



X Congreso Ibérico de Agroingeniería X Congresso Ibérico de Agroengenharia

Huesca, 3-6 septiembre 2019



Biodeterioro microbiológico en shiitake (*Lentinula edodes*)

E. Tejedor-Calvo^{1,2}, S. García-Barreda¹, S. Sánchez¹, D. Morales²; P. Marco¹

¹ Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Departamento de Recursos Forestales, Av. de Montaña, 930, Zaragoza, 50059, España

² Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL UAM-CSIC), Departamento Producción y Caracterización de Nuevos Alimentos, Nicolás Cabrera, 9, Madrid, 28049, España

Resumen: *Lentinula edodes* (shiitake) es uno de los hongos más apreciados tanto por sus características organolépticas como por sus compuestos bioactivos. Sin embargo, su vida útil escasamente alcanza una semana. En este estudio se determinó la vida útil de setas shiitake bajo tres condiciones: sin envasar (temperatura ambiente), sin envasar (4 °C), y envasadas en atmósfera modificada (4 °C). Semanalmente se monitorizaron parámetros físico-químicos, microbiológicos y organolépticos, siendo estos últimos los que establecieron el fin de vida útil de los diferentes lotes. Se aislaron e identificaron bacterias previamente diferenciadas y seleccionadas por su morfología colonial, que posteriormente se inocularon en carpóforos y láminas de shiitake. Además, se realizó un antibiograma de estas cepas bacterianas frente a micelio de shiitake. Los carpóforos analizados presentaron una carga microbiana total de 5 log ufc/g, constituida principalmente por el Gº *Pseudomonas* (4,7 log ufc/g), seguido de la Fº *Enterobacteriaceae* y la micobiota. Se identificaron 49 cepas bacterianas, de las cuales 24 pertenecieron a la Fº *Enterobacteriaceae* y 20 al Gº *Pseudomonas*. Los bioensayos efectuados demostraron que las cepas aisladas de *Burkholderia* sp., *Ewingella americana* y *Rahnella* sp. se comportaron como micopatógenas, siendo la última especie capaz de inhibir, de manera considerable, el crecimiento de micelio vegetativo de shiitake.

Palabras clave: vida útil, atmósfera modificada, antibiograma, micopatógeno

1. Introducción

En la actualidad, el cultivo y el uso de hongos comestibles está suscitando un creciente interés en el sector gastronómico y en la industria farmacéutica, siendo *Lentinula edodes* (shiitake) uno de los más demandados debido a sus características organolépticas y su contenido en compuestos bioactivos. Este hongo, después del champiñón, ocupa el segundo lugar en la producción mundial con más de 1,5 millones de toneladas anuales [1]. En España, en el año 2017 se consumieron aproximadamente 56 toneladas de champiñones y setas, con un valor estimado total de 210.000 euros [2].

Las setas son alimentos altamente perecederos, cuya vida útil oscila entre uno y tres días a temperatura ambiente, alcanzando hasta 2 semanas cuando se aplican tecnologías de conservación como refrigeración o envasado. Los factores determinantes del biodeterioro son principalmente de origen fisiológico y de origen microbiológico. La elevada tasa metabólica de las setas deriva en una rápida senescencia, debida al agotamiento de sus nutrientes y la pérdida de humedad por la propia respiración. Por otro lado, la elevada carga microbiana (105 - 108 microorganismos/g), casi exclusivamente superficial, unida a un pH próximo a la neutralidad (6 - 7), una elevada humedad relativa (HR > 90 %), una alta actividad de agua ($aw \geq 0,98$), y una gama variada de nutrientes como azúcares de fácil asimilación, péptidos, aminoácidos,

X CONGRESO IBÉRICO DE AGROINGENIERÍA

X CONGRESSO IBÉRICO DE AGROENGENHARIA

3 – 6 septiembre 2019, Huesca – España

vitaminas y minerales, hacen de las setas un excelente entorno para la proliferación de microorganismos. Todos estos factores, desencadenan procesos enzimáticos que conllevan pérdidas de textura, decoloración y modificaciones de aroma.

El género *Pseudomonas* es un grupo microbiano muy competitivo en la rizosfera, participando activamente en el proceso de fructificación del hongo [3]. Sin embargo, algunas especies de este género bacteriano también parecen responsabilizarse del deterioro post-cosecha, siendo *Pseudomonas tolaasii* la de mayor potencial alterante en champiñón [4]. La proliferación de dicha bacteria sobre la superficie del carpóforo genera cambios de color, conocidos como “mancha bacteriana”, y se deben a reacciones de pardeamiento superficial producidas por la acción de la exotoxina “tolasina” [5]. *Pseudomonas agarici*, especie del mismo género, es capaz de generar colores pardos sobre el carpóforo [6]. Otra bacteria micopatógena, *Ewingella americana*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, produce necrosis interna en el pie del champiñón, aunque puede encontrarse presente en otros hongos [7].

Para prolongar la conservación en fresco, garantizando su aptitud sanitaria y sensorial, se han desarrollado y combinado diferentes tecnologías de barrera que, aun siendo asequibles y disponibles para la industria alimentaria, actualmente no están plenamente implantadas. Un ejemplo de ello es el envasado en atmósfera modificada pasiva (AM), que consiste en proteger las setas frescas con una película plástica especial. La particular permeabilidad a los gases de ésta, junto con la propia respiración de los carpóforos, determina la composición gaseosa en el interior del envase produciendo una reducción de la concentración de oxígeno y un aumento de la de dióxido de carbono. Bajo estas condiciones, se ralentiza la madurez y la llegada de la senescencia en las setas debido a la reducción de su tasa respiratoria. Además, el CO₂ genera un efecto negativo sobre la proliferación del grupo microbiano principal (Gº *Pseudomonas*) inhibiendo su metabolismo [8], y causa un efecto fungicida sobre la micobiotas epífitas (mohos y levaduras).

El objetivo de este trabajo es realizar un estudio de vida útil de *L. edodes* aplicando tecnologías postcosecha, identificar qué microorganismos son responsables del biodeterioro, y determinar el efecto micopatógeno de las cepas identificadas sobre carpóforos y micelio de *L. edodes*.

2. Materiales y métodos

2.1. Muestras

Las muestras de shiitake suministradas por el proveedor se mantuvieron en condiciones de refrigeración hasta su llegada al laboratorio, donde fueron almacenadas a 4 °C y 95 % de humedad relativa (HR) durante 24 h hasta su análisis y manipulación para el estudio de vida útil. Se diseñaron tres métodos de conservación: a temperatura ambiente sin envasar o control ambiente (1), sin envasar y refrigeración (4 °C) (2) y envasado en AM y refrigeración (4 °C) (3).

Las setas frescas en AM se envasaron en barquetas de polipropileno semirrígidas (Borden, S.A., Alicante, España) each, de 250 mL de capacidad, en las que se introdujeron alrededor de 100 gramos de setas. El cierre de los envases se realizó mediante una termoselladora manual BOV 160 (ORA Constructeur, Francia) con película plástica microperforada por láser (PPLUS, Amcor Flexible); esta película de 96 cm² está compuesta por una doble capa de polietileno (40 µm) y poliéster (12 µm). El plástico se dispuso para que quedasen dos microperforaciones (50 x 90 µm) por envase, como indican Rivera et al. [9].

2.2. Determinación de vida útil

2.2.1. Análisis de composición gaseosa

La concentración gaseosa (O₂ y CO₂) en el interior de los envases se monitorizó con un Respirómetro Checkmate II (PBI Danasensor, Barcelona, España) al envasar, a las 24 horas y 48 horas, y a intervalos regulares de 7 días durante el periodo conservación en todos los envases.

X CONGRESO IBÉRICO DE AGROINGENIERÍA
X CONGRESSO IBÉRICO DE AGROENGENHARIA
3 – 6 septiembre 2019, Huesca – España

2.2.2. Determinación de la pérdida de peso

La pérdida de peso se calculó por diferencia de pesada en una balanza Sartorius 3716 (Werke, Göttingen, Alemania) semanalmente. La pérdida se expresó como porcentaje de peso respecto al peso inicial.

2.2.3. Análisis microbiológico

La toma de muestras y los grupos microbianos se analizaron siguiendo la normativa ISO correspondiente a análisis microbiológico de alimentos (Tabla 1).

Tabla 1. Normativa ISO y procedimiento empleado para la cuantificación de los distintos grupos microbianos investigados.

Grupo microbiano	Metodología	Descripción
Preparación de muestras	ISO 6887-1:1999	Preparación de muestras, suspensiones iniciales y diluciones decimales para análisis microbiológico – Parte 1: Normas generales para la preparación de suspensiones iniciales y diluciones decimales.
Microorganismos aerobios mesófilos totales	ISO 4833-2:2013	Método de enumeración de microorganismos – Parte 2: Colonias a 30 °C mediante técnica de extensión en superficie
<i>Pseudomonas</i> spp.	ISO 13720:2011	Enumeración de presuntas <i>Pseudomonas</i> spp.
<i>F^a Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528-2:2004	Método de enumeración de Enterobacteriaceae – Parte 2: Método de conteo de colonias
Bacterias ácido lácticas	ISO 15214:1998	Método para enumerar bacterias mesófilas ácido lácticas. Técnica de recuento de colonias a 30 °C
Mohos y levaduras	ISO 21527-1:2008	Método para enumerar levaduras y mohos – Parte 1: técnica de recuento de colonias en productos con una actividad de agua mayor a 0,95

PCA: agar de recuento en placa; CFC: cetrímidina, fúcicidina, cefaloridina; VRBG: cristal violeta, rojo neutro, bilis y glucosa; MRS: de Man, Rogosa and Sharpe (Autores); DRBC: dicloran, rosa de bengala, coranfenicol.

Para el muestreo, se tomaron 25 g como analito que se colocaron en una bolsa tipo Stomacher estéril provista de filtro de celulosa. Se utilizó agua de peptona (Merck, Darmstadt, Alemania) al 0,1% como diluyente, y se homogeneizaron en un Stomacher Lab-Blender Circulator 400 (Seward Laboratory, London, England) durante 2 minutos a 260 rpm. Los medios de cultivo se prepararon siguiendo las indicaciones del etiquetado de los medios y de la normativa ISO 11133-1:2009 [10].

2.2.4. Análisis sensorial

Se realizó un análisis descriptivo de perfil clásico, en el que se evaluó apariencia externa, aspecto del himenio, aroma, textura, sabor y aceptabilidad general como parámetros sensoriales. Para estandarizar el procedimiento, se entrenó un panel sensorial compuesto por ocho catadores. Realizaron un entrenamiento de tres sesiones de 45 minutos que consistió en una caracterización de las setas, la determinación de los parámetros de calidad más importantes, y la evaluación de cada uno de ellos. Todo este proceso se llevó a cabo siguiendo la Norma ISO 11035:1994 [11]. El análisis sensorial, se realizó a la llegada de los carpóforos al laboratorio y semanalmente durante el ensayo de conservación en una sala de catas normalizada (ISO 8589:2007) [12]. Cada miembro del panel entrenado rellenó una ficha de cata para cada muestra analizada.

X CONGRESO IBÉRICO DE AGROINGENIERÍA
X CONGRESSO IBÉRICO DE AGROENGENHARIA
3 – 6 septiembre 2019, Huesca – España

2.3. Determinación de cepas responsables del biodeterioro

2.3.1. Aislamiento e identificación de colonias

Tras el recuento microbiano en los diferentes medios de cultivo utilizados para el análisis, se seleccionaron diferentes cepas en función de la morfología colonial con ayuda de una lupa binocular Leica EZ4 (Wetzlar, Alemania). Se sembraron en agar PCA (agar de recuento en placa) mediante siembra por agotamiento, se incubaron a 25 °C, y posteriormente se conservaron en refrigeración (4 °C). En total, se obtuvieron 49 microorganismos diferentes en base a su morfología. Las colonias procedían de los siguientes medios de cultivo: 15 colonias de agar PCA, 20 de agar CFC (cetrimida, fucidina y cefaloridina), 11 de agar VRBG (cristal violeta, rojo neutro, bilis y glucosa) y 3 de agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe).

La identificación de los microorganismos aislados se realizó molecularmente mediante la secuenciación de la región 16S del ADN siguiendo el protocolo de Barghouthi [13]. Para ello, se introdujo en un vial una cantidad significativa de microorganismo directamente desde cultivo puro. Posteriormente se añadieron 100 µl de PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA) en cada vial, y se llevaron a 100 °C durante 10 minutos en un termobloque (Eppendorf ThermoMixer C, Hamburgo, Alemania). Finalmente, se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga (Gyrozen, Daejeon, Corea del Sur). A continuación, en el sobrenadante se determinó la concentración de ADN con un NanoDrop 2000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, EE.UU.). Las condiciones de PCR fueron: 94 °C – 2'; [94 °C – 30''; 51 °C – 1'; 72 °C -1'] x 33 ciclos; 72 °C -7'; 4 °C - ∞. Los primers utilizados fueron: 8F – 1492R. Finalmente, se purificó el producto de reacción con el kit QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA).

Se realizó una electroforesis con un gel de agarosa al 1,5 % con tampón buffer TAE (Buffer Tris, Ácido acético, EDTA) y 0,8 µl de Midori Green (NIPPON Genetics GmbH, Düren, Germany). Se utilizó 1 µl de tampón carga y 4 µl de la muestra. La corriente empleada fue de 60 mV, a partir de una fuente de electroforesis BioRad PowerPac HV (BioRad, California, USA). La revelación de bandas se llevó a cabo en un transiluminador (Chemidoc XRS+ BioRad, EEUU) con la ayuda del software GeneSys (Syngene, Cambridge, United Kingdom). Tras verificar la calidad de las bandas de ADN, se añadieron 3 µl de Primer R y 10 µl del producto de la PCR en viales para secuenciar las muestras, y se almacenaron a 10 °C. La secuenciación se externalizó a la empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal). Tras 48 horas, se recibieron las secuencias que se visualizaron y refinaron mediante el software 4Peaks (Nuclebytes, Ámsterdam, Holanda).

2.3.2. Ensayo de patogenicidad sobre carpóforos de shiitake

Los 49 microorganismos aislados, se revivificaron en caldo TSB (Caldo Soja Triptona). Tras 24 horas de incubación a 30 °C, los microorganismos se inocularon sobre la cutícula de carpóforos enteros y sobre láminas de *L. edodes* con una concentración ajustada a 10⁸ ufc/ml por la escala de McFarland. Las láminas se colocaron en placas de Petri y los carpóforos en bandejas de plástico cubiertas con film para evitar su deshidratación. Ambos envases, se incubaron a 10 °C hasta percibir visualmente daños considerables en la zona de inoculación.

2.3.3. Ensayo de patogenicidad sobre micelio puro de shiitake

Para la obtención de micelio se seleccionaron carpóforos y se desinfectó la cutícula con etanol al 70%. Con un bisturí estéril se realizó un corte superficial en el sombrero y se fraccionó en 2 mitades evitando la contaminación cruzada. Se obtuvieron porciones rectangulares de tejido fúngico que se depositaron sobre placas con PDA (Merck, Darmstadt, Alemania). El hongo se incubó a 25 °C hasta que el micelio había cubierto toda la superficie y se conservaron a 4 °C. Se trajeron círculos de micelio puro con un sacabocados estéril, y se inocularon en el centro de

placas de Petri con agar PCA. En cada placa se inocularon 4 microorganismos por punción aislados en puntos equidistantes. Las placas se incubaron durante dos semanas a 25 °C.

2.4. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se compararon estadísticamente mediante un análisis de varianza de un factor (ANOVA de una vía) combinado con el test de Tukey de rango múltiple con un nivel de significación del 0,05. En el análisis de datos se utilizó el programa estadístico SPSS versión 22.0.0.

3. Resultados y discusión

3.1. Evolución de la atmósfera interna

La evolución de las concentraciones de CO₂ y O₂ en el interior del envase durante 28 días se muestra en la Figura 1.

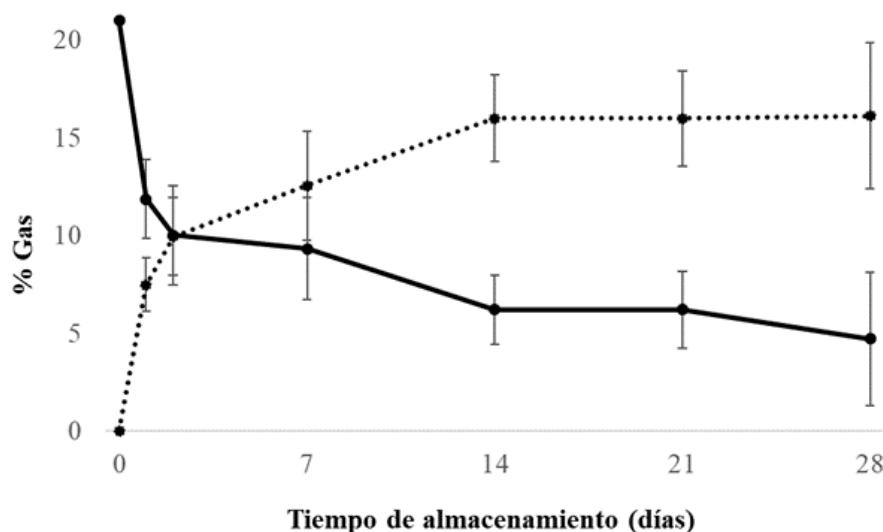


Figura 1. Evolución del CO₂ (—●— línea continua) y O₂ (···· líne discontinua) de setas shiitake envasadas en atmósfera modificada y almacenadas a temperatura de refrigeración (4 °C). Los datos están expresados como media de tres medidas ± desviación estándar.

El incremento de CO₂ fue muy elevado durante las primeras 48 h alcanzando un 10 % en la atmósfera interna. Este efecto se redujo paulatinamente hasta alcanzar una concentración de 16 % a las cuatro semanas. En la concentración de O₂ ocurre el efecto contrario, decrece rápidamente durante los dos primeros días alcanzando un 10 %, disminuyendo progresivamente llegando a alcanzar condiciones próximas a anoxia (5 % de O₂) al final del periodo de conservación. Una acumulación excesiva de CO₂ puede causar lesiones fisiológicas a los hongos, produciendo un pardeamiento severo, o favorecer la proliferación de microorganismos anaerobios facultativos como *Clostridium botulinum* [14]. La falta de oxígeno conduce a una situación de anoxia acompañada de olores extraños debido a la producción de sustancias volátiles, como etanol y acetaldehído [15].

El hongo shiitake tiene una alta tasa respiratoria y una mayor susceptibilidad a elevadas concentraciones de CO₂ que otras especies [16]. Estos investigadores compararon dos tipos de envases, polietileno (PE) de baja densidad y polipropileno (PP). La concentración de O₂ disminuyó rápidamente en ambos casos durante los primeros cinco días de almacenamiento,

manteniéndose constante posteriormente (1,3 %), concentraciones inferiores a las de este estudio. Sin embargo, la concentración de CO₂ aumentó durante los primeros cinco días y se mantuvo constante hasta 13,6 y 9 % en los envases de PP y PE respectivamente, valores inferiores a los obtenidos en el presente estudio (16 %). Dichas diferencias pueden deberse a dos factores: el tipo de plástico utilizado (tamaño y número de perforaciones) o a las diferencias intraespecie de las cepas de *L. edodes* utilizadas en ambos ensayos. Rivera et al. [9, 17] realizaron un ensayo con las mismas condiciones de envasado y película plástica en hongos hipogeo. Tras tres semanas de almacenamiento, obtuvieron resultados similares a los de este trabajo en *Tuber melanosporum* (7,5 % O₂ y 15 % CO₂) y en *Tuber aestivum* (8 % O₂ y 14 % CO₂).

3.2. Evolución del peso

La evolución del peso de shiitake bajo diferentes condiciones de conservación se muestra en la Figura 2.

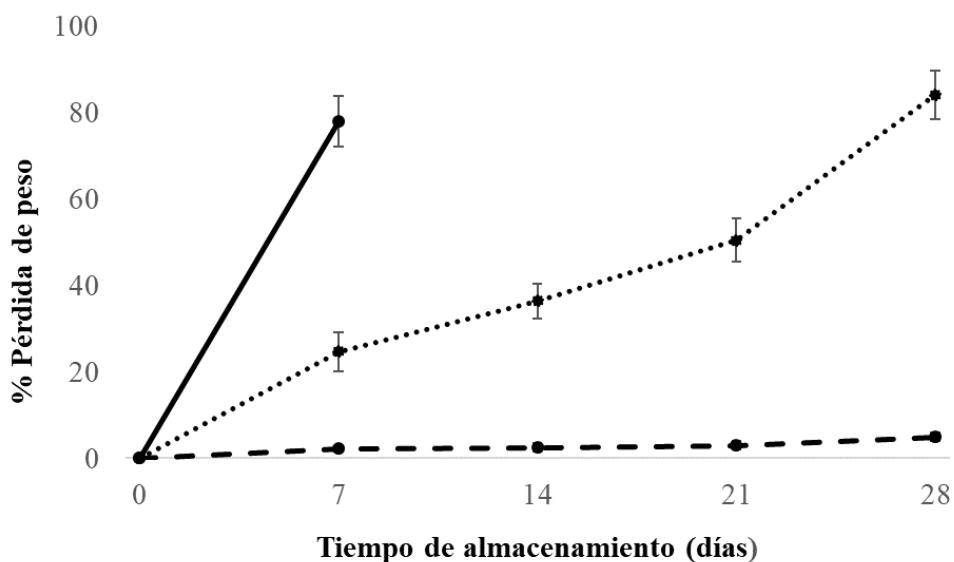


Figura 2. Evolución de la pérdida de peso (%) en *L. edodes* bajo diferentes condiciones de almacenamiento: —●— sin envasar a 25 °C, ······ sin envasar 4 °C, y -·— envasado en atmósfera modificada 4 °C. Los datos están expresados como media de tres medidas ± desviación estándar.

Los lotes sin envasar a temperatura ambiente sufrieron una pérdida de casi 80 % en peso durante los siete primeros días. Aplicando tan sólo refrigeración la pérdida se reduce al 25 % en el mismo periodo de tiempo; y si además se incorpora un envasado en AM la pérdida es de tan sólo un 2 %. Al final del periodo de conservación, el lote sin envasar (4 °C) tuvo pérdidas de peso superiores al 80 %, sin embargo, el lote envasado con atmósfera modificada no superó el 5 %. Algunos autores han demostrado que el uso de AM reduce significativamente la pérdida de peso en los hongos durante la conservación [9, 17]. De la misma manera en shiitake, Ares et al. [16] obtuvieron pérdidas en torno a 5 % utilizando plásticos microperforados y superiores al 47 % en contenedores macroperforados durante 16 días de almacenamiento bajo refrigeración. Otros estudios en shiitake establecen una pérdida de peso en torno al 72 % tras seis días de almacenamiento a temperatura ambiente [18], evolución similar a este estudio.

X CONGRESO IBÉRICO DE AGROINGENIERÍA
X CONGRESSO IBÉRICO DE AGROENGENHARIA
3 – 6 septiembre 2019, Huesca – España

3.3 Evolución de la microbiota

La Tabla 2 muestra los recuentos iniciales de los grupos microbianos analizados en este estudio, y los obtenidos por otros autores.

Tabla 2. Comparación de recuentos microbianos (log UFC/g) de microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT), Género *Pseudomonas* (PSE), Familia *Enterobacteriaceae* (ENT), bacterias ácido lácticas (BAL), mohos y levaduras (ML) en carpóforos de *L. edodes* frescos.

Autores	AMT	PSE	ENT	BAL	ML
Reyes et al. (2004) [7]	4,87 ± 1,06	4,51 ± 1,08	3,60 ± 0,98	-	-
Parentelli et al. (2007) [19]	5,41	-	-	3,60	3,95
Santana et al. (2008) [20+]	4,00	-	-	-	-
Jiang et al. (2010) [21]	4,30 ± 0,03	6,20 ± 0,22	-	-	4,10 ± 0,04
Venturini et al. (2011) [22]	4,90 ± 1,20	4,40 ± 1,20	3,70 ± 1,10	1,70 ± 0,90	3,90 ± 0,70
Jiang et al. (2012) [23]	4,12 ± 0,06	5,37 ± 0,16	-	-	3,81 ± 0,10
Jiang et al. (2013) [24]	3,97 ± 0,22	4,89 ± 0,24	-	-	3,32 ± 0,70
Presente trabajo	4,97 ± 0,32	4,68 ± 0,22	3,53 ± 1,20	2,53 ± 0,73	4,06 ± 0,17

- grupos microbianos no estudiados.

Inicialmente, los recuentos microbianos obtenidos son similares a los de otros autores (Tabla 2) y prácticamente iguales a los descritos por Venturini et al. [22]. El grupo más importante es el Gº *Pseudomonas*, seguido de la micobacteria y de la Fº *Enterobacteriaceae*. Las bacterias lácticas quedan en un segundo plano; y, en nuestro caso, no se detectan mohos debido, probablemente, a la elevada carga de levaduras. A diferencia del resto de autores, Jiang et al. [21, 23, 24] indican un recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales inferior al de *Pseudomonas*. Comparando con otras especies como *Agaricus bisporus*, cuya carga inicial es 7,5 y 7,2 log ufc/g de microorganismos aerobios mesófilos totales y *Pseudomonas*, respectivamente, la carga microbiana inicial de *L. edodes* es notablemente inferior [25], posiblemente debido a los compuestos antimicrobianos propios de esta especie.

Los grupos microbianos evolucionaron de forma dispar según el método de conservación. En el lote a temperatura ambiente aumentó ligeramente la carga microbiana en todos los grupos analizados tras 7 días de conservación. En el lote sin envasar bajo refrigeración, la carga microbiana aumenta ligeramente las 3 primeras semanas disminuyendo posteriormente, debido probablemente a la pérdida de humedad, inhibiendo a su vez la proliferación microbiana y llegando incluso a inactivarla. En el tercer lote, atmósfera modificada y refrigeración, se produce un incremento de poblaciones microbianas a lo largo del periodo de conservación, llegando a alcanzar unos recuentos de 8,4 u.log de aerobios mesófilos totales.

El recuento total de microorganismos aerobios totales (Figura 3-A) durante la primera semana fue similar en todos los lotes. A medida que aumenta el tiempo de conservación las diferencias son más notables, siendo estadísticamente significativas después de la tercera semana. En el lote envasado en AM la carga microbiana aumenta hasta la última semana; sin embargo, en el lote sin envasar los recuentos aumentan durante las tres primeras semanas, descendiendo casi una unidad logarítmica la última semana por la gran pérdida de humedad. Sucede lo mismo en las *Pseudomonas* y en las enterobacterias. La presencia de CO₂ (16 %) no dificulta el crecimiento de las primeras (Figura 3-B) pese a ser aerobias estrictas, y las segundas (Figura 3-C), aero-anaerobias facultativas, llegan a tener recuentos ligeramente superiores a *Pseudomonas* en el lote envasado en AM a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento. No hubo diferencias significativas de los recuentos de bacterias ácido lácticas (Figura 3-D) entre lotes hasta la última semana de

almacenamiento. La alta concentración de CO₂ facilita el crecimiento de este grupo bacteriano. Los recuentos de mohos y levaduras (Figura 3-E) se mantienen constantes a lo largo de la conservación, incluso descendieron en el caso del envasado en AM.

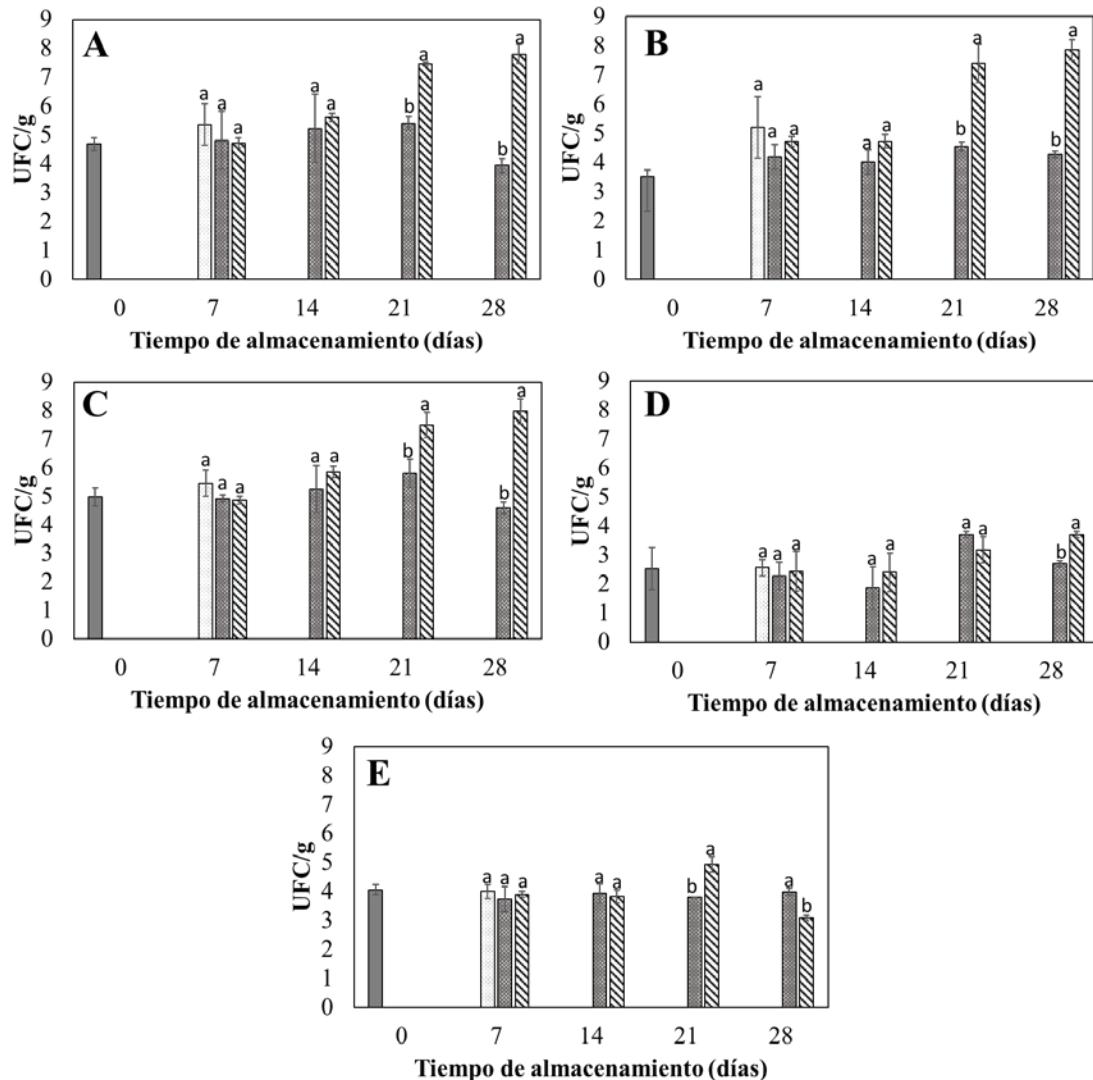


Figura 3. Evolución de los microorganismos aeróbicos mesófilos (A), G° *Pseudomonas* (B), F° *Enterobacteriaceae* (C), bacterias ácido lácticas (D) y mohos y levaduras (E) de *L. edodes* almacenados en diferentes condiciones. ■ Inicial; □ sin envasar a 25 °C, ▨ sin envasar 4 °C, y ▨ envasado en AM 4 °C. Los datos están expresados como media ± desviación estándar por triplicado. a,b Diferentes letras infican diferencias significativas entre diferentes métodos de conservación en el mismo día ($p < 0.05$)

Otros estudios realizados con shiitake han obtenido recuentos similares de aerobios mesófilos totales (7.3 ufc/g), y superiores en *Pseudomonas* (8.7 ufc/g), mohos y levaduras (6.8 ufc/g) tras 20 días de almacenamiento en AM [21]. En champiñón, la carga microbiana de aerobios mesófilos totales y *Pseudomonas* aumentó de forma similar a nuestros resultados en las mismas condiciones de conservación [25]. Y en hongos hipogeo, *T. melanosporum* y *T. aestivum*, se han reportado aumentos de 2 u.log de aerobios mesófilos totales tras 4 semanas de almacenamiento en AM [9, 22], inferiores a los de este estudio. Esta diferencia de incremento con

el Gº *Tuber* puede ser debida a que el recuento inicial en shiitake es inferior al del Gº *Tuber* (7 u.log), por tanto, las poblaciones microbianas tienen mayor rango para su proliferación.

3.4 Evaluación del análisis sensorial

La vida útil se estableció en base al Real Decreto 30/2009 [26] y a las características organolépticas de los carpóforos. Visualmente, este biodeterioro se caracterizó por la aparición de manchas blancas superficiales, la pérdida de humedad y el oscurecimiento de los carpóforos. En el diagrama de araña (Figura 4) se comparan los datos del análisis descriptivo durante 28 días en los diferentes métodos de conservación. Cabe señalar que aquellos cuerpos fructíferos con una puntuación inferior a 6.0 en cualquiera de los parámetros mencionados anteriormente no fueron aceptados como comercializables.

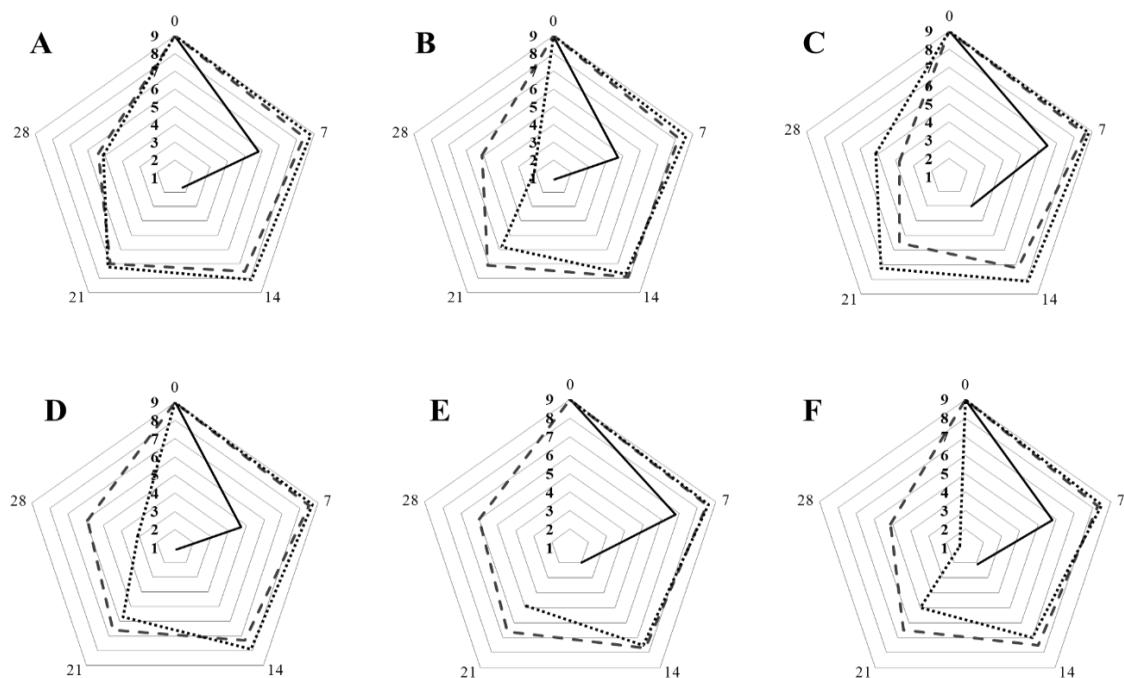


Figura 4. Evaluación de atributos sensoriales: apariencia externa (A), apariencia del himenio (B), textura (C), aroma (D), sabor (E) y aceptabilidad general (F) de *L. edodes* durante 28 días. Atributos valorados en una escala de 1-9 (9 = definitivamente aceptable, 7 = aceptable, 5 = puede ser aceptable, 3 = inaceptable, 1 = definitivamente inaceptable). — Sin envasar (25 °C), — — sin envasar (4 °C), y - - - envasado en AM (4 °C)

Se establecieron menos de siete días de vida útil para shiitake conservado a temperatura ambiente sin envasar, debido a la gran pérdida de humedad y como consecuencia la pérdida de textura y de aroma característica del shiitake fresco. En lotes conservados bajo refrigeración fueron dos semanas debido principalmente a la pérdida de textura, de sabor y de aroma. En el caso del lote envasado también se alcanzó la vida útil de dos semanas debido a la modificación de las características sensoriales y el aumento de la carga microbiana. Se observó un mayor oscurecimiento en comparación con el resto de los lotes.

La AM, al impedir pérdidas de humedad, facilita la proliferación microbiana y por ello los atributos valorados a los 21 días tienen puntuaciones más bajas. En cambio, los lotes sin envasar en AM, al tener una gran pérdida de humedad, impiden que los microorganismos se desarrollen, afectando éstos a las propiedades sensoriales. De los resultados obtenidos se observa que solo la refrigeración aumenta de manera muy significativa la vida útil del shiitake. Sin embargo, el

envasado en AM no parece contribuir a este aumento en la vida útil, aunque reduce significativamente la deshidratación, preservando la textura.

3.5. Identificación de las cepas responsables del biodeterioro

Se identificaron 49 cepas aisladas del ensayo de vida útil de shiitake (Figura 5). Casi la totalidad de cepas aisladas, y por tanto presentes a lo largo de la vida útil de shiitake son Gram -, en concreto, gamma proteobacterias del género *Pseudomonas* y de la Familia *Enterobacteriaceae*. Dentro de este grupo de bacterias anaerobias facultativas, predominó el Gº *Ewingella* con 19 cepas. Además, se encontraron 8 especies diferentes de *Pseudomonas*: *P. tolaasii*, *P. fluorescens*, *P. brenneri*, *P. palleroniana*, *P. yamanorum*, *P. jessenii*, *P. reinekei*, *P. psychrophilia*.

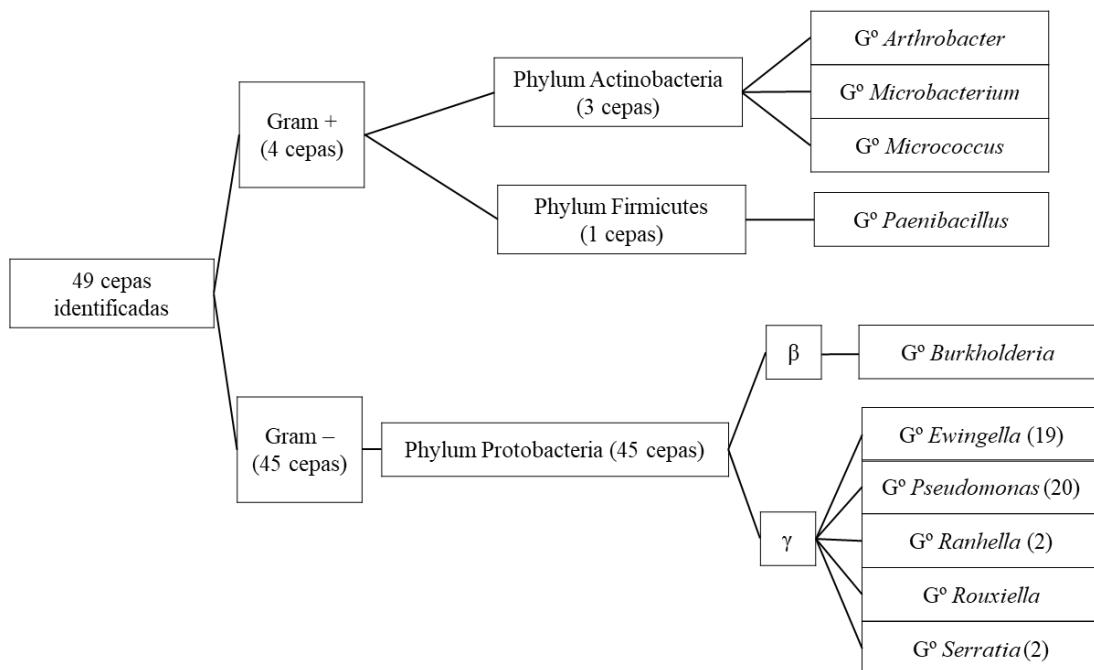


Figura 5. Clasificación de las cepas bacterianas aisladas de shiitake a lo largo de la conservación.

La mayoría de las Actinobacterias se encuentran en el suelo y juegan un importante rol en la descomposición de compuestos orgánicos, como la celulosa y quitina, al igual que el Gº *Burkholderia* y las *Pseudomonas*. Las enterobacterias actúan como fermentadores de carbohidratos en condiciones anaeróbicas con o sin la producción de gas, teniendo capacidad oxidante de una amplia gama de substratos en condiciones aeróbicas.

Algunos autores han asociado algunas de estas bacterias como responsables de la degradación de muchas especies de hongos [3] debido a las toxinas producidas [4] o a el carácter patógeno de la propia bacteria [7].

3.6 Confirmación de cepas responsables de biodeterioro

Tras inocular las cepas en carpóforos y láminas de shiitake, se determinó visualmente que el mayor daño en el himenio fue causado por bacterias pertenecientes a la Fº *Enterobacteriaceae*: *Ewingella americana* y *Rahnella* sp; sin embargo, en la cutícula superficial, el mayor daño fue causado por *Burkholderia* sp. Visualmente *Rahnella* sp. (Figura 6-C) tuvo mayor capacidad de biodeterioro, aunque el daño producido por *Ewingella americana* (Figura 6-B) fue similar. Sin

embargo, *Pseudomonas tolaassi* (Figura 6-D), responsable de la macha parda en champiñón, apenas produjo daños siendo similar al control (Figura 6-A).

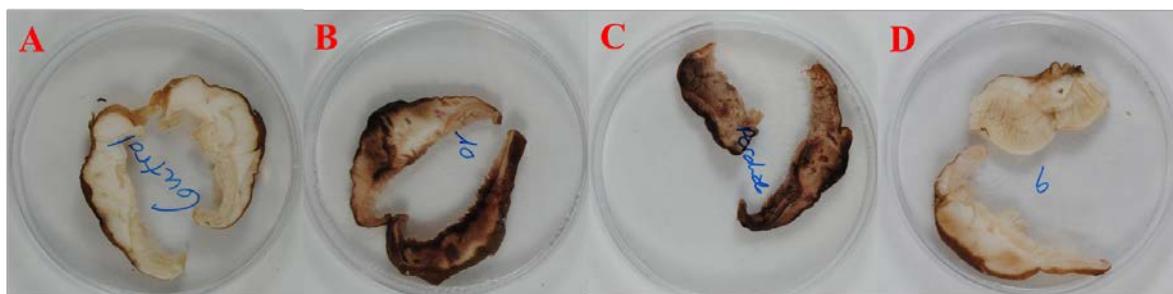


Figura 6. Láminas de shiitake inoculadas con las cepas aisladas y almacenadas durante una semana a 10 °C: Control sin inoculación (A); inoculo con *Ewingella Americana* (B); *Rahnella* sp (C); y *Pseudomonas tolaassi* (D).

Ewingella americana demostró tener la mayor capacidad de biodeterioro en el himenio. Sin embargo, *Burkholderia* sp., de carácter aerobio estricto, fue la que más afectó a la cutícula superficial, degradando completamente el resto del carpóforo. *Rahnella* sp., aunque desde un punto visual. Produjo menos daño, aunque la textura se vio seriamente afectada en el área inoculada.

El reservorio de *E. americana* es desconocido, pero ha sido aislado como un patógeno oportunista en humanos [27]. También se ha aislado de zanahorias [28] y carne envasada al vacío [29]. Reyes et al. [7] establecieron que *E. americana* tiene un efecto micopatogénico, causando una lesión marrón y necrosis en el pie del carpóforo. Por otro lado, Chowdhury y Heinemann [30] señalan que *Burkholderia gladioli* es un patógeno importante, que causa el ablandamiento y el deterioro de numerosos hongos comerciales, como *L. edodes*, *A. bisporus* y *Pleurotus ostreatus*. Sin embargo, es la primera vez que *Rahnella* sp. se aísla en hongos. Sólo esta especie tuvo un claro efecto sobre el micelio de *L. edodes*, inhibiendo su crecimiento (Figura 7). En la primera semana de incubación tuvo un ligero efecto inhibitorio (Figura 7-A) que no ocurrió en el resto de las especies enfrentadas. En la segunda semana se observó el pardeamiento del micelio (Figura 7-B). El resto de las colonias inoculadas no afectaron el crecimiento del micelio, aunque algunas cepas de *E. americana* mostraron una ligera inhibición alrededor de la colonia, que impidió el crecimiento por encima de ella.

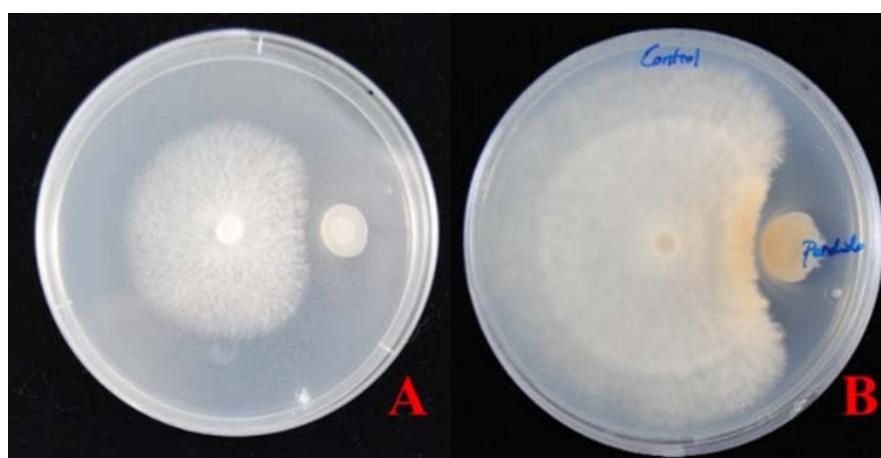


Figura 7. Inhibición del crecimiento de micelio por la cepa aislada *Rahnella* sp.: incubación a 10 °C durante 1 (A) y dos semanas (B)

X CONGRESO IBÉRICO DE AGROINGENIERÍA
X CONGRESSO IBÉRICO DE AGROENGENHARIA
3 – 6 septiembre 2019, Huesca – España

Rao et al. [31] testaron la inhibición de extractos acuosos de shiitake frente a *Rahnella* y *Serratia*, entre otras, obteniendo la mínima inhibición con estas cepas. Es posible que estas bacterias inhiban o afecten, de alguna manera, el metabolismo de compuestos liposolubles y no los hidrosolubles. Se ha descrito que *P. tolaasii* produce compuestos volátiles como metanotiol, disulfuro de dimetilo y 1-undeceno que inducen la inhibición del crecimiento de micelios in vitro de varios hongos provocando pardeamiento del micelio [32]. Sin embargo, en este estudio, no afectó al crecimiento de micelio de shiitake. Es posible que *Rahnella* produzca otros compuestos volátiles que puedan ser responsables del pardeamiento.

4. Conclusiones

La carga microbiana del shiitake (5 log ufc/g) está mayoritariamente constituida por especies bacterianas del Gº *Pseudomonas* (4,7 log ufc/g), la micobiota (4,1 log ufc/g), la Fº *Enterobacteriaceae* (3,5 log ufc/g), y las bacterias lácticas (2,5 log ufc/g). El fin de vida útil vino determinado por criterios organolépticos que, a su vez, estuvieron directamente relacionados con la pérdida de peso y el incremento de la microbiota. La conservación de shiitake a temperatura ambiente causó una merma del producto (80 % en siete días) debido a la pérdida de humedad. La aplicación de refrigeración (4 ºC) disminuyó la pérdida de humedad, aunque permitió la proliferación de los microorganismos. El almacenamiento de shiitake fresco en atmósfera modificada (4 ºC) redujo significativamente las pérdidas de humedad (5 % en veintiocho días). Sin embargo, la alta humedad es responsable del aumento de mesófilos totales, pseudomonas y enterobacterias al final de la vida útil. A pesar de que la atmósfera modificada no prolonga la vida útil respecto a la refrigeración, es extremadamente recomendable debido a la prevención de pérdidas del producto.

El biodeterioro fue causado principalmente por bacterias Gram -. *Ewingella americana*, *Burkholderia* sp y *Rahnella* sp se comportaron como micopatógenas, pero tan sólo la última especie mostró, de manera clara, la inhibición del crecimiento del micelio vegetativo de shiitake. El desarrollo de métodos rápidos de detección de microorganismos micopatógenos permitirá establecer medidas preventivas y correctivas, que reducirían las pérdidas económicas en la industria del cultivo de hongos, desde la producción de sustrato y micelio a la producción de carpóforos y comercialización.

5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el INIA mediante el Proyecto RTA2015-00053-00-00.

Referencias

1. Hinestrosa-Cordoba, L.I., López-Malo, A. (2008) Aspectos relacionados con la producción de *L. edodes* (shiitake): una seta con alto potencial alimenticio y medicinal. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos. Universidad de las Américas-Puebla, México. Temas de Ingeniería de Alimentos (2) 16-21.
2. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (<https://www.mapa.gob.es/es/>)
3. Giménez, A. P., de Juan Valero, J. A., & González, J. P. Factores que influyen en la iniciación de la fructificación del champiñón cultivado. Factores microbiológicos. 2002
4. Soler-Rivas, C., Arpin, N., Olivier, J. M., & Wickers, H. J. The effects of tolaasin, the toxin produced by *Pseudomonas tolaasii* on tyrosinase activities and the induction of browning in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. Physiological and molecular plant pathology. 1999, 55(1), 21-28.
5. Mamoun, M., Moquet, F., Laffitte, J., & Olivier, J. M. *Pseudomonas tolaasii*: extra-genomic factor mediates toxin production and efficiency. FEMS microbiology letters. 1997, 153(1), 215-219.
6. Geels, F. P., Hesen, L. P. W., & Griensven, L. J. L. D. (2008). Brown discolouration of mushrooms caused by *Pseudomonas agarici*. Journal of Phytopathology, 140(3), 249-259.

X CONGRESO IBÉRICO DE AGROINGENIERÍA

X CONGRESSO IBÉRICO DE AGROENGENHARIA

3 – 6 septiembre 2019, Huesca – España

7. Reyes, J. E., Venturini, M. E., Oria, R., & Blanco, D. Prevalence of *Ewingella americana* in retail fresh cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus*) in Zaragoza (Spain). *FEMS microbiology ecology*. 2004, 47(3), 291-296.
8. King Jr, A. D., & Nagel, C. W. Growth inhibition of a *Pseudomonas* by carbon dioxide. *Journal of Food Science*. 1967, 32(5), 575-579.
9. Rivera, C. S., Venturini, M. E., Marco, P., Oria, R., & Blanco, D. Effects of electron-beam and gamma irradiation treatments on the microbial populations, respiratory activity and sensory characteristics of *Tuber melanosporum* truffles packaged under modified atmospheres. *Food microbiology*. 2011, 28(7), 1252-1260.
10. ISO 11133-1:2009 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory
11. ISO 11035:1994 Sensory analysis -- Identification and selection of descriptors for establishing a sensory profile by a multidimensional approach
12. ISO 8589:2007 Sensory analysis -- General guidance for the design of test rooms
13. Barghouthi, S. A. (2011). A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. *Indian journal of microbiology*, 51(4), 430-444.
14. Farber, J. N., Harris, L. J., Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Gorney, J. R., Garret, E.H., & Busta, F. F. Microbiological safety of controlled and modified atmosphere packaging of fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2003, 2, 142-160.
15. Burton, A. J., Zogg, G. P., Pregitzer, K. S., & Zak, D. R. Effect of measurement CO₂ concentration on sugar maple root respiration. *Tree Physiology*. 1997, 17(7), 421-427.
16. Ares, G., Lareo, C., & Lema, P. Modified atmosphere packaging for postharvest storage of mushrooms. A review. *Fresh Produce*. 2007, 1(1), 32-40.
17. Rivera, C. S., Blanco, D., Marco, P., Oria, R., & Venturini, M. E. Effects of electron-beam irradiation on the shelf life, microbial populations and sensory characteristics of summer truffles (*Tuber aestivum*) packaged under modified atmospheres. *Food microbiology*. 2011, 28(1), 141-148.
18. Antmann, G., Ares, G., Lema, P., & Lareo, C. Influence of modified atmosphere packaging on sensory quality of shiitake mushrooms. *Postharvest biology and technology*. 2008, 49(1), 164-170.
19. Parentelli, C., Ares, G., Corona, M., Lareo, C., Gámbaro, A., Soubes, M., & Lema, P. Sensory and microbiological quality of shiitake mushrooms in modified-atmosphere packages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007, 87(9), 1645-1652
20. Santana, C. C., Vanetti, M. C. D., & Kasuya, M. C. M. Microbial growth and colour of minimally processed shiitake mushroom stored at different temperatures. *International journal of food science & technology*. 2008, 43(7), 1281-1285.
21. Jiang, T., Luo, S., Chen, Q., Shen, L., & Ying, T. Effect of integrated application of gamma irradiation and modified atmosphere packaging on physicochemical and microbiological properties of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Food Chemistry*. 2010, 122(3), 761-767.
22. Venturini, M. E., Reyes, J. E., Rivera, C. S., Oria, R., & Blanco, D. Microbiological quality and safety of fresh cultivated and wild mushrooms commercialized in Spain. *Food microbiology*. 2011, 28(8), 1492-1498.
23. Jiang, T., Feng, L., & Li, J. Changes in microbial and postharvest quality of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) treated with chitosan–glucose complex coating under cold storage. *Food Chemistry*. 2012, 131(3), 780-786.
24. Jiang, T., Feng, L., & Wang, Y. Effect of alginate/nano-Ag coating on microbial and physicochemical characteristics of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) during cold storage. *Food chemistry*. 2013, 141(2), 954-960.
25. González-Fandos, E., Giménez, M., Olarte, C., Sanz, S., & Simón, A. Effect of packaging conditions on the growth of micro-organisms and the quality characteristics of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*) stored at inadequate temperatures. *Journal of Applied Microbiology*. 2000, 89(4), 624-632.

X CONGRESO IBÉRICO DE AGROINGENIERÍA
X CONGRESSO IBÉRICO DE AGROENGENHARIA
3 – 6 septiembre 2019, Huesca – España

26. Real Decreto 30/2009, de 16 de enero, por el que se establecen las condiciones sanitarias para la comercialización de setas para uso alimentario. Boletín Oficial del Estado, nº20, de 23 de enero de 2009, 7861-7871.
27. Tsokos, M. Fatal Waterhouse-Friderichsen syndrome due to *Ewingella americana* infection. The American journal of forensic medicine and pathology. 2003, 24(1), 41-44.
28. Hamilton-Miller, J. M. T., & Shah, S. Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. International journal of antimicrobial agents. 2001, 18(1), 81-83.
29. Helps, C. R., Harbour, D. A., & Corry, J. E. PCR-based 16S ribosomal DNA detection technique for *Clostridium estertheticum* causing spoilage in vacuum-packed chill-stored beef. International journal of food microbiology. 1999, 52(1), 57-65.
30. Chowdhury, P. R., & Heinemann, J. A. The general secretory pathway of *Burkholderia gladioli* pv. *agaricicola* BG164R is necessary for cavity disease in white button mushrooms. Applied and environmental microbiology. 2006, 72(5), 3558-3565.
31. Rao, J. R., Millar, B. C., & Moore, J. E. Antimicrobial properties of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*). International journal of antimicrobial agents. 2009, 33(6), 591-592.
32. Lo Cantore, P., Giorgio, A., & Iacobellis, N. S. Bioactivity of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas tolaasii*. Frontiers in microbiology. 2015, 6, 1082.