALM**  
**KITPRO-PLUS**  
**SEILAGUA®**  
**ENVIROCOUNT**

**DRY PLATES®**  
**DESINFECTEST®**  
**CROMOKIT®**  
**SALMOQUICK**

**MUGPLUS**  
**CCCNT**  
**MBS**  
**AIREANO**

## MONOGRAFÍA HONGOS (LEVADURAS Y MOHOS)

### 1-El microorganismo y su interrelación con el ser humano

Los **hongos** son todo un Reino biológico, junto a los animales, los vegetales, los “demás eucariotas” o protistas (ahora dividido en 2: protozoos y ciertas algas) y procariotas (ahora divididos en 2: bacterias y arqueas). Antes los hongos se incluían dentro del Reino vegetal, pero siempre como algo aparte, porque aunque eran inmóviles como las plantas, no tenían fotosíntesis (ya que comen materia orgánica). La mayoría de especies de hongos aun son desconocidas (micorrizas tropicales en simbiosis con miles de especies vegetales). Los más conocidos representantes del reino de los Hongos son las setas, pero a efectos de nuestro interés profesional, lo son las levaduras y los mohos. Las **levaduras** son unicelulares y forman colonias similares a las de las bacterias en los medios de cultivo. En cambio los **mohos** son pluricelulares, filamentosos, por lo que forman

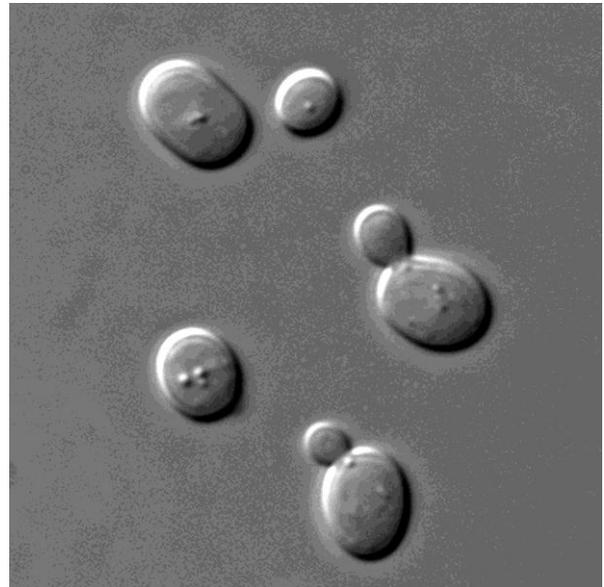


Foto microscópica de dominio público (wikipedia) de levaduras *Saccharomyces* en plena gemación



Moho *Aspergillus flavus*, principal productor de aflatoxinas, esporulado en placa de medio de cultivo

colonias muy características, algodonosas, tanto en la naturaleza como en los medios de cultivo, que las diferencian a simple vista de las de levaduras y bacterias. Como eucariotas (células con núcleo diferenciado), los hongos son muy fáciles de distinguir de las bacterias, no solo en el microscopio (tamaño celular muy superior al de las bacterias, orgánulos dentro de la célula); sino también en medio de cultivo (ya que las bacterias no crecen en medios con

antibióticos de amplio espectro, como el Cloranfenicol, la Oxitetraciclina...), mientras los hongos no sólo crecen en ellos, sino que suelen ser quienes los generan en su continua lucha por el hábitat contra las bacterias. En general los hongos prefieren los ambientes ácidos y se reparten así los nichos de la biosfera con las bacterias, la mayoría de las cuales prefieren los ambientes neutros o alcalinos. Esto también se tiene en cuenta en el diseño de medios de cultivo para hongos. También sus requerimientos nutricionales son ligeramente diferentes y aunque ambos pueden coexistir y coexisten en la mayoría de hábitats, el tipo de materia orgánica inclina la balanza a favor de unos u otros como dominantes. Muchas levaduras son beneficiosas para el ser humano (*Saccharomyces cerevisiae* con sus numerosos tipos de cepa para fermentación del pan, vino, cerveza..., *Kluyveromyces marxianus* = *Candida kefir* como el mejor probiótico simbiote del hombre que conocemos, *Saccharomyces boulardii* como probiótico hospitalario mientras se toman antibióticos que eliminan el efecto de las bacterias probióticas, *Yarrowia lipolytica* como complemento dietético...), al igual que muchos mohos (numerosas cepas productoras de antibióticos, la primera de ellas descubierta por Fleming: *Penicillium chrysogenum*, otros empleados en industria alimentaria como *Penicillium candidum*, la “harina blanca” que baña ciertos embutidos, *Penicillium camemberti*, la costra blanca de ciertos quesos...). Pero también hay muchas levaduras patógenas para el ser humano (la más conocida *Candida albicans*, comensal que dispara su población en estados de estrés, creando problemas a muchas personas) y una enorme cantidad de mohos peligrosos no sólo como patógenos (Ej: *Aspergillus fumigatus*), también como alergénicos (Ej: *Alternaria alternata*) y además, como micotoxigénicos (Ej: *Aspergillus flavus*-aflatoxinas, *Aspergillus ochraceus*-ocratoxinas, *Fusarium moniliforme*-fumonisinas, *Fusarium graminearum*-zearalenona...). Dada la ubicuidad de los hongos, no se exige su ausencia en alimentos, medicamentos, cosméticos, aguas... sino que su recuento sea inferior a un número concreto, número límite que resulta muy variable según sea el producto. Aunque nos centramos en levaduras y mohos, no es raro que otros tipos de hongos, no cultivables/no detectables, alteren el producto.

## **2-Los tipos de productos donde la legislación exige su búsqueda o recuento, así como otros tipos de productos donde a nuestro criterio, sería recomendable analizarlos**

-Alimentos, en concreto: golosinas, cereales, cerveza, dietéticos, conservas de pH<4,6, cuajo, frutas-verduras-hortalizas-hierbas-setas, galletas, harinas, jarabes, grasas comestibles, miel, bollería-confitería, turrone y mazapanes.

-Medicamentos

-Cosméticos

-Aguas envasadas, a criterio del fabricante (más si también fabrican refrescos)

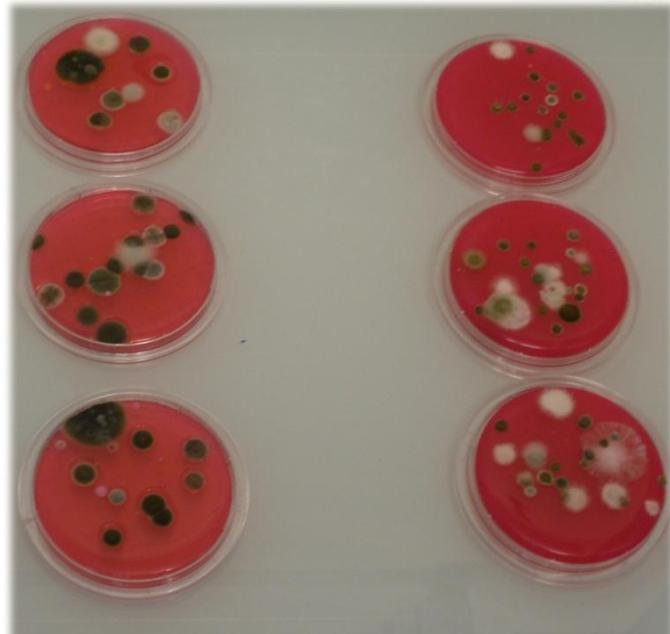
-Superficies y aire de las fábricas, sus almacenes y resto de instalaciones

-Aires interiores en oficinas y centros de trabajo cerrados

-Cualquier otra industria donde los hongos puedan alterar sus productos

### 3-Los métodos oficiales para su detección/recuento

En alimentos, aunque muchos laboratorios siguen usando agares muy arcaicos como el Sabouraud (diseñado hacia 1890), Sabouraud Caf, OGYE, YGC... la ISO 21527 de 2008 quiso acabar con los problemas de invasión de la placa por parte de mohos rápidos que estos medios implican, y exige el uso de Dichloran Glicerol Rosa Bengala Caf Agar (DRBC) en alimentos de actividad de agua mayor a 0,95 y en los más secos, Dichloran Glicerol DG18 Agar. Quienes buscan obtener biomasa más abundante de hongos (ej: *Penicillium candidum* para bañar por fuera los embutidos y que así no aparezcan mohos verdes o negros), y para investigación por su mejor



Izda: Rosa Bengala Caf Agar,  
Dcha: DRBC Agar

esporulación, se emplea el Potato Dextrose Agar, a veces agares con extracto de malta. En zumos y conservas ácidas se emplean Orange Serum Caf.Agar, y para levaduras Osmophilic Agar y Osmotolerant Agar. En bebidas alcohólicas se emplea WL Nutrient Agar, el medio más eficiente para detectar las levaduras alterativas, o el Wort Agar, y en bebidas muy ácidas el M-Green Caf Broth con cartón absorbente. Para enriquecimiento y posterior detección, es curioso ver como la mayoría de laboratorios se acomodan en hongos a las Normas ISO pensadas para bacterias y emplean también para hongos Buffered Peptone Water, medio sin los azúcares que son tan esenciales para el crecimiento de los hongos. Si empleasen Buffered Peptone Neutralizing Water, que sí tiene en cuenta esta necesidad nutritiva, obtendrían resultados más acordes a la realidad, tanto en bacterias como en hongos.

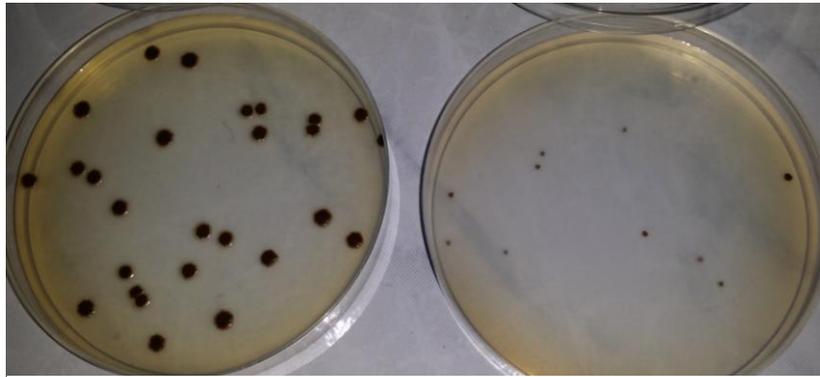
En medicamentos, Pharmacopea sigue con el uso del Sabouraud, tanto el caldo para enriquecer como el agar para aislar.



Levadura *Rhodotorula spp.* ambiental en  
Agar Sabouraud Dextrosa

En cosméticos no hay método oficial obligado, pero muchos laboratorios han seguido la ISO 16212 que imita Pharmacopea, en vez de actualizarse a medios más rápidos y sin problemas de invasión de hongos, y muchos laboratorios usan el lento Sabouraud Caf Agar. En la búsqueda activa de *Candida albicans* se usaba con gran acierto Biggy Nickerson Agar hasta que la ISO 18416 decidió cambiarlo también por el Sabouraud, un enorme paso atrás para quienes hicieron caso a esta ISO que no es de obligado cumplimiento.

El Corn Meal Agar estimula la clamidosporulación de *C.albicans* y la esporulación de otros Hongos, lo mismo que el Czapek Dox Agar.



Izda: siembra en superficie de *C.albicans* en Biggy. Dcha: mismo inóculo por siembra en masa: menos colonias y desarrolladas mucho más tarde, y mucho más pequeñas

**En aguas** no se buscan obligadamente, pero dados los problemas organolépticos que crean en muchas aguas envasadas y refrescos, muchas plantas envasadoras han elegido el Rosa Bengala Caf Agar y unos pocos el obsoleto Sabouraud Caf Agar.

**En superficies y aires**, la ISO 100.012 exige el uso de Rosa Bengala Caf Agar, medio diseñado antes que el DRBC y que tiene gran éxito también para piensos animales y fábricas de todo tipo, de las que suelen encontrar mohos invasivos de placas de cultivo. Para buscar hongos dermatofitos en piscinas y playas se emplea el DTM Agar, que vira a rojo en menos de 48h si hay hongos de este tipo, mucho antes de que cualquier medio los detecte con crecimientos coloniales.



Mayor recuperación y diversidad en Rosa Bengala Caf.Agar: *Aspergillus flavus* aflatoxigénico (amarillo), *Aspergillus fumigatus*, grave patógeno oportunista (verde), y otros hongos y levaduras de crecimiento lento que en otros medios no serían capaces de crecer.

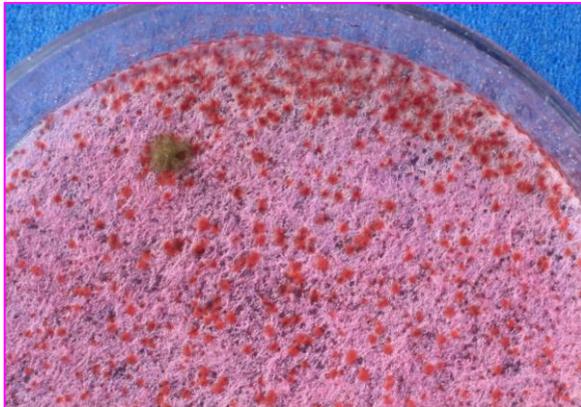
#### 4-Los métodos alternativos que mejoran la rapidez de los resultados y la robustez del análisis

Excepto en medicamentos y cosméticos, la Normativa ISO se ha ido actualizando hacia medios que, gracias al Rosa Bengala o gracias al Dichloran (o ambos), impiden la invasión de la placa por parte de los mohos.

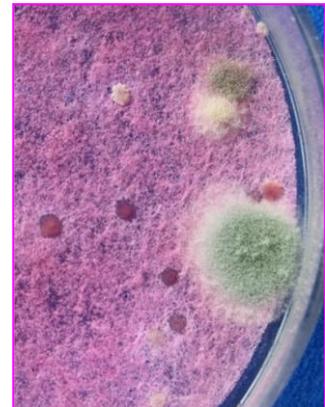
Para medios de hongos se suele cambiar la peptona bacteriológica por **polipeptona micológica**, más ácida y rica en nutrientes apetecidos por los hongos. Lamentablemente Pharmacopea no ha tenido aún esto en cuenta.

Existe un mala práctica muy extendida en hongos, se use el medio que se use: la siembra en masa. Compare entre sembrar en masa y sembrar en superficie un duplicado de muestra y verá la diferencia de recuento que obtiene (Ej: foto del Biggy). Los mohos (y muchas

levaduras) son superaerófilos, y lo mismo que nadie sembraría en masa una *Pseudomonas*, nadie debería sembrar en masa un recuento de hongos (excepto en sistemas que no emplean la reducción de oxígeno que suponen los 3 primeros mm del agar, como las **DryPlates-YM**).

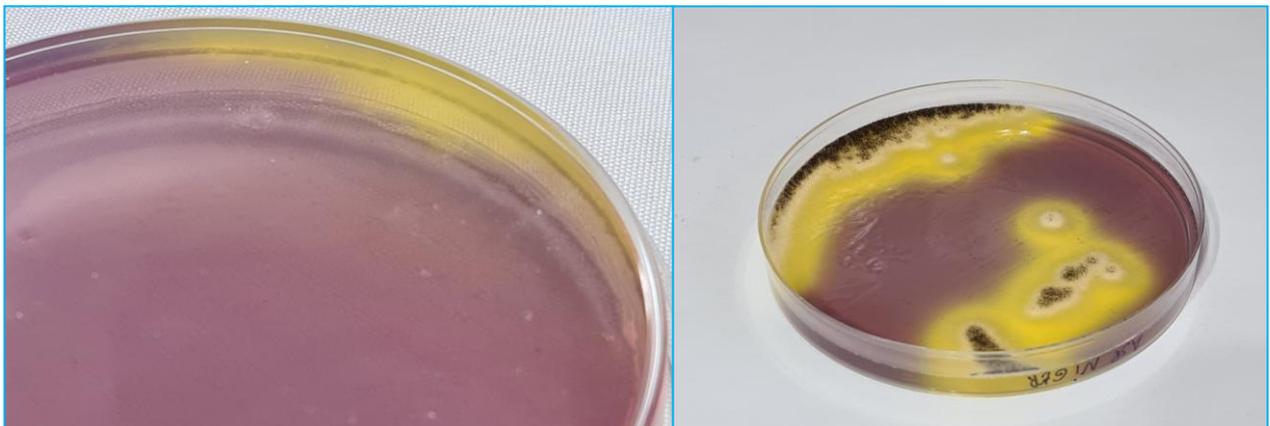


DryPlates-YM:  
colonias de  
levaduras y  
mohos. Izda:  
*Rhodotorula  
mucilaginosa* y un  
moho. Dcha: 5  
colonias de  
*Saccharomyces  
cerevisiae*, 3  
colonias  
lobuladas de otra  
levadura y  
diversos mohos



Otra mala práctica deriva de las diluciones; cuando agitamos un tubo con bacterias o levaduras, quedan suspendidas y homogeneizadas durante muchos minutos; pero cuando agitamos un tubo con mohos, éstos flotan de manera casi inmediata. Si tardamos más que unos pocos segundos en tomar la alícuota para la siguiente dilución o para la siembra en placa, el recuento va a depender gravemente de la profundidad del tubo a la que tomemos esa alícuota. Por eso la dispersión de resultados de hongos en los inters suele ser la más heterogénea entre los distintos laboratorios que no tienen en cuenta este punto crítico.

MICROKIT acaba de lanzar al mercado el **Agar Rapid YM** que permite la detección y recuento de levaduras y mohos desde las primeras 18 h de incubación, por viraje de color antes de la aparición de las colonias, en vez de los 3-5 días obligados en cualquier otro medio. Esto permite acortar los tiempos de stock de producto terminado y ahorrar a las industrias grandes cantidades de dinero, ya que los hongos siempre han sido el eslabón más débil de la cadena, el análisis microbiológico más lento que existe en las fábricas.



*Aspergillus niger*: Izda, en sólo 18h ya vira el medio de lila a amarillo en el inicio de la estría. Aspecto de la misma placa en sólo 36h.

## 5-Cómo vemos el futuro en la detección de este grupo

Creemos que el Rapid YM Agar sería usado por el 100% de laboratorios de todo tipo de industrias si lo hubiera inventado Mn.Sabouraud hace 130 años. Y lo mismo para el RB Caf o el DRBC en los laboratorios donde, en vez de rapidez, se necesita un recuento más preciso.