



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**APLICACIÓN DE DIFERENTES TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA  
EVALUAR LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA DE ALIMENTOS Y  
SUPERFICIES**

**MEMORIA PRESENTADA POR BEATRIZ ELENA VALDÉS DUQUE**

**PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR DENTRO DEL PROGRAMA DE  
DOCTORADO DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS DEL DEPARTAMENTO DE  
CIENCIA ANIMAL Y DE LOS ALIMENTOS**

**BELLATERRA, SEPTIEMBRE DE 2007**



**FACULTAT DE VETERINÀRIA DE BARCELONA**

M<sup>a</sup> MANUELA HERNÁNDEZ HERRERO y JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ,  
Profesores Titulares del Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Ciencia  
Animal y de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona,

Informan:

Que la memoria titulada **Aplicación de diferentes técnicas analíticas para evaluar la contaminación fúngica de alimentos y superficies**, presentada por Beatriz E. Valdés Duque para optar al grado de Doctor por la “Universitat Autònoma de Barcelona”, ha sido realizada bajo su dirección y considerándola finalizada, autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Bellaterra, a 14 de Septiembre de 2007.

M<sup>a</sup> Manuela Hernández Herrero

José Juan Rodríguez Jerez

---

Este trabajo ha sido realizado con la financiación aportada por:

La Generalitat de Catalunya mediante su programa de Beques de Formació d'Investigadors predoctorals per a estudiants internacionals, associades a programes de doctorat consolidats i a programes de doctorat de qualitat internacional.

---

## RESUMEN

Los hongos representan un creciente problema en nuestra sociedad como organismos contaminantes de alimentos, del aire, del agua, de las superficies interiores de las casas y como patógenos importantes para la salud humana, por lo que es importante implantar diferentes estrategias de control, entre las que se incluye la aplicación de un programa de limpieza y desinfección durante la elaboración y comercialización de los alimentos. Dentro de este programa es fundamental establecer límites críticos y aplicar un sistema adecuado para su vigilancia y verificación. En este sentido se deben tener en consideración la selección del desinfectante apropiado para reducir o eliminar la micobiota presente en el ambiente y las superficies, así como la aplicación de técnicas que permitan valorar la eficacia de la desinfección. Estos métodos presentan ventajas e inconvenientes, siendo necesario determinar para cada industria la técnica que mejor permite evaluar la contaminación de las superficies. El análisis de la contaminación fúngica es laborioso y necesita un tiempo prolongado para la obtención de resultados, lo cual limita la aplicación de medidas correctoras.

En este estudio se desarrolló un método impedanciométrico para el recuento de hongos. El medio de cultivo que mostró mejores respuestas en la capacitancia fue el que contenía peptona de soja y extracto de levadura al 0,5%, gelatina al 8%, cloranfenicol al 0,025%, ajustado a un pH de 5,5. Este medio permitió el recuento de esporas de los principales géneros fúngicos (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Rhizopus*) aislados en alimentos y superficies de la industria elaboradora de alimentos deshidratados a concentraciones entre  $10^2$  y  $10^6$  ufc/g, con la ventaja de reducir el tiempo de análisis a 26-70 horas, dependiendo del género predominante.

También se compararon diferentes técnicas de muestreo y análisis para vigilar y verificar la contaminación fúngica tras la limpieza y desinfección de las superficies de una industria elaboradora de alimentos deshidratados, así mismo se evaluó la actividad fungicida de cuatro soluciones desinfectantes frente a la micobiota predominante en estas superficies. Para dicha verificación se establecieron diferentes límites críticos en función de la técnica de muestreo y análisis utilizada. Entre estas técnicas, la siembra directa de un disco de acero inoxidable que estuvo adherido a las superficies de la industria durante una semana, fue la que mostró mayores recuentos, siendo la más rigurosa en la calificación de aceptabilidad de la higienización de las superficies. Mientras que, la técnica impedanciométrica presentó una

utilidad limitada como sistema de verificación. Los desinfectantes con mayor efectividad sobre la microbiota predominante en esta industria fueron el hipoclorito sódico (1000 mg/l de cloro libre) y una solución al 1% de un producto desinfectante basado en aldehídos y amonio cuaternario.

Finalmente se determinó el grado de contaminación y el tipo de microbiota presente en las superficies de un establecimiento de comercialización de alimentos. Los mayores recuentos fúngicos se obtuvieron con las técnicas de impronta, siembra directa del disco e hisopado de 100 cm<sup>2</sup>. Las levaduras fueron la microbiota predominante en las secciones de comercialización de productos a temperatura de refrigeración, mientras que en los comercializados a temperatura ambiente predominaron los mohos de los géneros *Penicillium* y *Cladosporium*.

## SUMMARY

Fungi represent a growing concern for our society as human health pathogens and as contaminants of foods, air and the interior surfaces of our homes. Thus, the implementation of different risk control strategies like cleaning and disinfection programmes for food production and commercialisation becomes mandatory. For these programmes it is important to establish critical limits and to apply an adequate system for assuring its surveillance and fulfilment. The selection of an adequate disinfectant agent to reduce or destroy ambient and surface microbiota and the application of techniques that allow us to evaluate the efficacy of the disinfection has to be taken into consideration. This sort of techniques present advantages as well as inconveniences and for every particular industry it must be stated which one achieves the best evaluation of surface contamination. Analysing fungi contamination can be a hard task and requires prolonged times for consecution of results which in return, limits the use of corrective actions.

On this study was developed an impedanciometric method for counting fungi. The culture medium that showed best responses to capacitance methods was the one containing: soy peptone and yeast extract (0.5%); gelatine (8%) and cloramphenicol (0,025%) adjusted to pH 5.5. This medium allowed spore count of the main fungi genera (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* and *Rhizopus*) isolated in foods and surfaces of dehydrated-food producing facilities in concentrations between  $10^2$  to  $10^6$ cfu/g. The time of analysis varied between 26 and 70 h depending on the dominant genera.

Moreover, different sampling techniques for surveillance were compared and fungi contamination was assessed, after applying surface cleaning and disinfection procedures in a dehydrated food manufacturing industry. Fungicide activity of four disinfectant solutions related to the dominant microbiota of these surfaces was evaluated. Critical limits were established as a function of the sampling techniques and analyses chosen. From the techniques used the one which yielded higher counts and permitted more accurate qualification of food surface acceptability was the direct spread of stainless steel discs which were previously adhered to the surfaces during one week. Impedance measures were of limited use as system of verification. The disinfectant agents that showed higher efficacy against the dominant microbiota in the processing facilities were: sodium hypochlorite (1000 mg/L of free chloride) and a 1% solution of a product containing aldehydes and quaternary ammonium.

Finally, the degree of surface contamination inside food commercialising installations was determined. The highest fungi counts were obtained using agar contact plates techniques, direct spread of stainless steel discs and swabbing of 100 cm<sup>2</sup>. Yeast were the dominant microbiota in the refrigerating commercialisation areas whereas for room temperature products fungi of the genera *Penicillium* and *Cladosporium* prevailed.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABLAS .....	viii

### CAPITULO I

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. OBJETIVOS .....	5
2.1. Objetivo general .....	5
2.2. Objetivos específicos.....	5

### CAPITULO II

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	6
1. Hongos: importancia sanitaria e industrial .....	7
2. Origen de la contaminación fúngica en los alimentos .....	10
3. Micotoxinas .....	15
4. Estrategias para prevenir la contaminación fúngica .....	18
4.1. Control en las industrias alimentarias: limpieza y desinfección.....	20
4.1.1. <i>Factores que afectan a la eficacia de los desinfectantes</i> .....	24
4.1.2. <i>Resistencia microbiana a los agentes desinfectantes</i> .....	27
4.1.3. <i>Principios activos de mayor utilización en los procesos de desinfección industrial</i> 29	
4.1.4. <i>Evaluación de la eficacia de los desinfectantes</i> .....	33
4.1.5. <i>Vigilancia y verificación del programa de higienización en el control de la contaminación fúngica</i> .....	35
5. Métodos de análisis de la contaminación fúngica en los alimentos y las superficies alimentarias.....	38
5.1. Métodos tradicionales .....	39
5.1.1. <i>Técnicas microscópicas</i> .....	39
5.1.2. <i>Métodos de recuento en placa</i> .....	40
5.1.3. <i>Método del número más probable (NMP)</i> .....	44
5.2. Técnicas rápidas .....	45
5.2.1. <i>Análisis microscópico usando tinciones fluorescentes</i> .....	45



5.2.2. <i>Citometría de flujo</i> .....	46
5.2.3. <i>Detección de metabolitos y constituyentes celulares</i> .....	47
5.2.4. <i>Métodos impedanciométricos</i> .....	47
5.2.5. <i>Métodos enzimáticos</i> .....	50
5.2.6. <i>Métodos inmunológicos</i> .....	51
5.2.7. <i>Métodos moleculares</i> .....	53

### CAPITULO III

<b>III. MÉTODO DE RECuento FÚNGICO MEDIANTE IMPEDANCIOMETRÍA: PUESTA A PUNTO</b> .....	<b>55</b>
<b>1. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>56</b>
1.1. <b>Diseño experimental</b> .....	<b>56</b>
1.2. <b>Selección de las cepas</b> .....	<b>56</b>
1.2.1. <i>Aislamiento e identificación</i> .....	57
1.3. <b>Separación de esporas y conservación de las cepas</b> .....	<b>57</b>
1.4. <b>Preparación de las suspensiones fúngicas en los productos alimenticios</b> .....	<b>58</b>
1.5. <b>Puesta a punto del método de recuento fúngico mediante impedanciometría</b> ....	<b>58</b>
1.5.1. <i>Determinación del sistema óptimo de detección</i> .....	59
1.5.2. <i>Influencia del medio de cultivo</i> .....	59
1.5.3. <i>Influencia de la matriz alimenticia</i> .....	60
1.5.4. <i>Influencia del pH</i> .....	60
1.5.5. <i>Efecto de la adición de antibióticos</i> .....	60
1.5.5.1 <i>Selección de los antibióticos y su efecto en la microbiota de los productos alimenticios</i> .....	60
1.5.5.2 <i>Evaluación de la influencia de los antibióticos en la respuesta impedanciométrica</i> .	61
1.5.6. <i>Efecto de la temperatura de incubación</i> .....	61
1.6. <b>Validación de la efectividad del método impedanciométrico</b> .....	<b>61</b>
1.6.1. <i>Validación con cultivos puros</i> .....	61
1.6.2. <i>Efecto de la incubación total o parcial en Bactometer</i> .....	62
1.6.3. <i>Validación con alimentos artificialmente contaminados</i> .....	62
1.7. <b>Análisis estadístico</b> .....	<b>63</b>
<b>2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>64</b>
2.1. <b>Selección, aislamiento e identificación de las cepas fúngicas</b> .....	<b>64</b>

<b>2.2. Puesta a punto del método de recuento fúngico mediante impedanciometría ...</b>	<b>65</b>
2.2.1. <i>Influencia del medio de cultivo.....</i>	65
2.2.2. <i>Influencia de la matriz alimenticia.....</i>	69
2.2.3. <i>Influencia del pH.....</i>	72
2.2.4. <i>Efecto de la adición de antibióticos .....</i>	73
2.2.4.1 <i>Selección de los antibióticos y su efecto en la microbiota de los productos alimenticios .....</i>	73
2.2.4.2 <i>Evaluación de la influencia de los antibióticos en la respuesta impedanciométrica .</i>	73
2.2.5. <i>Efecto de la temperatura de incubación .....</i>	75
<b>2.3. Validación de la efectividad del método impedanciométrico .....</b>	<b>76</b>
2.3.1. <i>Validación con cultivos puros .....</i>	76
2.3.2. <i>Efecto de la incubación total o parcial en Bactometer .....</i>	81
2.3.3. <i>Validación del método con alimentos artificialmente contaminados.....</i>	83

## **CAPITULO IV**

<b>IV. EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA DURANTE LAS ETAPAS DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE ALIMENTOS ..</b>	<b>86</b>
<b>EVALUACIÓN DURANTE LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS DESHIDRATADOS .....</b>	<b>87</b>
<b>1. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>87</b>
1.1. <b>Diseño experimental.....</b>	<b>87</b>
1.2. <b>Características de la industria de alimentos .....</b>	<b>88</b>
1.3. <b>Selección de las superficies de muestreo.....</b>	<b>88</b>
1.4. <b>Verificación del proceso de limpieza y desinfección.....</b>	<b>89</b>
1.4.1. <i>Análisis de las superficies .....</i>	89
1.5. <b>Aislamiento e identificación de los hongos .....</b>	<b>91</b>
1.5.1. <i>Identificación de géneros fúngicos.....</i>	91
1.5.2. <i>Identificación de especies de Aspergillus .....</i>	91
1.6. <b>Análisis estadístico.....</b>	<b>92</b>
<b>2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>93</b>
2.1. <b>Selección de las superficies de muestreo.....</b>	<b>93</b>
2.2. <b>Verificación del proceso de limpieza y desinfección.....</b>	<b>95</b>
2.2.1. <i>Establecimiento de límites críticos en el recuento fúngico.....</i>	96

2.3.	Valoración de la contaminación fúngica en las superficies .....	98
2.3.1.	<i>En función del día de visita.....</i>	98
2.3.2.	<i>En función de la técnica de muestreo.....</i>	99
2.3.3.	<i>En función de la zona de producción .....</i>	101
2.3.4.	<i>En función del área de tratamiento .....</i>	103
2.4.	Recuento fúngico por impedancia directa.....	105
2.5.	Técnica de bioluminiscencia .....	107
2.6.	Aislamiento e identificación de los hongos .....	108
2.6.1.	<i>Identificación de géneros fúngicos .....</i>	108
2.6.2.	<i>Identificación de especies de Aspergillus .....</i>	109
<b>EVALUACIÓN DURANTE LA COMERCIALIZACIÓN .....</b>		<b>111</b>
1.	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>111</b>
1.1.	Diseño experimental .....	111
1.2.	Descripción de la empresa y selección de las superficies de muestreo .....	112
1.3.	Evaluación de la contaminación de las superficies.....	113
1.4.	Aislamiento e identificación de los hongos .....	114
2.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>115</b>
2.1.	Selección de las superficies de muestreo.....	115
2.2.	Evaluación de la contaminación de las superficies.....	116
2.2.1.	<i>En función del día de ensayo .....</i>	116
2.2.2.	<i>En función de la técnica de muestreo.....</i>	117
2.2.3.	<i>En función de la sección .....</i>	119
2.3.	Análisis fúngico por impedancia directa.....	122
2.4.	Aislamiento e identificación de los hongos .....	123
 <b>CAPITULO V</b>		
V.	<b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA DE DIFERENTES SOLUCIONES DESINFECTANTES .....</b>	<b>126</b>
1.	<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>127</b>
1.1.	Diseño experimental .....	127
1.2.	Cepas y desinfectantes.....	128
1.3.	Selección del neutralizante .....	128
1.4.	Selección de las concentraciones de principio activo para cada desinfectante..	129

<b>1.5.</b>	<b>Evaluación de la eficacia fungicida de los desinfectantes .....</b>	<b>130</b>
<b>1.6.</b>	<b>Ensayo de validación de la neutralización .....</b>	<b>131</b>
<b>1.7.</b>	<b>Verificación de la metodología y cálculo de la eficacia de los desinfectantes ....</b>	<b>131</b>
<b>1.8.</b>	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>132</b>
<b>2.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>133</b>
<b>2.1.</b>	<b>Evaluación de la eficacia fungicida de los desinfectantes .....</b>	<b>133</b>
<b>2.1.1.</b>	<b><i>Amonio cuaternario .....</i></b>	<b><i>133</i></b>
<b>2.1.2.</b>	<b><i>Desinfectante utilizado en la industria .....</i></b>	<b><i>135</i></b>
<b>2.1.3.</b>	<b><i>Hipoclorito sódico.....</i></b>	<b><i>136</i></b>
<b>2.1.4.</b>	<b><i>Ácido peracético.....</i></b>	<b><i>138</i></b>
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>143</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>146</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ATP:	Trifosfato de Adenosina
BPU:	Unidad de Procesado Bactometer
CY20S:	Agar Czapek Extracto de Levadura con 20% de Sacarosa
CYA:	Agar Czapek Extracto de Levadura
CZ:	Agar Czapek Dox
DT:	Tiempo de Detección
EMA:	Extracto de Malta Agar
MRD:	Maximun Recovery Diluent
PCA:	Agar de Recuento en Placa
PCR:	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDA:	Potato Dextrosa Agar
SDA:	Sabouraud Dextrosa Agar
SNK:	Student Newman Keuls
SP/YE:	Peptona de Soja y Extracto de Levadura
TNTC:	Recuento demasiado numeroso para ser contado
TSA:	Agar Trypticase de Soja
ufc:	unidad formadora de colonias
YMM:	Medio Levaduras y Mohos

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diseño experimental del estudio para realizar el recuento fúngico mediante impedanciometría en alimentos deshidratados.....	56
<b>Figura 2.</b> Efecto del agar-agar como gelificante en las respuesta de la capacitancia en EMA, SDA, SP/YE agar e YMM agar.....	66
<b>Figura 3.</b> Efecto de la gelatina como gelificante en la respuesta de la capacitancia en EM, SD, SP/YE y YMM.....	68
<b>Figura 4.</b> Efecto de la matriz alimenticia (agua, leche, cacao y cereales) en la respuesta de capacitancia. ....	70
<b>Figura 5.</b> Efecto del pH 4,5 del medio de cultivo SP/YE gelatina en la respuesta de la capacitancia. ....	72
<b>Figura 6.</b> Comparación en la respuesta de la capacitancia de las cepas de <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> y <i>Rhizopus</i> en medio de cultivo SP/YE gelatina.....	77
<b>Figura 7.</b> Rectas de calibración de las cepas de <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> y <i>Rhizopus</i> en medio de cultivo SP/YE gelatina.....	81
<b>Figura 8.</b> Recta de calibración en medio de cultivo SP/YE gelatina, para alimentos artificialmente contaminados con <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Cladosporium</i> y <i>Aspergillus</i> .....	84
<b>Figura 9.</b> Diseño experimental del estudio para verificar la eficacia del programa de higienización en una industria de productos deshidratados.....	87
<b>Figura 10.</b> Recuento fúngico obtenido mediante el hisopado de 100cm <sup>2</sup> y los valores de ATP en las 31 superficies de muestreo.....	108
<b>Figura 11.</b> Diseño del experimento para evaluar la contaminación fúngica durante la comercialización.....	111
<b>Figura 12.</b> Imágenes de superficies con los discos de acero inoxidable en algunas de las secciones evaluadas.....	113
<b>Figura 13.</b> Nivel de contaminación fúngica en las superficies de las seis secciones evaluadas (media y desviación estándar). ....	120
<b>Figura 14.</b> Diseño del experimento para evaluar la eficacia de los desinfectantes.....	127

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales micotoxinas y algunas especies fúngicas que las producen (Silva-Chitarra, 2003; Magan y col., 2003; Logrieco y col., 2003).....	17
<b>Tabla 2.</b> Frecuencia y porcentaje, de los géneros fúngicos determinados en las 759 colonias evaluadas de las 295 placas de agar rosa de bengala. ....	64
<b>Tabla 3.</b> Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas (media y desviación estándar), en diferentes medios de cultivo. ....	69
<b>Tabla 4.</b> Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas en medio de cultivo SP/YE gelatina con diferentes matrices alimenticias (media y desviación estándar). ....	71
<b>Tabla 5.</b> Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas en medio SP/YE gelatina a diferentes pH y en solución acuosa de cereales (media y desviación estándar). ....	73
<b>Tabla 6.</b> Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas en medio SP/YE gelatina con diferentes antibióticos y en solución acuosa de cereales (media y desviación estándar). ....	74
<b>Tabla 7.</b> Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas en medio de cultivo SP/YE gelatina a dos temperaturas de incubación (media y desviación estándar). ....	75
<b>Tabla 8.</b> Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas de <i>Penicillium</i> , en medio SP/YE gelatina en soluciones acuosas de diferentes productos alimenticios (media y desviación estándar).....	78
<b>Tabla 9.</b> Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas de <i>Aspergillus</i> , en medio SP/YE gelatina en soluciones acuosas de diferentes productos alimenticios (media y desviación estándar).....	79
<b>Tabla 10.</b> Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas de <i>Cladosporium</i> , en medio SP/YE gelatina en soluciones acuosas de diferentes productos alimenticios (media y desviación estándar).....	79
<b>Tabla 11.</b> Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas de <i>Rhizopus</i> , en medio SP/YE gelatina en soluciones acuosas de diferentes productos alimenticios (media y desviación estándar).....	80

<b>Tabla 12.</b> Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas de las cuatro cepas en soluciones acuosas de los diferentes productos alimenticios incubadas total o parcialmente en Bactometer (media y desviación estándar)...	82
<b>Tabla 13.</b> Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas para alimentos artificialmente contaminados con <i>Penicillium</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Cladosporium</i> y <i>Aspergillus</i> incubadas total o parcialmente en Bactometer (media y desviación estándar).....	85
<b>Tabla 14.</b> Recuento de hongos con placas Petrifilm™, en las superficies de muestreo seleccionadas (media ± desviación estándar).....	95
<b>Tabla 15.</b> Límites críticos y niveles objetivos de la contaminación fúngica establecidos para cada técnica de muestreo (valores por 100cm <sup>2</sup> ).....	96
<b>Tabla 16.</b> Contaminación fúngica determinada en las tres visitas en función de la técnica de muestreo utilizada (media log ufc/100cm <sup>2</sup> ± desviación estándar).....	99
<b>Tabla 17.</b> Recuento fúngico y porcentaje global de superficies rechazadas de acuerdo a los valores establecidos como límite crítico para cada una de las técnicas de muestreo empleadas (media ± desviación estándar).....	100
<b>Tabla 18.</b> Comparación de la recuperación fúngica obtenida con diferentes técnicas de muestreo, a partir de las superficies de cada zona de elaboración (media log ufc/100cm <sup>2</sup> ± desviación estándar).....	102
<b>Tabla 19.</b> Porcentajes de superficies que se rechazan de acuerdo a las zonas de elaboración, por cada técnica de muestreo.....	103
<b>Tabla 20.</b> Recuentos de hongos obtenidos de las superficies a lo largo de la línea de elaboración, con diferentes técnicas de muestreo (media log ufc/100cm <sup>2</sup> ± desviación estándar).....	104
<b>Tabla 21.</b> Porcentajes de superficies que se rechazan por áreas de tratamiento (presecado, secado y post-secado), evaluando en conjunto las zonas de producción 1 y 2. ..	105
<b>Tabla 22.</b> Relación de los resultados obtenidos con los dos protocolos de análisis fúngico (método tradicional e impedancia directa) en las muestras de hisopado de 100 cm <sup>2</sup> .....	106
<b>Tabla 23.</b> Géneros fúngicos identificados en las superficies de la industria después de la limpieza y desinfección.....	108
<b>Tabla 24.</b> Distribución de las secciones y de las superficies de muestreo en las que se evaluó la contaminación fúngica en el hipermercado.....	112



<b>Tabla 25.</b> Distribución de los recuentos fúngicos en las 15 secciones evaluadas, en función del valor medio de la contaminación global (media en placas Petrifilm). .....	115
<b>Tabla 26.</b> Recuentos totales de la contaminación fúngica de las superficies en función del día de visita (media $\pm$ desviación estándar). .....	116
<b>Tabla 27.</b> Comparación de la recuperación fúngica total, obtenida con diferentes técnicas de muestreo a partir de las superficies del hipermercado (media $\pm$ desviación estándar). .....	119
<b>Tabla 28.</b> Relación de los resultados obtenidos con los dos protocolos de análisis fúngico (método tradicional e impedancia directa) en las muestras de hisopado de 100 cm <sup>2</sup> . .....	123
<b>Tabla 29.</b> Principales géneros fúngicos y su porcentaje de frecuencia, determinados en las secciones de charcutería y quesos (C y Q), pescado, verdura envasada (V-E), panadería, pasillos y frutas y verduras frescas (F y V). .....	124
<b>Tabla 30.</b> Eficacia fungicida de las tres concentraciones del amonio cuaternario (cloruro de didecildimetilamonio) sobre las cinco cepas fúngicas, expresados como reducción del logaritmo decimal (media $\pm$ desviación estándar). .....	134
<b>Tabla 31.</b> Eficacia fungicida de las tres concentraciones del desinfectante industrial (5% cloruro de didecildimetilamonio, 2% glutaraldehído y 1,52% formol) sobre las cinco cepas fúngicas, expresados como reducción del logaritmo decimal (media $\pm$ desviación estándar). .....	136
<b>Tabla 32.</b> Eficacia fungicida de las tres concentraciones de hipoclorito sódico sobre las cinco cepas fúngicas, expresados como reducción del logaritmo decimal (media $\pm$ desviación estándar). .....	137
<b>Tabla 33.</b> Eficacia fungicida de las tres concentraciones de ácido peracético sobre las cinco cepas fúngicas, expresados como reducción del logaritmo decimal (media $\pm$ desviación estándar). .....	139

## **CAPITULO I**

---

### **I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

## **1. INTRODUCCIÓN**

Los hongos son microorganismos ubicuos en el ambiente y representan un creciente problema en nuestra sociedad actual como organismos contaminantes de alimentos, del aire, del agua, de las superficies interiores de las casas y como patógenos importantes para la salud humana (Brul y Klis, 1999; Singh, 2005). Si bien muchos de ellos no son patógenos, pueden comportarse como oportunistas y afectar adversamente a la salud produciendo alergias, infecciones y toxicidad (Jarvis, 2002; Fischer y Dott, 2003; Singh, 2005). En los últimos años, la contaminación fúngica del aire ha adquirido una gran importancia desde el punto de vista de los riesgos para la salud que se originan por las mismas esporas o por sus metabolitos microbianos (Fischer y Dott, 2003).

La contaminación de los productos alimenticios puede provenir principalmente de los componentes de la materia prima, las superficies, las personas y el ambiente (Holah, 1995b; Duran y Marshall, 2002; Reij y Den Aantrekker, 2004). Los mohos pueden crecer sobre todo tipo de productos alimenticios como cereales y productos derivados, carne, leche, frutas, vegetales, frutos secos, grasas y sus derivados (Müller, 1981; Frazier y Westhoff, 1985; Anónimo, 2000; Jay, 2002; Ray, 2004). Tanto su crecimiento como la producción de micotoxinas, están influenciados por factores intrínsecos como actividad del agua, pH y potencial de oxido-reducción y por factores extrínsecos, como humedad relativa, temperatura y disponibilidad de oxígeno (FAO, 1998). Las industrias de alimentos deben elaborar productos de alta calidad, libres de microorganismos patógenos y sus toxinas y, que respondan en su composición a los principios exigibles (Kiermeier y Mrozek, 2000; Vincent, 2002).

Los procesos industriales en los que se procesa alimentos, proporcionan nutrientes y las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos (Maukonen y col., 2003). Algunos de ellos pueden establecerse en el ambiente de elaboración del alimento y encontrar nichos para sobrevivir por largos períodos de tiempo. En los ambientes secos de las plantas de elaboración de productos como leche en polvo, chocolate o sopas deshidratadas, los niveles de microorganismos en estos nichos pueden permanecer bajos. Sin embargo, en los ambientes húmedos o después de un procedimiento de limpieza húmeda los microorganismos patógenos pueden incluso multiplicarse hasta altos niveles (Reij y Den Aantrekker, 2004). En el caso de los mohos, se ha descrito que pueden utilizar como microclimas las humedades y condensaciones que por lo general existen en ambientes cerrados, para desarrollar sus nichos

y producir un gran número de esporas (Singh, 2005). Particularmente, las industrias que elaboran alimentos y bebidas favorecen su desarrollo tanto en las superficies de paredes y techos como en la planta de procesamiento, debido a la condensación de vapor y la presencia de una atmósfera rica en nutrientes (Heaton y col., 1990).

Para prevenir la contaminación cruzada de alimentos, desde las superficies de trabajo o el ambiente, es fundamental en su producción el aplicar un adecuado programa de limpieza y desinfección. La clave para una limpieza efectiva de una planta de alimentos es el conocimiento del tipo y naturaleza de las sustancias a limpiar, incluyendo los microorganismos a ser eliminados de las superficies (Wirtanen y col., 2001). La preparación de un protocolo para asegurar que este procedimiento es de buena calidad, debe basarse en un plan de acción con múltiples etapas, incorporando un producto de limpieza y un agente desinfectante (Maris, 1998; Anónimo, 2001). Los desinfectantes a utilizar en la industria alimentaria deben cumplir dos principios básicos: no ser tóxicos ni producir pigmentaciones. Estas limitaciones reducen la selección de biocidas a sólo unos pocos productos, que además, son menos efectivos en presencia de materia orgánica (Holah, 1995b). No obstante, deben cumplir siempre los requerimientos generales con respecto a su eficacia para reducir la microbiota contaminante y patógena (Orth, 1998). Los industriales necesitan estar seguros que los desinfectantes utilizados son eficaces bajo las condiciones ambientales de su industria (Gibson y col., 1995), por lo que es esencial realizar las valoraciones de su eficacia por métodos documentados, repetibles y reproducibles (Kiermeier y Mrozek, 2000). Además, es recomendable conocer la microbiota predominante en las superficies, para seleccionar el producto desinfectante adecuado (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1996). La aptitud y efectividad de los programas de limpieza y desinfección en las diferentes etapas de producción, debe ser continua y efectivamente controlada con métodos microbiológicos (Orth, 1998). Factores intrínsecos y extrínsecos afectan a la composición de la población microbiana condicionando así, el método de muestreo del ambiente industrial. No existe ningún método de control de superficies suficientemente sólido para adoptarlo como estándar (Moore y Griffith, 2002b), por lo tanto tampoco existe de forma consensuada límites críticos que permitan decidir si una superficie ha sido adecuadamente higienizada desde el punto de vista de la contaminación fúngica.

La finalidad del control microbiológico es evidenciar que no existe una contaminación a lo largo de todas las etapas de tratamiento, hasta alcanzar el producto terminado y asegurar que

el perfil microbiológico del proceso final, garantiza una óptima condición comercial (García-Ramírez, 1989). En el análisis de la contaminación fúngica los procedimientos más comúnmente empleados incluyen métodos tradicionales y técnicas rápidas (Holah y col., 1989; Jay, 2002). Sin embargo, las técnicas convencionales basadas en el recuento de hongos en placas de agar tienen como principales desventajas la demora en la obtención de resultados y la preparación de las muestras (Twomey y Mackie, 1985; Torres y col., 1997; Berenguer-Soler, 2000). En la industria de alimentos se hace necesario contar con métodos más rápidos, como las técnicas impedanciométricas, que además de proporcionar una adecuada información de la posible presencia de microorganismos patógenos en las materias primas y los productos finales, permitan controlar el proceso de elaboración y controlar la limpieza y las prácticas de higiene.

## **2. OBJETIVOS**

Los objetivos de esta tesis fueron:

### **2.1. Objetivo general**

Aplicar diferentes técnicas analíticas para evaluar la contaminación fúngica de alimentos deshidratados y superficies alimentarias. Así como valorar la eficacia fungicida de diferentes desinfectantes sobre la microbiota predominante.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Puesta a punto de un método de recuento fúngico por impedanciometría para alimentos deshidratados.
- Aplicación y comparación de métodos de recuento fúngico, para la verificación de la eficacia del programa de limpieza y desinfección de una industria alimentaria.
- Valoración de la contaminación fúngica en una gran superficie de comercialización de alimentos y comparación de diferentes técnicas de muestreo y análisis para el recuento fúngico.
- Evaluación de la actividad fungicida de cuatro soluciones desinfectantes sobre los principales géneros contaminantes de las superficies de la industria elaboradora de alimentos deshidratados.

## **CAPITULO II**

---

### **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### 1. Hongos: importancia sanitaria e industrial

Los hongos representan un creciente problema en nuestra sociedad actual como organismos contaminantes de alimentos, de las superficies interiores de las casas y como patógenos importantes para la salud humana (Brul y Klis, 1999). Son microorganismos ubicuos en el ambiente, encontrándose en suelo, el aire, el agua, los alimentos y la materia en descomposición. Debido a esa naturaleza ubicua, se han identificado numerosos reservorios como el aire no filtrado, los sistemas de ventilación, el aire acondicionado, polvo de las construcciones, alfombras, cuartos de baño, cojines, plantas ornamentales y ventiladores de computadores, entre otros. Las esporas fúngicas están muy bien adaptadas para ser diseminadas por el aire desde los reservorios previamente mencionados (Gots y col., 2003; Singh, 2005). Al ser transportadas por el aire y debido a su pequeño tamaño, pueden ser inhaladas e incluso, pueden depositarse en las superficies mucosas de las vías respiratorias superiores y en los ojos (Singh, 2005). Normalmente, las personas respiran entre 100-200 esporas por día, que potencialmente pueden colonizar individuos susceptibles como pacientes con neutropenia severa o inmunosupresión, en los que se llegan a desarrollar infecciones invasivas (Singh, 2005; Carreras, 2006). El período de incubación de estas infecciones es desconocido, pero puede estimarse entre 2 días y 3 meses (Wald y col., 1997).

Muchos hongos no son patogénicos para personas sanas. Comúnmente, los hongos de interés en el ambiente y la higiene ocupacional son en su mayoría especies no patógenas o patógenas facultativas (oportunistas). Sin embargo, pueden afectar adversamente a la salud humana a través de 3 procesos: alergias, infección y toxicidad (Jarvis, 2002; Fischer y Dott, 2003; Singh, 2005). Las especies no patógenas, tales como *Penicillium* y los más comunes del suelo, son ubicuos y no causan infección, pero son relevantes como alérgenos y productores de micotoxinas. Los patógenos oportunistas como algunos dermatofitos, *Aspergillus* termotolerantes (especialmente *A. fumigatus*), *Scopulariopsis* sp., y ciertos mucorales, son también ubicuos pero sólo afectan la salud humana, cuando otros factores predisponentes están presentes (Fischer y Dott, 2003). Las reacciones alérgicas están generalmente limitadas a rinitis, irritación de ojos, tos y empeoramiento del asma (Singh, 2005; Jarvis y Miller, 2005). La exposición repetida a grandes cantidades de propágulos fúngicos específicos, aumentan el riesgo de desarrollar estas reacciones. Dentro de las especies fúngicas de contaminación aerógena, se incluyen esporas de *Alternaria*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Drechslera* y *Epicoccum*. Especies de los géneros *Botrytis*, *Rhizopus* y *Trichoderma*, tienen



una importancia alérgica particular. Adicionalmente, ciertas levaduras como *Candida*, son también alérgicas y tienen una gran importancia clínica (Singh, 2005). De hecho se han descrito en Francia procesos alérgicos en niños tras la ingestión tanto de corteza de queso camembert como de salchichón causada por *Penicillium* (Morisset y col., 2003; Boisnault y col., 2005). Se considera que la sensibilización de la población francesa a las especies fúngicas es de un 5-10% (10-13% en los niños) (Boisnault y col., 2005). Las infecciones adquiridas a través del tracto intestinal o la piel son inusuales (Carreras, 2006).

Aunque más de 100.000 especies de hongos han sido descritas, sólo un número limitado de éstas son reconocidas como patógenas para el hombre, por ejemplo: *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Cryptococcus* e *Histoplasma*. Estos pueden infectar también individuos no inmunodeprimidos, produciendo las infecciones: aspergillosis, blastomycosis, histoplasmosis, criptococosis y coccidioidomicosis (Singh, 2005).

La toxicidad, hace referencia a las sustancias químicas altamente tóxicas producidas por los mohos bajo condiciones ambientales adecuadas. Estas sustancias se conocen como micotoxinas y su biosíntesis puede estar influenciada por diversos factores como el clima, la localización geográfica y prácticas de cultivo, el almacenamiento y el tipo de sustrato (Brera y col., 2002). En general, el efecto tóxico de los mohos por ingestión de productos contaminados está bien descrito, sin embargo, el efecto tóxico por inhalación de partículas fúngicas no lo está, puesto que no hay casos documentados que establezcan una relación directa causa-efecto, para micotoxinas en el aire o volátiles fúngicos, como causantes de la enfermedad en humanos (Bondy y Pestka, 2000; Thiboldeaux, 2004). Sin embargo, podría esperarse que largos períodos de exposición a partículas vivas o muertas que contengan toxinas fúngicas, al final repriman o alteren la respuesta inmune en personas sanas (Bondy y Pestka, 2000).

La contaminación fúngica del aire tiene cada vez más importancia desde el punto de vista de los riesgos para la salud que se originan por las mismas esporas o por sus metabolitos microbianos (Fischer y Dott, 2003). Por una parte son un problema de especial relevancia por constituir una enfermedad ocupacional, en las industrias de elaboración de productos curados (jamón y salchichón) y de quesos (Palmas y Meloni, 1997; Boisnault y col., 2005), produciendo afecciones respiratorias e incluso alergias causadas por esporas de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Mucor* (Palmas y Meloni, 1997). Así mismo, representan un problema para la población por lo que se denomina, “síndrome del edificio enfermo”, que es un término

comúnmente usado para describir los síntomas que se presentan como consecuencia de los problemas en la calidad del aire de los espacios interiores (Cooley y col., 1998). Vivir o trabajar en edificios que presentan “humedades”, parece que aumenta el riesgo de sufrir afecciones en la salud, incluyendo principalmente síntomas respiratorios (tos, dificultades para respirar, asma) (Bornehag y col., 2001). Los hongos asociados a la construcción, comprenden un grupo reducido de especies que pueden crecer en los nutrientes presentes en los materiales de construcción, que se adaptan a cantidades particulares de agua disponible (Jarvis y Miller, 2005). Se han descrito cuatro fuentes principales que ocasionan las humedades en estos edificios (Bornehag y col., 2001):

1. Fuentes externas: Filtraciones de lluvia y nieve en la construcción del edificio, o humedades desde el suelo.
2. Fuentes internas: Humedad generada por personas o actividades de sala, como exhalación de aire, cocción, duchas, humidificadores, etc.
3. Fuentes de construcción: Humedad dentro de los materiales del edificio y la construcción debido a que los materiales no han sido protegidos contra lluvia y nieve, o porque el tiempo para el secado externo antes de la construcción fue insuficiente.
4. Accidentes: Filtraciones de agua por ejemplo desde tuberías o inundaciones.

La incidencia de mohos como *Penicillium* y *Aspergillus*, en los edificios que presentan estos problemas de humedad, es comúnmente mayor a la encontrada en los espacios abiertos (Cooley y col., 1998). No obstante, la exposición a mohos y a otras esporas fúngicas en los ambientes cerrados, es inevitable, excepto cuando se emplean rigurosos sistemas de filtración de aire u otras medidas de higienización (Singh, 2005).

Las características que permiten a los mohos comportarse como organismos contaminantes oportunistas, incluyen su capacidad para crecer a bajos niveles de actividad de agua ( $a_w$ ), dentro del intervalo de 0,65 a 0,90 y en algunos casos en niveles superiores; el crecimiento a bajos valores de pH (3,0 y en algunos casos inferiores); crecer sobre una amplio intervalo de temperaturas, por ejemplo desde valores inferiores a 0°C hasta los 40°C; utilizar muchos tipos de sustratos y esporular libremente en una variedad de condiciones extendiendo así su contaminación dentro de un hábitat particular (Jarvis y col., 1983).

Aunque muchos mohos están asociados con la contaminación de alimentos y la formación de micotoxinas, otras especies fúngicas son de gran utilidad en la industria de alimentos

(Samson y col., 2000). Se usan como microorganismos beneficiosos en la fermentación de quesos, alimentos orientales y carnes curadas; como modificadores o potenciadores del sabor; como productores de metabolitos aromáticos que posteriormente son usados como aditivos en zumos, vinos, licores, productos lácteos, caramelos, pan y galletas. Además, producen enzimas como lipasas, proteasas y carbohidrasas que son utilizadas para generar o extraer compuestos, que influyen en el flavor del alimento (Girardin, 1997). Diferentes especies de *Aspergillus* y *Penicillium* y algunas de *Rhizopus* y *Mucor*, han sido utilizadas en procesos beneficiosos para la obtención de alimentos (Ray, 2004). Las levaduras, son indudablemente el grupo de microorganismos más importante que se utiliza para propósitos comerciales. Han sido utilizadas durante siglos, en la elaboración de pan y en la producción de bebidas alcohólicas y tienen una gran importancia económica (Deak, 1995).

### 2. Origen de la contaminación fúngica en los alimentos

Puesto que los mohos se encuentran ampliamente distribuidos como habitantes naturales del suelo y como contaminantes del aire y el agua, es común encontrarlos también contaminando alimentos (De Ruyter y col., 1993). Especies de los mohos *Penicillium*, *Acremonium* y *Cladosporium*, tienen la capacidad de crecer en productos con muy baja concentración de materia orgánica, como en el caso del agua mineral estéril y las aguas domésticas, llegando a percibirse visualmente (Fujikawa y col., 1997).

Los mohos pueden crecer sobre todo tipo de productos alimenticios como cereales y productos derivados, carne, leche, frutas, vegetales, frutos secos, grasas y sus derivados (Müller, 1981; Frazier y Westhoff, 1985; Anónimo, 2000; Ray, 2004). Pueden comportarse como microorganismos oportunistas en la contaminación de alimentos con baja actividad de agua o bajos valores de pH, en un amplio intervalo de temperatura. Así mismo, se encuentran contaminando productos agrícolas que han sido secados de forma inadecuada y en productos alimenticios que tienen una larga vida de almacenamiento, en los cuales, la rápida contaminación bacteriana ya ha sido controlada (Jarvis y col., 1983; De Ruyter y col., 1993). De igual manera las levaduras causan contaminación en un gran número de alimentos, aunque su papel como agentes contaminantes es comúnmente descuidado y subestimado (Deak, 1995).

Los procesos industriales en los que se utiliza material biológico, proporcionan nutrientes y

las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos (Maukonen y col., 2003). La contaminación de los productos alimenticios puede provenir de cuatro fuentes principales: los componentes de la materia prima, las superficies, las personas (y animales) y el ambiente (aire y suelos) (Holah, 1995b; Duran y Marshall, 2002; Reij y Den Aantrekker, 2004).

Los mohos están presentes en productos sin procesar de origen vegetal o animal y según el tipo de procesamiento, se puede generar un producto final libre de hongos o simplemente conseguir una reducción de poblaciones; lo que hace posible que después de un tiempo se presente una eventual contaminación del producto debido al crecimiento de los mohos y levaduras (Beuchat, 1992). La microbiota del producto, es en parte un reflejo de la materia prima y en parte un reflejo de los parámetros de preservación utilizados (Bagge-Ravn y col., 2003). En general, los alimentos procesados pueden ser considerados como un medio complejo que los hongos pueden colonizar y contaminar (Silva-Chitarra, 2003). De acuerdo al tipo de microorganismo asociado con la materia prima sea de origen animal o vegetal, es posible predecir de forma general, el tipo de microorganismo esperado en el alimento procesado (Jay, 2002). Existe una relación particular moho-alimento, es decir, un número limitado de especies fúngicas asociadas a la contaminación de cada producto lo que a su vez, corresponde con un número limitado de micotoxinas (Filtenborg y col., 1996). Esta relación se ha descrito como microbiota fúngica asociada o crítica y, generalmente está conformada por menos de diez especies, e incluso en la mayoría de los casos sólo existen entre una y tres especies responsables de la contaminación (Frisvad y Filtenborg, 1988; 1993).

El crecimiento fúngico puede ocasionar diferentes tipos de alteración en los alimentos, entre ellos cabe destacar la pérdida de las características organolépticas, la reducción del valor nutritivo, la putrefacción e incluso pueden representar un riesgo potencial o real para la salud del consumidor, como consecuencia de la producción de micotoxinas (Jarvis y col., 1983). De hecho, hasta el descubrimiento de las micotoxinas, la alteración por mohos era considerada como un fenómeno relativamente benigno y los alimentos sólo se rechazaban por razones estéticas y por olor característico a enmohecido de los alimentos. Muchos mohos tienen actividad proteolítica pero raramente producen olores pútridos, más asociados a la alteración bacteriana. Frecuentemente producen rancidez de los alimentos debido a la hidrólisis de los ácidos grasos, que se produce de forma característica por algunos mohos como *Penicillium roqueforti* (Moss, 1999).

A partir de los cereales, granos de trigo, avena, maíz, centeno, cebada, mijo, sorgo y arroz, se obtienen productos como harinas, cereales de desayuno, snacks, harina de maíz, masas, pastas y mezclas secas para galletas, pasteles y panes. Muchos de éstos, son utilizados en la formulación y elaboración de otros productos como por ejemplo, salchichas, dulces y alimentos infantiles (Deibel y Swanson, 2002; McKeivith, 2004). La presencia de microorganismos en el interior de los granos de cereales es muy limitada o reducida, por el contrario en la superficie hay una relativa abundancia de gérmenes que proceden del suelo, aire, animales, plantas, entre otros (Larrañaga y col., 1999). El contenido de microorganismos totales presente en estos productos depende de su riqueza en nutrientes y del contenido en agua. A mayor humedad, más elevada será la contaminación bacteriana, mientras que reducidos contenidos acuosos impiden el crecimiento bacteriano de forma significativa. Sin embargo, no ocurre lo mismo con los mohos y las levaduras quienes son los principales responsables de la alteración de dichos productos (Müller, 1981; Larrañaga y col., 1999; Pascual-Anderson y Calderón y Pascual, 2000). El deterioro de los granos de cereales se observa incluso, en países que poseen avanzadas tecnologías (Chetkowski, 1991).

Los hongos en general, pueden contaminar los cereales y sus productos en las diferentes etapas de crecimiento, cosecha y almacenamiento (McKeivith, 2004). Durante la molienda, la microbiota procedente de los cereales, las semillas, los frutos y el ambiente, se diseminan por todo el producto. Así mismo, las manipulaciones para su obtención producen recontaminaciones, principalmente por el aire y la maquinaria utilizada. Un ligero aumento del contenido límite de humedad, por encima de 0,70, es suficiente para permitir el desarrollo de hongos con el riesgo de producción de micotoxinas. Se debe tener en cuenta, que si bien es posible destruir los mohos del grano, el ambiente, la maquinaria, etc., por diversos mecanismos, sus toxinas pueden permanecer en el producto (Larrañaga y col., 1999; McKeivith, 2004). Realmente, casi la totalidad de las alteraciones que sufre la harina se producen durante su almacenamiento, si éste no se ha realizado en buenas condiciones. Las especies microbianas más frecuentemente encontradas en las harinas son bacterias de los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, coliformes, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Achromobacter* y, mohos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor* y *Rhizopus* (Müller, 1981; Larrañaga y col., 1999; Pascual-Anderson y Calderón y Pascual, 2000). El almacenamiento de los granos y las harinas está asociado con una gama de peligros. Productos de panadería y pastelería, jamón o pescado en salazón, de reducida actividad de agua, se alteran frecuentemente por mohos xerofílicos de origen

ambiental como *Wallemia*. En el pan adicionalmente se desarrollan otras especies fúngicas como *Rhizopus* e incluso levaduras (Moss, 1999).

En general, los productos utilizados en la alimentación infantil están elaborados a partir de materias primas como leche, cereales y en algunos casos chocolate. En la leche en polvo, la microbiota está influenciada por la combinación del tiempo y la temperatura usados durante el precalentamiento, la concentración y el secado. El número y el tipo de microbiota, puede reflejar la calidad de la leche utilizada o indicar contaminación cruzada desde los equipos o del medio ambiente durante, o después de su elaboración (Richter y Vedamuthu, 2002). En el cacao, la enfermedad fúngica representa la principal limitación en la producción a nivel mundial (Gotsch, 1997). En estos productos, las levaduras constituyen el 40% de la población microbiana total, el resto son bacterias de los géneros *Flavobacterium*, *Achromobacter* y *Proteus* y especies de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Müller, 1981).

Las frutas y vegetales tienen una elevada actividad de agua y gran cantidad de nutrientes, pero a menudo tienen un reducido pH que favorece el crecimiento de los hongos en relación a la mayoría de bacterias, produciendo la degradación de las pectinas, especialmente en frutas (Moss, 1999). En el caso de las frutas y hortalizas, las prácticas inadecuadas en la cosecha, el almacenamiento post-cosecha y las condiciones durante el transporte y la comercialización, pueden también contribuir al crecimiento fúngico y a la proliferación de micotoxinas (Logrieco y col., 2003; Tournas, 2004; Tournas y Katsoudas, 2005). Algunos hongos son patógenos para las plantas, comenzando su contaminación desde el campo. Otros aunque pueden contaminar las frutas desde el cultivo, sólo proliferan y causan contaminaciones considerables después de la cosecha cuando las defensas de la planta principal son reducidas o eliminadas (Tournas y Katsoudas, 2005). La podredumbre de frutas y verduras es una enfermedad muy común en la post-cosecha que causa grandes pérdidas durante la comercialización. Además de estas pérdidas, el desarrollo de los hongos origina cambios en la calidad de las frutas, deterioro de semillas, granos y alimentos procesados (Logrieco y col., 2003). Así, diferentes mohos incluyendo algunos de los productores de micotoxinas como *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Aspergillus*, están presentes y son capaces de crecer en frutas frescas a temperatura ambiente (Tournas y Katsoudas, 2005). En general los mohos y levaduras son muy susceptibles a los tratamientos térmicos y son destruidos por dicho tratamiento en la mayoría de productos. En el caso de las frutas y debido a su reducido pH, se

deben aplicar tratamientos más suaves que permiten la permanencia de esporas de ciertos géneros como *Bysochlamys* o *Talaromyces* (Moss, 1999).

En vegetales frescos se ha encontrado una elevada presencia de *Alternaria* y *Cladosporium*, debido posiblemente a su capacidad de crecer a las bajas temperaturas usadas durante el transporte y la comercialización (Tournas, 2004). De igual manera, también se ha determinado una elevada incidencia de *Penicillium spp.* en brotes de leguminosas germinadas (alubias, judías, frijoles), lo que sumado a su capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración indica su potencial para la producción de micotoxinas en este tipo de productos, durante la comercialización (Tournas, 2004). La vida de anaquel de los vegetales procesados y la calidad del producto terminado, especialmente aquellos usados como ingredientes en productos “listos para comer”, se disminuye notablemente por la presencia de mohos y levaduras (Girardin, 1997; Hilgren y Salverda, 2000). Los vegetales crudos, las ensaladas “listas para comer” y diversos tipos de leguminosas, pueden ser fácilmente contaminados con levaduras y mohos de géneros toxigénicos como *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Phoma*, durante su cultivo, cosecha, transporte y comercialización (Tournas, 2004).

La aplicación de temperaturas de refrigeración es un factor limitante del desarrollo de la alteración bacteriana de los alimentos, especialmente durante su distribución. Sin embargo, numerosos géneros fúngicos pueden crecer a temperaturas de refrigeración. Así *Cladosporium herbarum* puede causar manchas negras en las canales de carne, y es la especie que generalmente se observa en las paredes de las cámaras de refrigeración cuando éstas no son limpiadas y desinfectadas de forma regular. Igualmente, un número elevado de especies del género *Penicillium* pueden crecer a 4-5°C, siendo *P. commune* uno de los organismos más habituales que producen la alteración del queso mantenido en cámaras frigoríficas (Moss, 1999).

Los microorganismos presentes en las superficies de trabajo, los equipos, el ambiente de las zonas de producción y las manos de los operarios, contaminan también los productos alimenticios (Geornaras y col., 1996; Ellerbroek, 1997; Jones, 1998; Whyte y col., 2001). El aire puede actuar como fuente de contaminación (desde zonas externas al área de procesamiento) y/o como medio de transporte, llevando la contaminación desde las personas o superficies que no están en contacto directo con el alimento (Holah, 1995b). Las esporas de los mohos presentes en el aire y en el suelo, pueden pasar al agua y a los alimentos y en algunos casos, pueden incluso determinar el tipo de micobiota presente en ellos (Legan,

1993; Palmas y Meloni, 1997; Comi y col., 2004; Paterson y col., 2004; Gonçalves y col., 2006).

Algunos microorganismos patógenos pueden establecerse en el ambiente de elaboración del alimento y encontrar nichos para sobrevivir por largos períodos de tiempo. Grietas en suelos y paredes, puntos de contacto entre suelo y equipos, espacios en la estructura del edificio o en los equipos, pueden formar tales nichos. En los ambientes secos de las plantas de elaboración de productos como leche en polvo, chocolate o sopas deshidratadas, los niveles de microorganismos en estos nichos pueden permanecer bajos. Sin embargo, en los ambientes húmedos o después de un procedimiento de limpieza húmeda los patógenos pueden incluso multiplicarse hasta altos niveles (Reij y Den Aantrekker, 2004). Los mohos también pueden utilizar como microclimas las humedades y condensaciones que por lo general existen en ambientes cerrados, para desarrollar sus nichos ecológicos y producir un gran número de esporas (Singh, 2005). Estas humedades pueden presentarse en forma de vapor de agua o como agua libre y su presencia en la estructura del edificio puede afectar los materiales de la construcción llevando a procesos químicos y microbiológicos, por ejemplo emisión de olores y sustancias irritantes y/o alérgenos. De igual forma, la humedad relativa del aire puede causar condensación en superficies frías o condensación en la construcción, originando también crecimiento microbiano y procesos químicos (Bornehag y col., 2001).

### **3. Micotoxinas**

Las micotoxinas fueron reconocidas como sustancias potencialmente peligrosas para el hombre y los animales en 1960 (Bullerman, 1999). Son sustancias químicas tóxicas (metabolitos secundarios) producidas principalmente por la estructura micelial de los mohos bajo condiciones específicas; sin embargo, se encuentran también presentes en las esporas (Moss, 1992; Macrae y col., 1993; D'mello y Macdonald, 1997). Algunas de ellas sólo se presentan en el moho mientras que muchas otras, son excretadas al alimento. Estos metabolitos secundarios son sintetizados al final de la fase exponencial del crecimiento fúngico y parece ser que no tienen repercusión en el desarrollo/crecimiento o competitividad de los mohos (D'mello y Macdonald, 1997; Jay, 2002).

En alimentos líquidos y en frutas como melocotones, peras y tomates, la difusión de micotoxinas puede darse muy rápidamente y contaminar todo el producto. En alimentos



sólidos como queso, pan, manzanas y naranjas, la difusión es lenta y la mayor parte del producto queda sin contaminar (Filtenborg y col., 1996). Cuando las micotoxinas son ingeridas, causan una respuesta tóxica que se conoce como micotoxicosis. Hasta la actualidad se conocen aproximadamente 400 metabolitos potencialmente toxigénicos producidos por más de 100 mohos, estimándose por parte de la FAO (Food Agriculture Organization) que más de un 25% de los productos agrícolas están contaminados con micotoxinas produciendo importantes pérdidas económicas (Kabak y col., 2006). No todos los mohos son toxigénicos, y mientras que algunas micotoxinas son producidas por un número limitado de especies, otras pueden ser producidas por una amplia gama de géneros (Deacon, 1997; Jarvis y Miller, 2005). Las especies fúngicas micotoxigénicas encontradas comúnmente en productos alimenticios, corresponden a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Alternaria* (D'mello y Macdonald, 1997; Sweeney y Dobson, 1998; Overly y col., 2003). Las especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, se encuentran generalmente como contaminantes en los alimentos durante el secado y el almacenamiento; las de *Fusarium* y *Alternaria*, pueden producir micotoxinas antes o inmediatamente después de ser cosechados (Sweeney y Dobson, 1999; Logrieco y col., 2003).

El crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas en un determinado sustrato, están influenciados por factores intrínsecos como actividad del agua, pH y potencial de oxidoreducción y por factores extrínsecos, como humedad relativa, temperatura y disponibilidad de oxígeno (FAO, 1998). El efecto tóxico de la ingestión de micotoxinas en humanos y animales depende, entre otros, de la cantidad ingerida, el tiempo de exposición, el tipo de toxina, la edad, el estado fisiológico y de un posible sinergismo entre micotoxinas presentes simultáneamente en el alimento (Galvano y col., 2001). Puesto que las micotoxinas son muy resistentes a los tratamientos físicos y químicos, puede decirse que una vez se forman, durante el crecimiento de los mohos en el alimento, ellas permanecen estables en el producto, durante el procesado y el almacenamiento (Scott, 1991; Jarvis y Miller, 2005). Esto puede significar, que el uso de algún material enmohecido en el procesamiento del alimento puede aportar micotoxinas al producto final (Filtenborg y col., 1996).

Las micotoxinas habitualmente consideradas como más significativas en alimentos son las aflatoxinas, la ocratoxina A, la patulina, las fumonisinas, la zearalenona y algunos tricotecenos particularmente el deoxinivalenol (Bullerman, 2002; FAO, 2004). Los efectos descritos se relacionan con su actividad carcinogénica, estrogénica, lesiones renales,

inmunosupresión, anorexia, entre otros (Bullerman, 1999). Los productos alimenticios más comúnmente contaminados son: cacahuets y granos de cereales (Bullerman, 2002); sin embargo, el perfil y la cantidad de micotoxinas que un moho puede producir en el alimento, depende completamente de la ecología y los parámetros del procesamiento del producto particular (Filtenborg y col., 1996). Diferentes especies toxigénicas y sus micotoxinas se presentan en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Principales micotoxinas y algunas especies fúngicas que las producen (Silva-Chitarra, 2003; Magan y col., 2003; Logrieco y col., 2003)

ESPECIE FÚNGICA	MICOTOXINAS
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas
<i>A. flavus</i>	Ácido ciclopiazónico
<i>A. ochraceus</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>A. carbonarius</i>	Ocratoxina A
<i>P. expansum</i> , <i>P. carneum</i> , <i>P. paneum</i> , <i>P. griseofulvum</i>	Patulina
<i>P. roqueforti</i> , <i>P. carneum</i> , <i>P. paneum</i>	Roquefortina C
<i>P. roqueforti</i>	Toxina PR
<i>Fusarium culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Deoxinivalenol
<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. acuminatum</i>	Toxina T-2
<i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. poae</i>	Diacetoxiscirpenol
<i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. cerealis</i>	Zearalenona
<i>F. moniliforme</i> , <i>F. nygamai</i>	Fumonisinias
<i>F. poae</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. cerealis</i>	Nivalenol
<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. citri</i> , <i>A. japonica</i>	Ácido tenuazónico
<i>P. citrinum</i> , <i>P. verrucosum</i>	Citrina

El número de diferentes micotoxinas que pueden estar presentes en los alimentos es mucho mayor que 100 y la detección exacta de cada una de ellas por separado no es posible, debido a que cuando se estudian cepas fúngicas obtenidas de sustratos, utilizados para consumo humano o animal, el perfil de micotoxinas de estos mohos está muy relacionado (De Ruiter y col., 1993; Overy y col., 2003). Fijar reglamentos para las micotoxinas es una actividad compleja. Las micotoxinas, y en particular aquellas carcinogénicas deben eliminarse de los alimentos tanto como resulte posible. Sin embargo, como estas sustancias se encuentran

presentes en los alimentos como contaminantes naturales, la exposición humana no puede evitarse completamente y debe tolerarse la exposición de la población a algún nivel de micotoxinas. Los primeros límites para las micotoxinas son de fines de la década de 1960, para las aflatoxinas. A fines del año 2003, aproximadamente 100 países contaban con límites específicos para las micotoxinas en los alimentos y las proporciones así como el número, continúa incrementándose (FAO, 2004).

Debido a que los lactantes y los niños de corta edad representan un grupo de la población, muy vulnerable al efecto de las micotoxinas y teniendo en cuenta además, que éstas pueden encontrarse comúnmente en la leche y en productos a base de cereales, la normativa europea decidió establecer el contenido máximo más bajo que se pueda conseguir, mediante una selección rigurosa de las materias primas utilizadas en la elaboración de los preparados para lactantes, los preparados de continuación, los alimentos a base de cereales y los alimentos infantiles. De igual forma establece límites máximos para algunas toxinas como el caso de aflatoxinas (producidas por varias especies de *Aspergillus*), ocratoxinas (producida por diferentes especies de *Penicillium* y *Aspergillus*) y patulinas (producidas por diversos género de mohos, entre ellos *Aspergillus* y *Penicillium*) (Anónimo, 2006).

#### 4. Estrategias para prevenir la contaminación fúngica

Para la prevención de la contaminación fúngica así como la formación de toxinas, se pueden adoptar diferentes estrategias dentro del concepto del campo a la mesa. Éstas pueden dividirse en prácticas de control de la materia prima (pre-cosecha y cosecha), de procesamiento y de comercialización (Kabak y col., 2006).

Son diferentes las actividades que se pueden realizar en la fase pre-cosecha, basadas en estrategias que incluyen prácticas de control biológico y en el cultivo. Las estrategias de control están basadas en la selección de variedades resistentes, las prácticas realizadas en el campo, las condiciones ambientales y el uso de agentes químicos o biológicos.

**Selección de variedades resistentes:** en este aspecto se debe destacar que existen diferencias inherentes en la susceptibilidad de varias especies de semillas o frutos, hacia plagas, hongos y otras enfermedades. Estas variaciones, pueden reflejarse también en el grado de susceptibilidad a la contaminación con micotoxinas. La elección de una variedad de semilla a plantar es importante, por lo que el agricultor debe informarse previamente para escoger el

tipo de semilla que mejor se adapte a su región, así como de la disponibilidad de variedades resistentes a estos factores (ataque de insectos, hongos y otros microorganismos). Obtener altos niveles de resistencia genética natural para hongos toxigénicos en varios tipos de cultivo, no es tarea fácil. A este respecto, se han realizado numerosos trabajos de laboratorio y de campo con el fin de identificar los genes responsables de la resistencia a diferentes hongos, para producir híbridos que muestren una mayor resistencia tanto al desarrollo del moho como a la biosíntesis de las micotoxinas (Edwards, 2004).

**Prácticas de campo:** Entre las prácticas que permiten reducir la contaminación fúngica son eficaces la rotación de cultivos, talar y quitar árboles enfermos, el arado de la tierra, el riego y la fertilización. Utilizar fertilizantes que permitan mantener un nivel óptimo de minerales, puede mejorar la estructura celular y reducir la susceptibilidad a la podredumbre, que se presenta en la comercialización de frutas frescas (Kabak y col., 2006).

**Condiciones ambientales:** Algunos ambientes pueden particularmente ser favorables para el desarrollo fúngico y por lo tanto, para la formación de micotoxinas, por lo que debe considerarse la conveniencia de cultivar o no, en dichas áreas. La humedad relativa y la temperatura tienen un amplio efecto en la aparición de hongos. Planificar la cosecha de los granos a baja humedad y en completa madurez, puede ser un punto importante de control en la prevención de la contaminación con micotoxinas (Anónimo, 2003a).

**Uso de agentes químicos y biológicos:** Otro factor que favorece el desarrollo de los mohos son las lesiones causadas por insectos, pájaros y roedores, para lo cual se utilizan insecticidas y fungicidas que se encuentran registrados, así como otras prácticas que hacen parte de un control integrado de plagas (Delage y col., 2003). Además, el uso de microorganismos bio-competitivos, como bacterias y levaduras antagonicas, ocasionan una reducción de la contaminación con micotoxinas.

Las actividades durante la cosecha dependen de la materia prima que se cultiva. Para el caso de los cereales, la cosecha es el primer paso en la cadena de producción en el que la humedad comienza a ser la medida de control predominante para la prevención del desarrollo de micotoxinas. Puesto que su contenido puede variar ampliamente dentro del mismo campo, es muy importante su control durante las diferentes cargas del grano en el cosechado. Otra medida muy importante es la detección de la presencia de enfermedades en el grano, acompañada de una estrategia eficiente para la separación de estos granos enfermos del resto de producto sano (Anónimo, 2003a). En el caso de frutas y frutos secos se debe evitar el daño

mecánico de los productos y su contacto con el suelo, así como cosechar los productos en un grado de madurez óptimo. Adicionalmente en las frutas, se ha mostrado como una estrategia eficaz la recolección en condiciones secas, su colocación en contenedores limpios, su transporte directo al lugar de venta, y su conservación en ambientes fríos (1,5 a 4°C) dentro de las primeras 18 horas tras la cosecha (Anónimo, 2003b). En el caso de los frutos secos, es importante tener en cuenta la humedad ambiental al momento de la cosecha. Se recomienda en el caso de condiciones atmosféricas húmedas, utilizar suficientes equipos de secado, para evitar la formación de micotoxinas.

Tras la cosecha son diversas las estrategias que se pueden aplicar durante el almacenamiento, procesado y distribución de los alimentos. Durante el almacenamiento y el secado (cereales, café, cacao) es fundamental realizar un control de la humedad, de la temperatura y de la ventilación. En algunas ocasiones se recomienda la aplicación de atmósferas modificadas, especialmente en frutas (Kabak y col., 2006). Se pueden también aplicar diferentes estrategias tecnológicas para disminuir la contaminación como la irradiación, la aplicación de sustancias tensoactivas en frutas como barrera de protección, y/o el uso de agentes naturales, químicos y biológicos con actividad fungicida como ácidos orgánicos, microorganismos antagónicos (bacterias lácticas), extractos naturales de plantas y especias (limón, mandarina, cúrcuma) (Mishra y Dubey, 1994; Tripathi y Dubey, 2004; Schnurer y Magnusson, 2005).

En las industrias de transformación y en la comercialización de alimentos, para prevenir la contaminación cruzada desde superficies de trabajo o del ambiente es fundamental como estrategia principal el aplicar un adecuado programa de limpieza y desinfección.

### **4.1. Control en las industrias alimentarias: limpieza y desinfección**

En la industria de alimentos la calidad es un requisito para la aceptación del consumidor y, hablar de calidad total o calidad integral, significa que todas las operaciones industriales, la fabricación y el producto final, están sujetos a procesamientos aceptables y de acuerdo con los requerimientos (Vasconcellos, 2004). La clave para una limpieza efectiva de una planta de alimentos es el conocimiento del tipo y naturaleza de las sustancias a limpiar, incluyendo los microorganismos a ser eliminados desde las superficies (Wirtanen y col., 2001). Sin embargo, se debe tener en cuenta que un peligro puede ser la misma contaminación de las

superficies con los agentes de limpieza que se están usando como medida de control (Davidson y col., 1999). Las industrias que elaboran alimentos y bebidas comúnmente favorecen el crecimiento de mohos extensivos en las superficies de paredes, techos y en la planta de procesamiento, debido a la condensación de vapor generado por una combinación de factores como escaso aislamiento de las paredes, reducida ventilación y la presencia de una atmósfera rica en nutrientes (Heaton y col., 1990), por lo que es necesario aplicar las medidas apropiadas para minimizar su presencia, entre las que se incluyen rigurosos sistemas de filtración de aire, así como la aplicación de un programa adecuado de limpieza y desinfección (Singh, 2005). Las industrias de alimentos deben elaborar productos de alta calidad, libres de microorganismos patógenos y sus toxinas y, que respondan en su composición a los principios exigibles. Para ello requieren una serie de medidas como (Kiermeier y Mrozek, 2000; Vincent, 2002): partir de una materia prima de buena calidad, limpiar y desinfectar el equipamiento que entrará en contacto con el alimento y asegurar una buena higiene del ambiente y del personal.

La combinación de los procesos de limpieza y desinfección se conoce con el término higienización. Su objetivo es eliminar de las superficies en una forma económica, todas las sustancias o componentes no deseables como restos alimenticios, microorganismos, cuerpos extraños y sustancias químicas, hasta conseguir un nivel en el que no existan residuos que representen riesgo para la calidad o la seguridad del producto (Holah, 1995a), siendo por lo tanto un proceso tan importante como la producción misma (Vincent, 2002). La higienización es considerada la mejor forma de controlar las rutas de contaminación ambiental de los productos alimenticios (Holah, 1995b). La preparación de un protocolo para asegurar que un procedimiento de limpieza y desinfección es de buena calidad, debe basarse en un plan de acción de múltiples pasos incorporando un producto de limpieza y un agente desinfectante (Maris, 1998; Anónimo, 2001). Las etapas de este plan son (Anónimo, 2001):

- **Preparación:** Corresponde a las etapas preliminares que coinciden generalmente con las últimas operaciones de la fase de producción. Su objetivo es retirar todo aquello que pueda disminuir la accesibilidad o la eficacia de las etapas posteriores.
- **Prelavado:** Es una etapa de limpieza previa que se realiza con agua fría o caliente, según el tipo de suciedad. Tiene como objetivo eliminar la suciedad visible poco adherida.
- **Limpieza:** Es la etapa del lavado y su finalidad consiste en desprender y llevar en suspensión la suciedad adherida, visible o no, mediante la aplicación mecánica de un

detergente.

- **Aclarado:** Emplea agua limpia para la eliminación de la suciedad y el producto de limpieza.
- **Desinfección:** Mediante la aplicación de un desinfectante se reduce la microbiota remanente en las superficies y se eliminan los microorganismos patógenos.
- **Aclarado final:** En esta etapa se utiliza agua potable para arrastrar los residuos de desinfectante evitando que contaminen los alimentos.

Etapas finales: Con el objetivo de limitar la recontaminación y la multiplicación de microorganismos se dejan escurrir las superficies. Es aconsejable además, realizar un proceso de secado. Varios estudios, han demostrado que el secado de superficies tiene un importante efecto bactericida, aunque la efectividad del proceso depende de la naturaleza del organismo y estado que se encuentra, el tiempo de secado, así como de las condiciones de temperatura, suciedad y humedad (Mceldowney y Fletcher, 1988; Hirai, 1991; Fuster-Valls y col., 2007). En el caso de los mohos la etapa de secado no tendría este efecto fungicida dada su elevada persistencia en forma de spora en ambientes secos (Hocking y Pitt, 1980), aunque los ambientes húmedos o después de un procedimiento de limpieza húmeda se puede favorecer el desarrollo de las esporas persistentes (Bornehag y col., 2001). La limpieza consiste en eliminar de una superficie dada, toda suciedad visible o invisible que pueda encontrarse sobre la misma, utilizando como agente básico los detergentes. Los detergentes son combinaciones de compuestos químicos que asociados a los factores: tiempo, temperatura, y acción mecánica, permiten liberar la superficie de su suciedad (Vincent, 2002). Factores como la naturaleza de la suciedad a eliminar, el material a limpiar, la calidad del agua utilizada, la temperatura de limpieza y el modo de aplicación de los detergentes, son fundamentales durante el proceso de limpieza (Vincent, 2002). Cuando se habla de suciedad se consideran tres estados: suciedad libre en referencia a las impurezas no fijadas en una superficie y que son fácilmente eliminables; suciedad adherente que son las impurezas fijadas y que requieren de una acción mecánica o química para su desprendimiento del soporte y, suciedad incrustada en relación a las impurezas introducidas en los relieves o recovecos del soporte (Anónimo, 2001). Los compuestos químicos básicos utilizados como detergentes, pueden ser clasificados en dos grupos (Vincent, 2002):

- Los agentes cuya acción es química, como las bases (saponificación de las grasas), los ácidos (disolución de las sales y tartratos), los secuestrantes (acomplejan los iones alcalino-térreos y metálicos) y los oxidantes (oxidación de la suciedad).
- Los agentes cuya acción es fisicoquímica, esencialmente los agentes de superficie que tienen propiedades humectantes, emulsionantes, espumantes, dispersantes y antiespumantes.

Por desinfección se entiende la reducción total de los microorganismos patógenos o parcial de los microorganismos de alteración, que puedan estar presentes en los equipos o utensilios después de la limpieza, hasta alcanzar un nivel seguro, previniendo el crecimiento microbiano entre los periodos de producción y evitando así, su transferencia al consumidor (Holah, 1995a; Bousser, 2002). Es un proceso fundamental que condiciona directamente la calidad de los productos, pero los procedimientos que la preceden (prelavado y lavado), son igualmente esenciales puesto que desinfectar una superficie cuya limpieza no ha sido la adecuada carece de sentido (Vincent, 2002). Por lo tanto, la limpieza para la obtención de superficies física y químicamente limpias y, la desinfección para la obtención de una superficie biológicamente limpia, forman parte de todo proceso de producción (Bousser, 2002). El éxito de un programa de higienización en los que se aplican desinfectantes químicos depende de si éstos contactan con todas las superficies del equipo, no obstante, pueden existir algunas zonas críticas, por lo que es fundamental el control de los espacios muertos y el desmontado de partes del sistema de tuberías. El uso de desinfectantes debe estar seguido por un riguroso aclarado de los equipos de trabajo y la calidad bacteriológica del agua de lavado debe también ser controlada para minimizar el riesgo de recontaminación. Los riesgos asociados deben reducirse mediante el aseguramiento de que la maquinaria es diseñada adecuadamente, construida con superficies lisas, continuas o selladas y que permita estar óptimamente instalada, manipulada, limpiada y mantenida (Orth, 1998).

El mayor limitante para utilizar desinfectantes en la industria de alimentos se debe a que estos últimos, son destinados para consumo humano y/o animal; por esta razón los desinfectantes a utilizar deben cumplir dos principios básicos: no ser tóxicos ni producir pigmentaciones. Estas limitaciones reducen la selección de biocidas a sólo unos pocos productos importantes, que además, son menos efectivos en presencia de materia orgánica (Holah, 1995b). No obstante, deben cumplir siempre los requerimientos generales con respecto a su eficacia para matar o reducir la microbiota contaminante y perjudicial (Orth,



1998). En general, un buen desinfectante debe cumplir las siguientes normas (Holah, 1995b; Orth, 1998): no ser tóxico, no producir pigmentos, olores o sabores extraños, tener un amplio espectro de actividad, ser adecuado para las aplicaciones propias de la industria de alimentos, ser fácil de enjuagar, no tener problemas de residualidad, ser efectivo en las condiciones de empleo recomendadas, ser seguro para los operarios de limpieza, presentar un bajo riesgo ecológico, clasificado como fácilmente biodegradable, ser compatible con diferentes superficies tecnológicas y con una reducida actividad corrosiva del material, ser eficaz sin distinción de la calidad del agua empleada y que su aplicación sea económica, es decir, con una buena relación costo-eficacia

### **4.1.1. Factores que afectan a la eficacia de los desinfectantes**

Son numerosos los factores que afectan a la efectividad de los productos biocidas entre los que se deben mencionar:

- **Sustancias interferentes:** La presencia de materia orgánica reduce el efecto de los desinfectantes por dos razones principales: reacciones químicas y estructurales. La materia orgánica puede reaccionar de forma inespecífica con los desinfectantes ocasionando pérdidas de su potencial biocida o, reaccionar químicamente con el desinfectante y disminuir sus propiedades antimicrobianas. En una forma no reactiva, la materia orgánica puede formar barreras especiales protegiendo los microorganismos del efecto del desinfectante. Es por lo tanto esencial, eliminar toda la suciedad durante la fase de limpieza y luego eliminar todos los residuos químicos a través del enjuague, previo a la desinfección (Holah, 1995a). De igual manera, los desinfectantes deben ser compatibles con diversos residuos de los agentes de limpieza y con trazas de los biocidas que se encuentran de forma residual en el agua potable (Holah, 1995b).
- **Concentración:** La relación entre muerte microbiana y concentración de desinfectante no es lineal, pero sigue una curva típica sigmoidea, es decir, a mayor concentración de desinfectante mayor muerte. No obstante, existe un punto límite a partir del cual los microorganismos son más difíciles de eliminar debido a la resistencia o la protección física, por lo que, un número de ellos puede sobrevivir a pesar del aumento de la concentración. Esto indica que cambios en las concentraciones pueden no significar un aumento en el efecto del desinfectante (Holah, 1995a).

- pH: Las propiedades químicas de los desinfectantes pueden afectarse por el pH del agua utilizada para la dilución, por lo que se hace necesario respetar el intervalo especificado por el productor (Holah, 1995b).
- Tiempo de contacto: Es un factor fundamental para asegurar la desinfección. Usualmente el tiempo elegido son cinco minutos, ya que representa el tiempo en el que muchos desinfectantes permanecen en las superficies que no están en posición horizontal (Holah, 1995a). Esto significa que los desinfectantes deben ser capaces de asegurar un efecto biocida en 5 minutos o menos, de acuerdo al tipo de aplicación. Sin embargo, algunos biocidas pueden adherirse a la superficie aumentando el tiempo de contacto. Cuando el desinfectante se encuentra en forma de espuma el tiempo puede incrementarse hasta 10 ó 15 minutos y cuando está en forma de gel, el tiempo puede ser superior a 15 minutos (Holah, 1995b).
- Temperatura: Los desinfectantes deben ser activos a las diferentes temperaturas que se emplean en la industria. El valor mínimo se encuentra generalmente alrededor de los 5°C y el límite superior está determinado por la seguridad de los operarios, normalmente entorno a los 55°C. Para la mayoría de operaciones, los desinfectantes deben ofrecer un nivel adecuado de actuación a temperatura ambiente, dentro de un tiempo de contacto de 5 minutos o menos. Temperaturas más elevadas pueden emplearse dentro de los tanques de remojo y en las superficies cerradas (Holah, 1995b).
- Tipo de superficies: El diseño de los equipos, la selección de los materiales y el tratamiento que se realice sobre ellos para limitar la adherencia de los microorganismos después de la limpieza y desinfección, son factores determinantes en la higiene de las superficies (Frank y Chmielewski, 2001; Maukonen y col., 2003). Materiales extremadamente porosos o rugosos ofrecen una superficie más apropiada para la adherencia; la presencia de estas irregularidades favorece el refugio de residuos orgánicos y microorganismos. De igual manera, las grietas, ranuras y manchas de corrosión dificultan los procesos de limpieza y desinfección (Troller, 1992). La naturaleza y la calidad de las superficies alimentarias, así como la accesibilidad de los materiales determinan la aptitud para la limpieza y desinfección de los mismos (Anónimo, 2001). El material más práctico y por consiguiente el más utilizado en los equipos es el acero inoxidable, ya que puede tratarse previamente de diversas maneras con el fin de obtener superficies fáciles de limpiar; además de ser un material estable e inerte frente a los alimentos (Boulangue-Petermann, 1996; Maukonen y

col., 2003).

- Número de microorganismos: El número de microorganismos afecta la acción del desinfectante, debido a que una mayor carga fúngica requiere mayores concentraciones de desinfectante o tiempos de contacto más prolongados y puesto que, no siempre se consigue una adecuada desinfección de la superficie con estos incrementos, se hace necesario una combinación de factores (Andrews, 1996).
- Tipo de microorganismos: los microorganismos en función de su estructura celular, composición y fisiología, varían en su respuesta a los antisépticos y desinfectantes. La mayor resistencia la presentan las esporas bacterianas, seguidas de micobacterias, quistes de parásitos, pequeños virus no encapsulados, bacterias Gram negativas, bacterias Gram positivas y por último, los virus con capsula lipídica. Los mohos generalmente son más resistentes que las levaduras y mucho más resistentes que las bacterias no esporuladas, pero más sensibles que las bacterias esporuladas (McDonnell y Russell, 1999). También es importante en el efecto de los biocidas el grado de organización de los microorganismos en las superficies. Las partículas que flotan libremente en cualquier medio líquido (ya sean compuestos químicos, biológicos, orgánicos o inorgánicos), biológicamente activos o no, e incluso procedentes del ambiente pueden sedimentar y entrar en contacto con un sustrato sólido. Las partículas biológicamente activas pueden ser virus, bacterias, levaduras, mohos o esporas que interactúan con el ambiente circundante para propósitos específicos. Tales “partículas” biológicas sedimentan, crecen y ocasionalmente forman una masa de células llamada biofilm (Zottola y Sasahara, 1994). El término biofilm define toda la microbiota contaminante y patógena que se forma en grupos celulares, especialmente organizados y encerrados en una matriz de polímeros orgánicos, sobre la superficie de los alimentos o las superficies en contacto con ellos. La estructura del biofilm es unida por un biopolímero sintetizado por estos microorganismos conectados al sustrato. Este material actúa como pegamento para la estructura del biofilm y puede atrapar células y nutrientes presentes en el medio líquido (Zottola y Sasahara, 1994). Casi la totalidad de biofilms que se han documentado están compuestos únicamente de bacterias y sólo algunos pocos estudios se han publicado con respecto a biofilms de levaduras en el procesamiento de alimentos (Carpentier y Cerf, 1993; Kumar y Anand, 1998; Jessen y Lammert, 2003; Wirtanen y Salo, 2005). Sin embargo, la formación de biofilms de origen fúngico sobre las superficies es un hecho evidente, que se ha descrito también como una de las causas más importantes de

biodegradación de los materiales (plásticos, gomas, cristal, telas, papel, pintura y metales, entre otros), debido a que en condiciones apropiadas (humedad y nutrientes) los hongos pueden multiplicarse rápidamente y formar micelio, que en ocasiones alcanza a hacerse evidente macroscópicamente, favoreciendo la penetración de las hifas en estos materiales, acompañado de secreciones con actividad enzimática o química, que favorece su degradación (Kelley y Yaghmaie, 2001; Wallstrom y col., 2002; Little y Ray, 2002). Para prevenir la biodegradación de los materiales, especialmente plásticos, se han diseñado productos en los que se incluye en su formulación distintos productos fungicidas (Whitney, 1996).

La presencia de estos biofilms en las superficies afecta a la eficacia de los agentes antimicrobianos, bien sea por interacción con la matriz (células y polímero) o, por la escasa difusión de los antimicrobianos a través de ella (Cloete, 2003). Se ha observado que los microorganismos son mucho más resistentes cuando se encuentran contenidos en un biofilm que cuando están dispersos en medio líquido (Carpentier y Cerf, 1993).

#### **4.1.2. Resistencia microbiana a los agentes desinfectantes**

La resistencia se define como la capacidad temporal o permanente de un organismo y sus generaciones, para permanecer viable y/o multiplicarse bajo condiciones que destruirían o inhibirían a otros miembros de la misma cepa (Cloete, 2003). Una cepa, una especie o una familia de microorganismos, puede definirse como resistente cuando no es destruida por un producto desinfectante a su concentración de uso habitual (Gillet, 2002).

Es frecuente que muchos desinfectantes cuando son utilizados en superficies abiertas sean ineficaces frente a las bacterias esporuladas, ocasionando entonces que el proceso de desinfección se convierta en un proceso de selección de estos organismos. Adicionalmente en numerosos casos, se observa que después de un programa de limpieza y desinfección aparentemente efectivo, las bacterias sobreviven, lo que podría deberse a diversas circunstancias como la inactivación o la aplicación a una concentración insuficiente del desinfectante utilizado (presencia de materia orgánica, de detergentes, o biofilms), a una menor susceptibilidad real de las bacterias presentes en el proceso en comparación con la susceptibilidad esperada, asociada probablemente a su estado (fase de crecimiento, estado nutricional y adherencia a la superficie), o bien a su resistencia. De otra parte, un enjuague

insuficiente de los desinfectantes puede dejar en el ambiente concentraciones residuales subletales, ocasionando una presión selectiva para retener o adquirir genes de resistencia entre microorganismos o para una adaptación de las bacterias que inicialmente eran sensibles (Langsrud y col., 2003; Cloete, 2003).

Las sustancias biocidas utilizadas habitualmente interactúan en diferentes estructuras o receptores de los microorganismos, por lo que es menor el riesgo de aparición de resistencia hacia los productos de desinfección que frente a los antibióticos, a pesar de ello es posible que se produzcan estas resistencias (Gillet, 2002). Las capas más externas de las células microbianas pueden tener un efecto significativo en la susceptibilidad o resistencia a los antisépticos y desinfectantes. La naturaleza y composición de la superficie varía de un tipo de célula a otra, en el caso de los hongos su pared celular contiene compuestos como el manano, la quitina y  $\alpha$  y  $\beta$  glucanos, que son exclusivos del reino fúngico, aunque el mecanismo de acción de los agentes antimicrobianos a los diferentes tipos de microorganismos todavía no está totalmente clarificado (McDonnell y Russell, 1999; Ghannoum y Rice, 1999). A pesar de ello, sea cual sea el tipo de microorganismo es posible que haya una secuencia común de acciones basadas en la interacción del antiséptico o el desinfectante con la superficie celular, su posterior paso a la célula y su actuación sobre el receptor específico (McDonnell y Russell, 1999).

Aunque como premisa inicial se podría pensar que el mecanismo de resistencia a los desinfectantes puede ser comparable entre las bacterias y los hongos y que sería factible desarrollar una teoría común para ambos reinos, realmente esta comparación se ve limitada por diversos factores, entre los que se puede destacar: 1º) las diferencias estructurales que existen entre hongos y bacterias como por ejemplo, la naturaleza diploide de muchos hongos y su mayor tiempo de generación en comparación con las bacterias. Además, los agentes antifúngicos y antibacterianos disponen de estructuras específicas de acción sobre el receptor, con funciones relevantes sobre cada tipo de microorganismo, por ejemplo numerosos agentes antibacterianos actúan inhibiendo la formación de determinados peptidoglicanos, que son el componente esencial de la pared celular de las bacterias, mientras que muchos compuestos antifúngicos ejercen acción sobre el receptor específico de la formación o funcionalidad del ergosterol, que es un importante componente de la membrana celular de los hongos. No obstante, también hay cierto paralelismo en el mecanismo por el cual desarrollan la resistencia a estos compuestos. Adicionalmente, cabe destacar que no existen análogos

antifúngicos en muchos de los agentes antibacterianos utilizados y viceversa. 2) La segunda limitación se debe a que diferentes mecanismos de resistencia determinados en las bacterias no se han identificado para los hongos. Existen evidencias que sugieren que tanto las alteraciones del receptor específico así como el reducido acceso a ellos (algunas veces en combinación), son mecanismos importantes de resistencia a los agentes antifúngicos. 3) por último, el conocimiento general sobre procesos de intercambio genético en bacterias está mucho más avanzado que el conocimiento de estos mecanismos en hongos (Ghannoum y Rice, 1999).

Independientemente del mecanismo de resistencia que pueda existir en las bacterias u hongos, para disminuir el riesgo de aparición de dicha resistencia debe seguirse un estricto orden de las reglas de limpieza e higiene en general. La desinfección debe ser siempre precedida de una limpieza adecuada. Adicionalmente, se recomienda trabajar en alternancia regular con dos o más productos que posean diferente mecanismo de acción. Este método es preferible al que consiste en mezclar de manera empírica varios productos, a veces incompatibles entre sí. Es también muy importante emplear la concentración y el tiempo de contacto recomendado para cada desinfectante, con el fin de evitar que permanezcan en cada ciclo de desinfección algunos microorganismos menos sensibles al producto (Gillet, 2002), siendo fundamental que las especificaciones de uso de los fabricantes sean las más adecuadas para el tipo de microorganismo y superficie donde se realiza el proceso de desinfección (Langsrud y col., 2003).

#### ***4.1.3. Principios activos de mayor utilización en los procesos de desinfección industrial***

Los desinfectantes son por lo general productos preparados, por lo que pueden contener uno o varios principios activos. Además contienen otras sustancias (álcalis o ácidos, inhibidores de la corrosión y formadores de complejos), que permiten mejorar algunas de sus propiedades de aplicación industrial (Kiermeier y col., 2000). La asociación de principios activos tiene como objetivo, aumentar la eficacia antimicrobiana y disminuir los efectos secundarios. A pesar de ello, no existe un producto milagro y sólo la combinación: eficacia-toxicidad-coste, permite una escala de valor que se optimiza con las condiciones de uso (temperatura, tiempo de contacto, entre otros) (Criquelion y col., 2002).

Los principios activos más indicados para desinfección industrial son:

- Cloro y derivados clorados: El cloro gaseoso, el hipoclorito de sodio y los derivados clorados, producen ácido hipocloroso en presencia de agua que es el que le confiere actividad desinfectante a estos compuestos. Su mecanismo de acción frente a los microorganismos, se basa en la destrucción de las proteínas estructurales y el bloqueo de la actividad enzimática, que se produce dado el poder oxidante del ácido hipocloroso. Sus ventajas están determinadas por ser poco o nada espumante, tener bajo costo y presentar facilidades para su enjuague. Sus mayores inconvenientes son el riesgo de corrosión, su sensibilidad a las materias orgánicas, la inestabilidad ligada a la temperatura y sus incompatibilidades químicas que pueden originar efectos tóxicos en el manipulador. Se consideran buenos bactericidas y virucidas, pero con actividad fungicida poco marcada (Criquelion y col., 2002). Sin embargo, a concentraciones relativamente elevadas (940 mg cloro activo/l) se ha mostrado efectivo, reduciendo la contaminación fúngica en superficies, hasta alcanzar niveles no detectables para mohos de los géneros *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, entre otros (Reynolds y col., 2004).
- Yodo y derivados yodados: en ellos se incluyen compuestos minerales (yoduro de potasio) y orgánicos (yodóforos). Su mecanismo de acción se basa en la liberación progresiva del yodo que actúa por oxidación sobre las proteínas enzimáticas y estructurales de los microorganismos. Sus principales ventajas son su amplio espectro de actividad (bacterias, hongos y virus) y su actividad a baja temperatura. Los inconvenientes para su uso están determinados por el riesgo de corrosión, la sensibilidad a los materiales orgánicos, la inestabilidad ligada a la temperatura, la coloración que produce sobre los materiales plásticos y su elevado coste. El uso principal de estos compuestos es como antiséptico y sólo la forma yodófora es utilizada como desinfectante de superficies, puesto que es la más fiable química y toxicológicamente (Criquelion y col., 2002).
- Ácido peracético, peróxido de hidrógeno y ozono: todos ellos son agentes oxidantes liberadores de oxígeno, presentando el ácido peracético un grado mayor en términos de actividad antimicrobiana. El ácido peracético destruye por ruptura oxidativa, los enlaces intramoleculares de las enzimas y compuestos de la membrana, afectando así sus reacciones vitales intracelulares y de membrana. Se considera un desinfectante eficaz con amplio espectro de acción (bacterias, hongos, virus y esporulados), es activo a bajas temperaturas, no es espumante y se enjuaga fácilmente, su acción es rápida y es económico. Las desventajas para su uso derivan de la posibilidad de corrosión (aunque no a la dosis de uso),

de inestabilidad debida a la temperatura, de sensibilidad a las materias orgánicas, de sus vapores irritantes y de las numerosas incompatibilidades químicas que presenta (Criquelion y col., 2002). Es un compuesto con cierta actividad fungicida aunque mohos del género *Aspergillus* presentan una elevada tolerancia a este compuesto (Hilgren y Salverda, 2000). El peróxido de hidrogeno se encuentra disponible en diferentes concentraciones entre 3 y 90% y debido a su rápida degradación en agua y oxígeno se considera ventajosa su utilización desde el punto de vista de protección del medio ambiente (McDonnell y Russell, 1999). Finalmente, aunque se ha descrito el efecto bactericida del ozono sobre una amplia variedad de microorganismos como bacterias Gram positivas y Gram negativas, esporas bacterianas y fúngicas, el criterio de mayor importancia para su utilización en plantas procesadoras de alimentos es su toxicidad, puesto que a concentraciones elevadas puede ser fatal para humanos, produciendo principalmente afecciones del tracto respiratorio, por lo que es fundamental aplicar estrategias para la seguridad del personal (Guzel-Seydim y col., 2004; Pascual y col., 2007). Tiene la ventaja adicional de poseer un bajo efecto residual, aunque dicha inestabilidad, obliga a ser generado en el lugar de uso a medida que se necesite. Sus aplicaciones principales son el tratamiento de las aguas de bebida, piscinas y de las aguas residuales (Gillet, 2002). No obstante, existen ventajas para su aplicación en la higiene de superficies y en la higienización de los equipos en las industrias de alimentos (Guzel-Seydim y col., 2004; Pascual y col., 2007).

- **Glutaraldehído:** Es raramente empleado como único principio activo. Se asocia frecuentemente al formaldehído y los amonios cuaternarios para la desinfección de tuberías y depósitos, mediante inmersión durante un tiempo prolongado y para desinfección por pulverización (Criquelion y col., 2002). Es el agente antimicrobiano más utilizado a nivel hospitalario para desinfección del material quirúrgico y de endoscopia dado su efecto sobre bacterias y sus esporas, hongos y virus (McDonnell y Russell, 1999; Criquelion y col., 2002). Presentando una elevada eficacia frente a esporas de diferentes especies de *Aspergillus* (Tortorano y col., 2005; Pap y col., 2006). No es corrosivo, es fácil de enjuagar y su costo no es muy elevado. No obstante, presenta un olor característico y es sensible a las variaciones de pH (Criquelion y col., 2002).
- **Formaldehído:** Posee un espectro antimicrobiano bastante homogéneo pero a concentraciones elevadas. Reacciona con las proteínas y los ácidos nucleicos de los microorganismos, ocasionando una desnaturalización irreversible debido a la formación de



puentes intra e intermoleculares. No es corrosivo y tiene una amplia actividad en desinfección por vía aérea; además es fácil de enjuagar y es económico. Como inconvenientes para su uso se citan su olor desagradable con poder lacrimógeno y los posibles riesgos tóxicos por inhalación (Criquelion y col., 2002).

- **Amonios cuaternarios:** Son principios activos de primer orden en consumo mundial en su uso como desinfectantes y antisépticos. Sus propiedades son aprovechadas en desinfección estática del material, en desinfección de equipos, superficies y tuberías. Existen numerosas formulaciones de jabones, lociones y soluciones antisépticas que tienen un amonio cuaternario como principio activo único o asociado. A nivel microbiológico, produce una desorganización de la membrana celular que conlleva a modificaciones de permeabilidad y desnaturalización de las proteínas. No son corrosivos, tienen bajo riesgo de toxicidad y son estables en amplios intervalos de pH y temperatura. Sus desventajas están marcadas por su carácter altamente espumante y su falta de acción sobre virus (Criquelion y col., 2002). Su eficacia frente a esporas fúngicas varía en función del principio activo (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1996), calificando a estos compuestos, especialmente al cloruro de benzalconio, más fungistáticos que fungicidas (Gupta y col., 2002).
- **Alcoholes:** Se usan principalmente el etanol y el isopropanol. Su elección está marcada por su poder disolvente y su carácter volátil más que por sus actividades antimicrobianas. No presentan riesgos particulares frente a los materiales utilizados en la industria, son poco tóxicos y su acción es rápida. Actúan desnaturalizando las proteínas en presencia de un grado de hidratación mínimo (Criquelion y col., 2002). Tienen un amplio espectro de acción antimicrobiana contra células bacterianas vegetativas, virus y hongos, pero no contra las formas esporuladas. Por lo que sólo se recomiendan para desinfección de superficies duras y como antisépticos de piel (McDonnell y Russell, 1999). La presentación más activa frente a los microorganismos es el etanol al 70% (v/v). El isopropanol posee poder disolvente frente a los lípidos lo que incrementa ligeramente su potencial antimicrobiano (Criquelion y col., 2002).
- **Clorhidrato de polihexametilen biguanida (PHMB):** Se usa en asociación con otros principios activos (Criquelion y col., 2002). Se ha utilizado como agente desinfectante general en la industria de alimentos pero su mayor aplicación es en desinfección de piscinas (McDonnell y Russell, 1999). Tiene estrecho poder antimicrobiano y no es esporicida (McDonnell y Russell, 1999; Criquelion y col., 2002).

- Anfóteros: Constituyen un grupo químico poco conocido, que está evolucionando en el tratamiento de las superficies y las tuberías. Tiene efecto contra bacterias, hongos y virus. Dentro de sus ventajas destacan la ausencia de olor, la baja toxicidad y la escasa o nula sensibilidad a las materias orgánicas (Criquelion y col., 2002).
- Se podrían destacar otros compuestos biocidas, que son utilizados más como antisépticos o como desinfectante para manos. Entre ellos los fenoles, utilizados básicamente a nivel hospitalario y veterinario, como desinfectantes de las superficies y antisépticos para la piel sana (Criquelion y col., 2002), por sus propiedades antifúngicas y antivíricas (McDonnell y Russell, 1999), así como la clorhexidina, el cual es posiblemente el más usado como antiséptico, especialmente para lavado de manos y soluciones orales (McDonnell y Russell, 1999; Criquelion y col., 2002).

La formulación de productos más eficaces y que minimicen los efectos secundarios no deseados, debe hacerse con base en el conocimiento de los mecanismos por los cuales un producto desinfectante puede destruir o inhibir la reproducción de los microorganismos (Gillet, 2002). Además de los agentes químicos, en determinadas circunstancias pueden aplicarse procedimientos físicos de desinfección complementarios o no, a los anteriormente mencionados, como el calor generado con agua caliente o vapor para la limpieza *in situ* (Clearing in place, CIP), la filtración del aire y el agua, la aplicación de rayos ultravioleta para pequeños utensilios previamente limpiados, y más difícilmente radiaciones ionizantes para la desinfección de los envases (Anónimo, 2001).

#### **4.1.4. Evaluación de la eficacia de los desinfectantes**

La valoración de los desinfectantes para la industria de alimentos por métodos documentados, repetibles y reproducibles, es esencial. Los industriales necesitan estar seguros que los desinfectantes utilizados son eficaces bajo las condiciones ambientales de su industria (Gibson y col., 1995). Datos específicos en referencia a la eficacia de los desinfectantes se obtienen mediante el seguimiento de protocolos definidos (Kiermeier y Mrozek, 2000), los cuales se han desarrollado aplicando diversas metodologías basadas en ensayos de suspensión o de superficie. Sin embargo, estas pruebas sólo indican si un desinfectante tiene propiedades antimicrobianas en las condiciones especificadas, pero no necesariamente reflejan su actividad en la práctica (Holah, 1995b).

Las pruebas de suspensión evalúan la actividad de los desinfectantes contra especies microbianas determinadas, bajo condiciones diseñadas para simular las condiciones de uso: presencia de materia orgánica, aguas duras y diferentes tiempos de contacto y temperaturas (Gibson y col., 1995). El comité Europeo de Normalización (CEN/TC 216 *Antisépticos y Desinfectantes Químicos*), desarrolló métodos de ensayo en suspensión para evaluar la actividad fungicida básica de los antisépticos y desinfectantes químicos diluidos en agua, publicada en la norma UNE-EN 1275 (Anónimo, 1997), así como la actividad fungicida simulando condiciones prácticas de uso mediante diluciones del producto en agua dura, específicamente para alimentos, industrias y ámbito doméstico, publicada en la norma UNE-EN 1650 (Anónimo, 1998). Dicha actividad fungicida se determina por la capacidad que tiene un producto para reducir en más de 4 unidades logarítmicas el número de células viables de levaduras vegetativas (*Candida albicans*) y de esporas de mohos (*Aspergillus niger*). En estas normas se describe un protocolo de preparación de esporas tedioso y que requiere de mucho tiempo, por lo que se ha propuesto una simplificación del procedimiento (Tortorano y col., 2005). Los resultados obtenidos con esta simplificación fueron reproducibles cuando se evaluó la actividad de siete biocidas contra tres aislamientos de *Aspergillus fumigatus*.

En la práctica, sin embargo, los microorganismos que se someten a la desinfección en las superficies de producción de los alimentos son aquellos que permanecen después de la limpieza y por lo tanto, se encuentran probablemente adheridos, lo que ha hecho que se cuestione la validez de los ensayos de suspensión (Gibson y col., 1995), puesto que se ha observado que en superficie, los desinfectantes deben ser utilizados a mayores concentraciones en comparación a los ensayos en suspensión, debido a que la eficacia de un desinfectante depende en parte de su capacidad de penetración en una superficie (Mattilasandholm y Wirtanen, 1992). Es por ello que los ensayos en superficie son usados para imitar algunos aspectos de la adherencia microbiana, incluyendo períodos cortos de adhesión y secado. Además permiten evaluar el efecto de diversas variables como el tiempo de contacto, tipo de microorganismo, tipo de superficie y sustancia interferente (Holah y col., 1998). El Comité Europeo de Normalización CEN/TC 216, desarrolló una nueva norma adoptada en España como UNE-EN 13697, especificando un método de ensayo cuantitativo de superficie no porosa así como, los requisitos para verificar la actividad bactericida y/o fungicida de productos químicos antisépticos y desinfectantes diluidos en agua dura, que son usados en productos alimenticios, industrias, áreas domésticas y en colectividades. En este

caso, el fungicida se considera eficaz si demuestra una reducción de 3 unidades logarítmicas en el número de hongos viables, en un tiempo de 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), aunque pueden ensayarse otros tiempos (Anónimo, 2002). El mayor problema de este método es que los microorganismos tienen que ser recuperados de la superficie para poder realizar los recuentos, lo que por sí mismo, puede inducir estrés letal. Con estos ensayos sólo se pueden evaluar métodos no mecánicos de aplicación del desinfectante, por ejemplo vapor o inmersión y no incluye los efectos mecánicos de cepillar o limpiar (Holah y col., 1998).

Ambas pruebas, la de suspensión y la de superficie, evalúan sólo la acción del desinfectante en el programa total de higienización y valoran la viabilidad de los microorganismos no al momento de la desinfección, sino después de un periodo de tiempo en el que el recuento celular es posible (Holah y col., 1998).

#### ***4.1.5. Vigilancia y verificación del programa de higienización en el control de la contaminación fúngica***

La validación de los procedimientos de limpieza y desinfección son parte esencial del mantenimiento adecuado de la higiene. La validación proporciona la información que confirma la eficacia del procedimiento y ayuda a identificar los problemas o las deficiencias en el plan de limpieza y desinfección. Esta validación debería ser pro-activa, permitiendo correcciones inmediatas de problemas o acciones para prevenir un daño potencial del producto. Un sistema pro-activo de vigilancia de la higienización de las superficies es la determinación del ATP por bioluminiscencia que permite a los operadores de la línea detectar en tiempo real la eficacia de la limpieza. Esta metodología rápida mide el ATP generado por la contaminación microbiana y por los residuos de producto y sus resultados, permiten tomar acciones rápidas en áreas de no conformidad donde las superficies pueden limpiarse nuevamente (Orth, 1998). Sin embargo, como método de evaluación de la contaminación fúngica tiene una eficacia limitada (Rakotonirainy y col., 2003), que se explicará con más detalle en la sección de métodos de análisis de la contaminación fúngica.

La aptitud y efectividad de los programas de limpieza y desinfección en las diferentes etapas de producción, debe ser continua y efectivamente controlada con métodos microbiológicos (Orth, 1998).

Debido a la heterogeneidad espacial y temporal y a los problemas técnicos relacionados con

el muestreo en el ambiente industrial, obtener una muestra representativa de la contaminación microbiana es una tarea difícil (Maukonen y col., 2003). La toma de muestras supone la extrapolación del resultado de una parte al todo, por lo que el volumen de las muestras tomadas al azar en un conjunto, debe ser tanto mayor cuanto más exacta se quiera que sea la expresión del resultado (García-Ramírez, 1989). Los factores intrínsecos y extrínsecos afectan también la composición de la población microbiana afectando así, el método de muestreo del ambiente industrial. Además los microorganismos están a menudo adheridos a las superficies y, la maquinaria o los equipos de proceso pueden contener partes que son de difícil acceso como puntos muertos (puntos ciegos) o recodos en tuberías (Maukonen y col., 2003). La naturaleza y las características de la superficie son también factores importantes a considerar, puesto que la obtención de muestras microbiológicas de superficies secas, húmedas, oleosas, viscosas, o de carne, piel de pollo, cáscara de naranja, acero inoxidable, concreto, rocas, mallas de cabello, etc., es muy diferente (Fung, 2002). La recuperación de los microorganismos de las superficies no es completa y los induce además a un estado de estrés. Para solucionar estos inconvenientes se recomienda realizar evaluaciones *in situ* de su viabilidad, mediante valoración microscópica con tinciones vitales (Holah y col., 1998).

Los métodos tradicionales de análisis de superficies para la evaluación de la contaminación fúngica, se han agrupado en tres categorías en función de cómo se realiza la toma de muestras (Anónimo, 1993; Holah y col., 1998; Jay, 2002):

- a) Cinta Adhesiva: Es una técnica que permite valorar de manera cualitativa las superficies. Se utiliza para evaluación microscópica directa de la presencia de esporas fúngicas y micelio. Un trozo de cinta adhesiva transparente se presiona suavemente sobre la superficie, para posteriormente adherirla a un portaobjetos (con el lado adhesivo hacia abajo), adicionando antes de la evaluación microscópica una gota de azul de lactofenol.
- b) Hisopados o técnicas de escobillado: Es el método más antiguo, en el que se utilizan hisopos de algodón estéril u otros materiales, para hacer un barrido de una extensión determinada de la superficie. En los lugares en los que el crecimiento fúngico es visible se puede utilizar un hisopo seco, de lo contrario, los hisopos deben humedecerse previamente en solución de peptona estéril al 0,1% u otras soluciones (Moore y Griffith, 2002b). Una vez se ha efectuado el frotis de la superficie, se puede realizar la siembra pasando directamente el hisopo sobre una placa de Petri con medio de crecimiento para hongos, haciendo un estriado sobre la superficie del agar. Alternativamente, el hisopo puede depositarse nuevamente en la

solución de peptona preferiblemente con sustancias con actividad neutralizante, para realizar un enjuague y posteriormente, se efectúan las siembras a partir del diluyente. Después de la incubación, las colonias pueden ser transferidas a otros medios específicos para realizar la identificación fúngica. Una desventaja de esta técnica es que puede acentuar la esporulación de los mohos. Sin embargo, aunque el método presenta muchas limitaciones es considerado como un procedimiento sencillo, rápido y barato para determinar la contaminación en la superficie de los alimentos y de los utensilios.

c) Placas de contacto o técnicas de impronta: Se utilizan para analizar la contaminación de las superficies de la industria alimentaria y ocasionalmente, para evaluar la contaminación superficial de productos alimenticios. La técnica de contacto directo del agar (placas tipo RODAC), se prepara con placas de Petri especiales en las que se vierten  $16 \pm 0,5$  ml del medio de cultivo apropiado, obteniéndose de este modo una superficie de agar que sobresale del borde de las placas. El agar se pone en contacto directo con la superficie que se quiere examinar y se realiza una presión suave. La efectividad de la técnica depende de la transferencia de las colonias viables desde el alimento o la superficie alimentaria al medio y, su eficacia depende de la tensión superficial y el contacto entre el medio y la superficie. Entre los mayores inconvenientes de este método, se encuentran la diseminación de algunas colonias fúngicas que ocasionan un revestimiento sobre la superficie del agar y su ineficacia en superficies muy contaminadas (Jay, 2002).

Uno de los inconvenientes de los métodos tradicionales es el prolongado periodo de incubación, especialmente en los mohos, previo al recuento, por lo que su determinación puede considerarse más bien como un sistema de verificación de la desinfección (Holah y col., 1989; Latge, 1999). Además, son inadecuados para el análisis cuantitativo de biofilms, puesto que un biofilm se desarrolla como microcolonias o agregados y usando técnicas convencionales, tales agregados sólo producirán una única colonia en la placa de agar ocasionando una subestimación significativa del número total de unidades formadoras de colonias presentes, lo cual no permite evaluar la eficacia de la limpieza y la desinfección (Bredholt y col., 1999). Por lo tanto, ensayos alternativos basados en diferentes métodos microbiológicos se están desarrollando continuamente (Vanne y col., 1996). En la actualidad todavía no existe ningún método de control de superficies suficientemente sólido para adoptarlo como estándar (Moore y Griffith, 2002b), por lo tanto tampoco existe de forma consensuada límites críticos que permitan decidir si una superficie ha sido adecuadamente

higienizada desde el punto de vista de la contaminación fúngica. Al respecto, sólo se puede destacar, las recomendaciones de Houhala y col. (1996), quienes establecieron en las superficies alimentarias un nivel objetivo de 0,6 ufc/cm<sup>2</sup> y un límite crítico de 1,6 ufc/cm<sup>2</sup>, evaluados mediante métodos de impronta.

En la industria de alimentos se hace necesario contar con métodos más rápidos que además de proporcionar una adecuada información de la posible presencia de microorganismos patógenos en las materias primas y los productos finales, permitan controlar el proceso de elaboración y controlar la limpieza y las prácticas de higiene. Estos métodos deben tener como premisa la detección y enumeración temprana de los microorganismos, así como su caracterización (de Boer y Beumer, 1999). Los métodos rápidos para la evaluación de superficies son similares a los que se describirán a continuación, para la determinación de hongos y se han dividido también en diferentes categorías: métodos convencionales modificados y automatizados, métodos de bioluminiscencia, métodos de impedanciometría, métodos inmunológicos y moleculares (de Boer y Beumer, 1999; Fung, 2002). Cada uno de ellos tiene sus ventajas e inconvenientes por ejemplo en las técnicas de impedancia, se destaca la posibilidad de su utilización tanto si el microorganismo se encuentra en suspensión o adherido a la superficie, teniendo como único requisito su viabilidad para que puedan presentarse los cambios en las propiedades eléctricas del medio circundante (Holah y col., 1998).

### **5. Métodos de análisis de la contaminación fúngica en los alimentos y las superficies alimentarias**

Los procedimientos disponibles actualmente para determinar la contaminación fúngica de los alimentos y las superficies alimentarias pueden dividirse en métodos tradicionales basados en técnicas microscópicas, recuentos en placas de agar o membranas y técnicas basadas en el Número Más Probable (NMP) (Jarvis y col., 1983; Torres y col., 1997; Beuchat y Cousin, 2002). Sin embargo, estas técnicas basadas en recuentos en placas de agar tienen como principal desventaja la demora en la obtención de resultados ya que el tiempo recomendado para realizar dichos recuentos oscila entre 3 y 7 días. Además, la preparación de las muestras y las siembras es laboriosa, siendo recomendable disponer de una zona de trabajo separada para ello (Twomey y Mackie, 1985; Torres y col., 1997; Berenguer-Soler, 2000). Debido a estos inconvenientes y sumada la necesidad de evaluar la viabilidad de los mohos, se han

desarrollado técnicas rápidas las cuales han demostrado ser muy eficaces para la detección e identificación de mohos y levaduras. Entre estas técnicas se debe destacar el análisis microscópico usando tinciones selectivas o fluorescentes para indicar el estado vital, la citometría de flujo, la de detección de metabolitos o constituyentes celulares producidos por hongos que no están presentes en el alimento, técnicas de impedancia, técnicas enzimáticas, técnicas de detección inmunológica de hongos basados en anticuerpos específicos para un hongo o un grupo de ellos y la detección molecular de fracciones de ADN o ARN que son también específicas para género o especie. El desarrollo de estos métodos ha sido consecuencia de la adaptación a los previamente utilizados para las bacterias. Sin embargo, en dicha adaptación deben considerarse algunas condiciones específicas para los hongos con el propósito de detectar su presencia o identificarlos (Jarvis y col., 1983; De Ruiter y col., 1993; Gourama y Bullerman, 1995; Cousin, 1996; Girardin, 1997; Beuchat y Cousin, 2002).

## **5.1. Métodos tradicionales**

### **5.1.1. Técnicas microscópicas**

Entre las técnicas microscópicas, el método más ampliamente usado es el Recuento Fúngico de Howard y se basa en el concepto de que la evaluación de un número de campos microscópicos estandarizados, puede proporcionar un estimado de la extensión de la contaminación fúngica. No es una técnica muy precisa para indicar el nivel de contaminación entre otros factores, porque un campo positivo puede contener desde una única hifa hasta un gran grupo de micelio, no puede realizarse una identificación de los mohos presentes y además, requiere de una serie de aptitudes y habilidades por parte del analista. No obstante, ha tenido una gran aplicación y se ha usado como criterio de calidad del tomate y otras frutas (Jarvis y col., 1983; Gourama y Bullerman, 1995). Es posible también realizar el análisis microscópico directo para examinar productos almacenados, bien sea directamente o tras su incubación a una elevada actividad de agua y alta temperatura. La evaluación se hace usando un microscopio estereoscopio para establecer directamente la extensión de la contaminación fúngica en granos, semillas oleaginosas, etc. Sin embargo, cuando el daño es interno sólo puede visualizarse el crecimiento del moho si además, es muy extenso (Jarvis y col., 1983).



### 5.1.2. *Métodos de recuento en placa*

En general, las técnicas convencionales basadas en recuento en placas de agar han sido las más utilizadas para la determinación de mohos y, diversos autores han señalado que éste, es el método más adecuado para llevar a cabo cualquier trabajo comparativo. Sin embargo, otros autores coinciden en que los mohos no se pueden contar y por lo tanto evaluar su número, realizando una consecuente calificación de una muestra por superar una cifra de unidades formadoras de colonia (ufc), con los mismos criterios empleados para los recuentos bacterianos, puesto que las esporas asexuales, sexuales y el micelio pueden dar lugar a unidades formadoras de colonias, con lo que no se sabe si una colonia esta formada de una conidia, un conidióforo, una hifa u otra estructura y la colonia puede por lo tanto derivarse de numerosas unidades (como por ejemplo, un grupo). Adicionalmente, se deben tener en cuenta otros factores, como el hecho de que una hifa a la hora de homogenizar la muestra puede romperse en un número indeterminado de fragmentos que son capaces de reproducirse, o que en la preparación de las diluciones se puede incluir un conidióforo o un esporangio lleno de esporas, lo que modifica considerablemente los recuentos (Torres y col., 1997; Berenguer-Soler, 2000; Gonçalves y col., 2006). Son diversos los métodos utilizados para la determinación del recuento fúngico en placa, entre ellos cabe destacar:

- La siembra directa: Esta es una técnica diseñada para valorar la microbiota interna de alimentos como granos, semillas y frutos secos, por lo que se recomienda realizar una desinfección superficial de la muestra antes de la siembra con el fin de evaluar sólo los mohos que han invadido el alimento. Posterior a la desinfección, se depositan 5 unidades del producto en las placas de Petri, se adiciona el medio de cultivo seleccionado y se incuba a 25°C por 5 días, siendo necesario sembrar un total de 50 ó 100 unidades para expresar el resultado en porcentaje de piezas contaminadas. Es una técnica más cualitativa que cuantitativa y se utiliza para controlar los niveles de contaminación fúngica en diferentes etapas de la cosecha, almacenamiento, procesamiento y comercialización (Beuchat, 1992; Rabie y col., 1997; Torres y col., 1997).
- La técnica de siembra por diluciones en placas de agar: Es la más utilizada para realizar el recuento fúngico ya que permite determinar las poblaciones de propágulos fúngicos viables, por unidad de peso o volumen de un alimento (Beuchat, 1992). En el caso de alimentos sólidos al igual que para bacterias, es necesario preparar un homogenizado del producto. Posteriormente, se realizan diluciones seriadas con un diluyente apropiado y se

efectúan las siembras por inclusión o en superficie, en placas de agar con un medio de cultivo apropiado. A pesar de que parece una técnica simple, se han descrito una serie de factores a tener en cuenta desde el muestreo hasta el medio de cultivo empleado, ya que pueden afectar a los recuentos fúngicos realizados (Jarvis y col., 1983). Estos factores en las diversas etapas del análisis fúngicos son:

1) El muestreo y los errores en las diluciones: En esta fase es necesario tomar muestras por duplicado y que sean representativas del lote de producto a examinar. El tamaño de la muestra para siembra por diluciones, debe estar entre 5 y 250g (ml) (Beuchat, 1992). En alimentos como los cereales, es posible que los recuentos entre las réplicas de una muestra presenten diferencias muy amplias que pueden atribuirse a la alta contaminación de algunos granos en forma individual, con elevados niveles de hongos específicos o, a la presencia de estructuras de esporulación con lo cual el alto recuento resulta probablemente, de la desintegración de la estructura. Igualmente, otros factores como la naturaleza de la muestra influyen en dicha contaminación. En relación a las diluciones es común que los recuentos en las diluciones no sigan un incremento en estricto orden decimal, lo que puede deberse a una fragmentación del micelio y ruptura de los grupos de esporas durante la dilución o a una inhibición competitiva que se presenta cuando un gran número de colonias están presentes en las placas (Jarvis y col., 1983).

2) El tipo de homogenización: En un estudio realizado en diferentes laboratorios con muestras de trigo, se obtuvieron mayores recuentos fúngicos, aunque no estadísticamente significativos, en las muestras homogenizadas en Stomacher o por maceración, en comparación con los recuentos obtenidos con otras técnicas de agitación (Jarvis y col., 1983). Una recomendación muy importante a tener en cuenta siempre que se trabaja con hongos es la homogenización de la muestra justo antes de sembrar una alícuota o porción analítica, puesto que los hongos sedimentan rápidamente y se ha observado que los recuentos tienden a reducirse progresivamente con el tiempo, debido a los períodos transcurridos entre la homogenización y la preparación de cada dilución (Jarvis y col., 1983; Beuchat, 1992; Torres y col., 1997).

3) El diluyente: El agua de peptona al 0,1% y el tampón fosfato de potasio al 0,05-0,1M (pH 7,0), son algunos de los diluyentes más comúnmente utilizados para el recuento de mohos y levaduras desde mediados de los años ochenta. Según el tipo de alimento se pueden utilizar otros diluyentes para favorecer el desarrollo de los hongos, por ejemplo el

choque osmótico en mohos xerófilos y levaduras osmófilas, se puede minimizar usando en las diluciones seriadas previas a la siembra en placa, un diluyente que contenga suficiente cantidad de solutos como por ejemplo, diluyentes tampón con un contenido superior al 30% de glucosa o 60% de sacarosa. La muerte de hongos halófilos se puede reducir adicionando entre un 6-10% de cloruro sódico a los diluyentes. De igual forma, se pueden adicionar algunos agentes tensoactivos con el fin de reducir el agrupamiento de esporas y conidias fúngicas (Beuchat, 1992). La presencia de agentes humectantes como el Tween 80, puede ser beneficiosa para el recuento de mohos y levaduras a partir de productos alimenticios secos (Jarvis y col., 1983).

Beuchat y col. (2002), realizaron un estudio para determinar el efecto de siete diluyentes (agua desionizada estéril; soluciones acuosas de 0,1% de peptona; 0,1% de extracto de levadura; 0,1M de tampón fosfato de potasio a pH 6,8; 0,85% de cloruro de sodio; 20% de glicerol y 0,05% de Tween 80), en la recuperación de mohos y levaduras a partir de frutas. Los resultados mostraron que en general la recuperación de los propágulos fúngicos no se afectó por la composición del diluyente. Sin embargo, se observó una reducción en la viabilidad de los propágulos, cuando se dejaron los inóculos durante una hora en los diluyentes previamente a la realización de la siembra. Estos resultados resaltan la necesidad de realizar las inoculaciones en los medios de cultivo inmediatamente después de recuperar los propágulos.

4) Los medios de cultivo: Con el fin de minimizar el tiempo de crecimiento fúngico se han realizado numerosos estudios tratando de establecer la combinación de nutrientes que favorezca su desarrollo y, aunque no existe un consenso en los nutrientes óptimos del medio, si está muy claro que éste debe ofrecer una buena recuperación de los mohos, inhibir la rápida expansión de las colonias y ayudar a su identificación (Jarvis y col., 1983). La selección del medio de cultivo dependerá en gran parte de la micobiota asociada presente en el alimento a analizar (Torres y col., 1997). Tradicionalmente, se han utilizado medios de cultivo como el Patata Dextrosa Agar (PDA) o el Extracto de Malta Agar (EMA), que permiten el crecimiento de todos los mohos. No obstante, el crecimiento invasivo propio de algunas especies dificulta la lectura en este tipo de medios (Torres y col., 1997). Un problema común en la determinación de hongos lo constituye el desarrollo de bacterias en el medio de cultivo y como solución a este inconveniente, se recomienda el uso de antibióticos (Torres y col., 1997). Los antibióticos más comúnmente utilizados son

clortetraciclina, cloranfenicol, oxitetraciclina, gentamicina, estreptomina y kanamicina. El cloranfenicol y la gentamicina, son recomendados por su amplio espectro antibacteriano y su estabilidad térmica lo que representa una ventaja al momento de preparar los medios de cultivo ya que se pueden añadir antes de la esterilización (Gourama y Bullerman, 1995; Beuchat y Cousin, 2002). Los medios de cultivo que contienen Rosa de Bengala (RB) y algún antibiótico son mejores para la recuperación de mohos que otros usados comúnmente (Jarvis, 1973; Jarvis y col., 1983). Sin embargo, estos medios son sensibles a la luz y después de dos horas de exposición, aparecen compuestos inhibidores a concentraciones significativas, por lo que se recomienda que entre su preparación, su inoculación y la incubación no se sobrepase este tiempo (Jarvis y col., 1983; Torres y col., 1997). Otro inconveniente adicional refiere la necesidad de realizar subcultivos cuando se busca una identificación de la especie fúngica desarrollada, debido a la pigmentación que presentan dichos medios (Jarvis y col., 1983).

Para el recuento de determinada microbiota se han desarrollado varios medios de cultivo, selectivos y diferenciales, con el fin de aislar y contar grupos específicos de hongos. El uso de estos medios permite reducir el tiempo requerido para su aislamiento e identificación (Gourama y Bullerman, 1995). El Agar DG18 (Dichloran 18% Glycerol), es el medio más adecuado para realizar recuentos fúngicos en alimentos con baja actividad de agua como cereales, harinas, frutos secos y especias (Hocking y Pitt, 1980). Beuchat y Cousin (2002), destacan como resumen de una amplia revisión bibliográfica que en general para el recuento de mohos xerófilos es aconsejable utilizar medios de cultivo suplementados con solutos como glicerol, glucosa, sacarosa o cloruro de sodio.

Finalmente, el agente solidificante utilizado puede afectar al desarrollo fúngico. Así, Twomey y Mackie (1985), recomiendan utilizar gelatina en los medios diseñados para un rápido crecimiento de algunos géneros fúngicos, puesto que ésta, facilita las etapas de germinación y crecimiento.

5) El tipo de siembra: Aunque aparentemente la técnica de siembra por superficie aumenta significativamente los recuentos de mohos en comparación con la siembra por inclusión (Beuchat, 1992), otros autores han obtenido resultados similares con ambas técnicas en pruebas realizadas en diferentes laboratorios (Jarvis y col., 1983). No obstante, resaltan que al realizar las siembras por inclusión se deben tener en cuenta algunos factores como por ejemplo, la temperatura del medio de cultivo, el volumen de agar (debido a que cantidades

elevadas pueden presumiblemente reducir la tensión de oxígeno e inhibir el desarrollo de colonias aerobias estrictas) y por último, el tipo de placas de Petri ya que se ha observado un mayor choque térmico en placas de plástico. Por su parte, la principal recomendación a tener en cuenta cuando se realizan siembras por superficie, consiste en dejar secar las placas entre 16 y 40 horas después de la adición del agar con el fin de evitar la diseminación de los mohos (Beuchat, 1992; Jay, 2002).

Otro tipo de siembra, utilizada comúnmente en microbiología alimentaria es la técnica de siembra en espiral con la que se consigue una distribución más uniforme de las colonias fúngicas en relación al método de estría en superficie, con sus consiguientes facilidades para la visualización y el aislamiento de los hongos. Sin embargo, esta metodología presenta como principal inconveniente la elevada formación de micelio aéreo que es propia de algunas especies de mohos (Jarvis y col., 1983; Gourama y Bullerman, 1995).

Una simplificación del método de recuento en placas de agar es la técnica de placas Petrifilm<sup>TM</sup> YM. Este método ha sido desarrollado por la compañía 3M para el recuento de mohos y levaduras. Entre las ventajas de este sistema se describen la sencillez de su uso, su tamaño (un poco mayor que una tarjeta de crédito), la vida útil (un año de almacenamiento en frío, antes de la hidratación), no es necesaria la preparación de agar y es fácil realizar los recuentos. Esta técnica se ha descrito como adecuada para el recuento de mohos y levaduras en una gran variedad de alimentos (Beuchat y col., 1990; Beuchat, 1992; Fung, 2002; Jay, 2002).

### **5.1.3. Método del número más probable (NMP)**

Teniendo en cuenta que la homogeneidad de las muestras y las diluciones preparadas desde el macerado original del alimento, afectan considerablemente la precisión del método y que además, el cálculo del NMP depende de la distribución de Poisson de los datos y de la linealidad de los recuentos obtenidos con los factores de dilución, puede decirse que la técnica es sólo ocasionalmente precisa para el recuento de mohos, por lo que raramente es utilizada para la estimación de la contaminación fúngica (Jarvis y col., 1983).

## 5.2. Técnicas rápidas

Muchos métodos denominados como técnicas rápidas fueron inicialmente desarrollados para aplicaciones clínicas (años 60 y 70) y posteriormente adaptadas para ser usadas en alimentos, existiendo un retraso de aproximadamente 10 años con respecto al área médica. Sin embargo, durante la última década ha existido un creciente interés en el ámbito internacional en la adaptación y en la investigación de métodos rápidos, en el campo de la microbiología de los alimentos (Fung, 2002). Estas nuevas metodologías fundamentan su aplicación en la detección de microorganismos bien sea de manera directa, como el análisis microscópico mediante epifluorescencia y citometría de flujo o, indirecta como las técnicas impedanciométricas.

### 5.2.1. Análisis microscópico usando tinciones fluorescentes

La presencia de micelio fúngico puede detectarse microscópicamente mediante la tinción con marcadores fluorescentes específicos o por técnicas de anticuerpos fluorescentes. Estos marcadores fluorescentes pueden ser utilizados para resaltar la presencia de hifas fúngicas, permitiendo así una detección más fácil que la alcanzada usando un colorante tradicional (Jarvis y col., 1983). Las principales ventajas de la microscopia de fluorescencia son la visualización de la distribución espacial de las células en la muestra y la posibilidad de diferenciar entre células viables y muertas, con una adecuada combinación de colorantes fluorescentes (Maukonen y col., 2003). Se han utilizado diferentes grupos de indicadores fluorescentes para evaluar la viabilidad de las conidias fúngicas (Schading y col., 1995), así como la viabilidad y la actividad metabólica de las levaduras (Millard y col., 1997). También se han descrito varias técnicas de inmunofluorescencia que utilizan procedimientos de coloración directa o indirecta y que permiten la detección de antígenos reactivos en el micelio. Sin embargo, las técnicas están limitadas a la disponibilidad de antisueros específicos puesto que muchos de los antisueros disponibles ocasionan reacciones cruzadas con otros anticuerpos fúngicos (Jarvis y col., 1983).

Estos métodos basados en una tinción fluorescente han sido utilizados para detectar de una forma rápida hongos viables en alimentos semisólidos y bebidas (Beuchat y Cousin, 2002). La epifluorescencia directa sobre filtro (DEFT), se basa en la filtración de la muestra a través de una membrana de policarbonato que retiene los mohos, las levaduras y las bacterias.

Posteriormente se realiza la tinción de los filtros, con un marcador fluorescente y se procede al recuento microscópico. Aunque presenta una buena correlación con los recuentos en placa (Torres y col., 1997; Beuchat y Cousin, 2002), una de sus principales desventajas deriva de la presencia de algunas partículas que pueden quedarse atrapadas en el filtro junto con los microorganismos y, aunque realizar filtraciones previas con filtros de menor tamaño pueden prevenir esta situación, tampoco se puede garantizar que todos los microorganismos pasan el modulo de filtración previa. Esto conlleva finalmente, a que el número de microorganismos detectados en el microscopio de epifluorescencia no refleje la realidad de la contaminación del alimento (Boschke y col., 2002). La adaptación de esta técnica sobre superficies, puede proporcionar una estimación de la higiene de las superficies en un tiempo suficientemente corto, como para permitir un control del proceso en tiempo real, siendo de gran utilidad en la evaluación de la higienización de las superficies alimentarias (Holah y col., 1989). El análisis de fluorescencia de las muestras bajo el microscopio puede evaluarse manualmente o con un programa computarizado de análisis de imagen. La evaluación manual se realiza habitualmente para determinar si los microorganismos están o no, presentes en la muestra. Cuando se precisa de una mayor precisión o incluso de recuento se utiliza el análisis de imagen automatizado (Maukonen y col., 2003).

### 5.2.2. Citometría de flujo

Se basa en la propiedad que tienen las partículas de pequeño tamaño de refractar la luz incidente y es aplicable si la población microbiana es morfológicamente homogénea y está uniformemente distribuida. Ha sido utilizada para detectar y cuantificar levaduras en bebidas y alimentos semisólidos. Las células son llevadas mediante un conducto de flujo a un detector que posee una fuente de luz. La muestra se coloca dentro de una corriente de flujo rápida que es forzada a altas velocidades a través de un pequeño orificio para determinar así, la velocidad y la trayectoria de las células que atraviesan el detector. La fuente de luz mide la intensidad de luz reflejada y a su vez, esta información se transforma en: tamaño y forma de la célula, viabilidad y densidad celular. Su aplicación en muchos alimentos se ha visto limitada por la gran cantidad de partículas que éstos contienen. De igual manera, su uso puede estar determinado por el costo del equipo y la necesidad de contar con personal entrenado (Torres y col., 1997; Beuchat y Cousin, 2002; Jay, 2002).

### **5.2.3. Detección de metabolitos y constituyentes celulares**

Algunos metabolitos y constituyentes celulares como la quitina y el ergosterol, que son producidos por hongos y levaduras, y que no están presentes en los tejidos animales o vegetales, se han utilizado como candidatos potenciales para el desarrollo de métodos rápidos de detección de mohos y sus toxinas (Jarvis y col., 1983; Gourama y Bullerman, 1995; Beuchat y Cousin, 2002; Marin y col., 2005). Ocasionalmente, se ha utilizado también el manano, para la detección de levaduras (Beuchat y Cousin, 2002).

La quitina, es uno de los componentes mayoritarios de la pared celular de muchos hongos. Su análisis, o el de algunos de los productos de su descomposición, como N-acetil glucosamina, quitosán o glucosamina, se han utilizado como indicadores del grado de contaminación fúngica o como indicadores de la posible presencia de micotoxinas termoresistentes, cuando los hongos toxigénicos ya no están presentes. Sin embargo, son análisis largos y que requieren de procedimientos complejos para su extracción. Además, la reacción puede verse afectada por algunos aminoazúcares propios de los alimentos (Jarvis y col., 1983; Gourama y Bullerman, 1995; Cousin, 1996; Torres y col., 1997; Beuchat y Cousin, 2002).

El ergosterol es un metabolito primario que se encuentra en la composición de las membranas celulares fúngicas y que difiere de los esteroides presentes en los tejidos de plantas y animales. Puede medirse fácilmente por su absorción ultravioleta, debido a que su doble enlace en los carbonos 5-6 y 7-8 causa una fuerte absorción de luz ultravioleta entre 240 y 300 nm, mientras que los esteroides de las plantas absorben débilmente a longitudes de onda superiores a 240 nm. Su análisis al igual que el de la quitina, requiere de procedimientos largos y complejos para su extracción, por lo que ninguno de los dos métodos se ha adaptado como técnica rápida para la detección de mohos. Adicionalmente, su contenido está influenciado por variables como la especie fúngica, la edad del hongo, la disponibilidad de oxígeno, la temperatura y el método de análisis (Gourama y Bullerman, 1995; Torres y col., 1997; Beuchat y Cousin, 2002).

### **5.2.4. Métodos impedanciométricos**

Aunque el concepto de impedanciometría microbiológica se describió hace más de un siglo, fue a mediados de los años 70 cuando la técnica recibió la atención que se merecía (Silley y Forsythe, 1996). A partir de entonces se han realizado numerosas investigaciones con



bacterias, lo que ha permitido perfeccionar la técnica. Sin embargo para hongos, la bibliografía señala ciertos inconvenientes, con estudios muy contradictorios en los resultados obtenidos.

La impedancia se define como la resistencia al flujo de una corriente alterna que pasa a través de un material conductor (Silley y Forsythe, 1996; Hobson y col., 1996). Durante la etapa de crecimiento microbiano los productos del metabolismo aumentan ocasionando un cambio de la resistencia eléctrica en el medio, lo que produce un incremento de la conductividad o una disminución de la resistencia. Estas mediciones que detectan cambios de resistencia son determinadas más fácilmente si el producto está altamente contaminado. Si por el contrario, los productos tienen baja contaminación se necesitan periodos muy largos de incubación. Es muy importante tener en cuenta que los medios de cultivo para la incubación de las muestras deben seleccionarse en función del tipo de microorganismo a determinar (Baltes, 1990).

El Bactometer diseñado por Bactomatic Inc. (Princeton, NJ), utiliza el principio de la impedancia para enumerar poblaciones microbianas en cortos períodos de tiempo (Hobson y col., 1996). En la técnica directa un par de electrodos están en contacto directo con el medio de crecimiento, mientras que en la indirecta, se detecta el CO<sub>2</sub> producido por los microorganismos y el par de electrodos se coloca en contacto con un material que absorbe dicho CO<sub>2</sub>, en lugar de con la suspensión microbiana. La respuesta se puede evaluar por diferentes vías que están interrelacionadas: impedancia, conductancia y capacitancia. Típicamente, la impedancia disminuye cuando la conductividad y la capacitancia aumentan (Hobson y col., 1996). Las lecturas en cada muestra son tomadas cada 6 minutos (Silley y Forsythe, 1996; Entis y col., 2001). En general, la señal conductiva está asociada con los cambios que ocurren en la solución (masa/volumen del medio iónico). Los cambios de capacitancia se producen muy cerca del electrodo, este electrodo sirve como un lado del captor y una capa de iones sirve como el lado opuesto, los iones más pequeños producen una capa más fina y esto se refleja como un cambio en la capacitancia (Deak y Beuchat, 1993). Esta medida ha sido probada en medios con alta conductividad para estimar mohos y levaduras (Hartman y col., 1992).

Cuando las concentraciones microbianas alcanzan un cierto umbral ( $10^4$ – $10^5$  células de levaduras/ml), se produce un cambio en la capacitancia, conductancia o impedancia (según el parámetro seleccionado) del medio, hasta el punto en el que el equipo puede detectar el cambio (Firstenberg-Eden, 1985). A diferencia de las bacterias que tienden a inducir cambios

positivos en la conductancia (incrementos), las levaduras y los mohos usualmente tienden a reducirla, causando cambios negativos (Deak, 1995). El tiempo de incubación requerido para que las muestras contaminadas alcancen este umbral, se denomina Tiempo de Detección (TD) (Hobson y col., 1996). Por lo tanto, el TD está en función de la temperatura a la que se realiza el análisis, el medio de cultivo, el tipo de microorganismo, los inhibidores presentes en la muestra o el medio, entre otros (Entis y col., 2001).

El medio de crecimiento utilizado para los ensayos de conductividad influye altamente en el cambio eléctrico que puede ser detectado o interpretado por el instrumento. Si los componentes del medio no son diseñados para optimizar este cambio durante el crecimiento microbiano, las curvas de impedancia serán inferiores (Hartman y col., 1992). El control de ciertos ingredientes como sales y carbohidratos en el desarrollo de los medios de cultivo, permite optimizar la señal evitando curvas erróneas (Entis y col., 2001). Hartman y col. (1992), describen algunas circunstancias que producen curvas difíciles de ser interpretadas por el instrumento:

- La línea base puede cambiar
- El cambio de porcentaje en la impedancia puede invertirse durante la fase de crecimiento del organismo
- La aceleración del cambio de impedancia puede ser débil
- Puede obtenerse un valor más bajo del cambio máximo de impedancia
- La curva puede ser bifásica, con lo que no puede ser interpretada
- Pueden desarrollarse curvas erróneas por la presencia en el medio de crecimiento, de bacterias capaces de producir gas.

La evaluación de la respuesta impedanciométrica para recuento fúngico puede realizarse mediante la técnica directa, empleando diversos medios de cultivo (Schaertel y col., 1987; Watson-Craik y col., 1989; Ji-Cheng y col., 2003). Sin embargo, se han obtenido resultados contradictorios en la evaluación del crecimiento fúngico utilizándose un mismo medio de cultivo, viéndose afectada también la respuesta eléctrica en función de la matriz alimentaria (Watson-Craik y col., 1989; Ji-Cheng y col., 2003). Sawai y Yoshikawa (2003), señalaron que los tipos de medios que pueden usarse en la técnica impedanciométrica directa para la determinación de hongos son limitados, puesto que el crecimiento microbiano se detecta

como un cambio de conductividad del medio de cultivo y los mohos y las levaduras por su metabolismo, producen electrolitos a una baja proporción, con el problema adicional que éstos absorben también electrolitos. Por esta razón, recomiendan la técnica indirecta para realizar determinaciones de hongos filamentosos y afirman que de esta manera, se pueden utilizar medios de cultivo que no pueden usarse con la técnica directa.

Otras casas comerciales han desarrollado sistemas similares para evaluar cambios en la impedancia. El RABIT (Rapid Automated Bacterial Impedance Technique), permite monitorear las actividades microbianas en alimentos y bebidas. Sin embargo, a diferencia de los módulos con 16 pocillos usados en el Bactometer, este sistema usa tubos individuales. En el sistema MALTHUS, el crecimiento microbiano se indica por cambios en la conductancia de los fluidos, lo que genera curvas de conductancia similares a las curvas de impedancia usadas en el Bactometer. Al igual que el RABIT, este sistema usa tubos individuales para las muestras, pero a diferencia de los otros dos sistemas, utiliza agua caliente para el control de temperatura, en lugar de aire (Fung, 2002).

### 5.2.5. Métodos enzimáticos

Entre estos métodos se puede destacar la determinación del ATP (trifosfato de adenosina), que se basa en la reacción fotoquímica luciferina-luciferasa (sistema enzimático proveniente de la luciérnaga, *Photinus pyralis*). La luciferasa en presencia de ATP y luciferina, cataliza una reacción bioluminescente en la que la luciferina se oxida provocando una emisión de luz verde-azul que se puede medir por espectrofotometría. Todos los organismos vivos utilizan ATP y su estimación puede ser usada como indicador indirecto de la contaminación microbiana, siempre y cuando el nivel de ATP intrínseco del alimento sea muy bajo o cuando los microorganismos puedan separarse físicamente del alimento. No obstante y debido a la dificultad que se presenta para separar los mohos (micelio y conidias) del alimento, así como para la separación entre el ATP bacteriano y el fúngico, no ha sido un método muy usado para evaluar la contaminación por mohos (Jarvis y col., 1983; Gourama y Bullerman, 1995; Torres y col., 1997).

En los últimos años ha habido un cambio con respecto a la utilización de esta técnica. En lugar de detectar el ATP de los microorganismos presentes en los alimentos, actualmente los sistemas se diseñan para detectar ATP como sistema de vigilancia de la correcta aplicación

del programa de higienización, basándose en la idea de que un ambiente sucio tendrá un alto nivel de ATP mientras que un ambiente que se ha limpiado apropiadamente, tendrá un bajo nivel, todo ello sin tener en cuenta específicamente qué es lo que genera ese ATP. Existen diferentes sistemas comerciales que permiten su detección y la clave consiste en la capacidad de obtener lecturas de ATP en forma de Unidades Relativas de Luz (RLUs) y, relacionar estas unidades a la limpieza de las superficies de las áreas de producción de los alimentos. A pesar de que muchos sistemas diseñan una escala de niveles de RLUs (apto, no aceptable y marginal) para diferentes superficies, no hay un estándar que constituya un nivel de ATP como absolutamente aceptable para un ambiente determinado (Fung, 2002). En realidad tanto los microorganismos como los restos celulares contenidos en los alimentos contribuyen al contenido total de ATP retenido en el hisopo (Davidson y col., 1999). Sin embargo, se ha descrito que si bien los kits comerciales dan resultados satisfactorios para la determinación del ATP procedente de las levaduras, no sucede lo mismo en el caso de las esporas fúngicas, debido a la dificultad de extracción del ATP (Rakotonirainy y col., 2003).

#### **5.2.6. Métodos inmunológicos**

Estos métodos, se consideran una buena herramienta analítica para valorar la seguridad y la calidad de los alimentos. Se basan en la determinación de anticuerpos específicos producidos por una especie de moho o por un grupo de ellos. Los polisacáridos asociados al micelio y que se excretan al ambiente son los componentes fúngicos más importantes que pueden actuar como antígenos en mamíferos (De Ruiter y col., 1993). Los antígenos fúngicos pueden tener tres orígenes diferentes: el micelio, las esporas o el medio de crecimiento (Girardin, 1997).

Se han desarrollado diferentes protocolos usando anticuerpos específicos inmunoglobulina G (IgG), que reaccionan con los mohos. Cabe mencionar entre ellos el desarrollo de técnicas de inmunoensayo (ELISA) tipo sándwich para la detección de especies fúngicas pertenecientes a géneros relacionados entre sí y que son comúnmente encontrados en los alimentos: *Penicillium* y *Aspergillus* spp.; *Mucor* y *Rhizopus* spp.; *Botrytis* y *Monascus* spp; *Fusarium* spp.; y *Cladosporium* spp. En investigaciones de laboratorio estas técnicas han tenido una elevada sensibilidad, permitiendo la detección de pequeñas cantidades de polisacáridos extracelulares (al nivel de 1 ng/ml). Usando el protocolo ELISA se pueden ensayar simultánea y automáticamente un gran número de muestras, pero siempre y cuando se cuente

con personal de laboratorio experimentado y exista la disponibilidad de equipos apropiados (De Ruiter y col., 1993; Girardin, 1997).

Una técnica más simple es la de aglutinación en látex, que se basa en el reconocimiento de antígenos de polisacáridos extracelulares por parte de anticuerpos específicos IgG revestidos dentro de gotas de látex que producen una aglutinación visible. La técnica desde el punto de vista práctico es mejor que la técnica ELISA, puesto que la aglutinación puede observarse visualmente sin necesidad de un costoso equipo de laboratorio, obteniéndose resultados a los 10-20 minutos. No obstante, presenta una menor sensibilidad (De Ruiter y col., 1993; Girardin, 1997). Así, dos kits comerciales que se habían desarrollado para *Aspergillus* y *Penicillium* fueron retirados del mercado debido a sus escasas ventas, lo que pudo indicar la baja aceptación de parte de la industria alimentaria (Girardin, 1997).

Otro método inmunológico que se difundió como fácil de usar es el sistema Dip-stick, que se basa en la unión de antígenos o anticuerpos fúngicos específicos de una especie en particular, a un papel de nitrocelulosa o a una membrana de nylon y su posterior reconocimiento, por parte del microorganismo presente en la muestra. Se han desarrollado protocolos para la detección de algunas especies fúngicas, sin embargo, no se tiene mucha experiencia con esta técnica para los análisis de rutina de productos alimenticios (Dewey y col., 1989; Dewey y col., 1990; De Ruiter y col., 1993; Abdel-Mallek y col., 1995).

A pesar de la alta sensibilidad y fiabilidad de los inmunoensayos para detección de mohos en alimentos, su comercialización se ha visto afectada por factores como la escasa experiencia de parte del personal de los laboratorios industriales en la utilización de estos métodos. Adicionalmente, la validación de estas técnicas para análisis de rutina de la contaminación fúngica de los alimentos no es fácil y no existen estándares ampliamente aplicables, por lo que cada usuario tiene que definir la concentración de antígeno que corresponda a un nivel aceptable de mohos para el alimento evaluado (De Ruiter y col., 1993). La detección de los antígenos puede revelar la presencia de hongos contaminantes en el alimento, sin embargo diferentes especies fúngicas producen exopolisacáridos que tienen las mismas propiedades antigénicas (Girardin, 1997), de forma que cuando la muestra a evaluar presenta una contaminación mixta, el porcentaje de reacciones cruzadas puede alcanzar el 50% (Torres y col., 1997).

### 5.2.7. *Métodos moleculares*

Todos los métodos descritos anteriormente, para detección y caracterización de microorganismos, están basados en las expresiones fenotípicas de sus características. No obstante, estas expresiones están sujetas a condiciones de crecimiento como la temperatura, el pH, la disponibilidad de nutrientes, el potencial de oxidación-reducción, el estrés ambiental y químico, las toxinas, la actividad de agua, entre otros. Por su parte, las características genotípicas de una célula, son mucho más estables. En el caso de las bacterias se ha descrito que el porcentaje de mutación natural de un cultivo es alrededor de 1 en 100 millones de células, lo que ha llevado al desarrollo de diferentes técnicas genéticas para realizar diagnósticos e identificaciones microbiológicas (Fung, 2002).

En micología, los métodos genéticos están basados en la identificación de fracciones moleculares o perfiles de ADN o ARN, que son específicas para un determinado género o especie de hongo. Los métodos más prometedores para su detección en alimentos son aquellos basados en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), incluyendo el Polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD) y el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), la electroforesis en gel en campo pulsado (PFGE), la electroforesis de cariotipificación o combinaciones de estos métodos (Deak, 1995; Beuchat y Cousin, 2002).

La electroforesis de cariotipificación ha demostrado ser una herramienta útil para analizar la composición de ADN de los hongos. Los cariotipos pueden permitir la detección de cepas específicas de levaduras con importancia médica o industrial, como las utilizadas en la elaboración de cerveza y vino (Deak, 1995). La técnica se ha usado para verificar la eficacia de inocular cepas específicas de levaduras en el mosto de uva, así como para observar la diversidad y la dinámica de especies de levadura durante todo el proceso de fermentación alcohólica del vino (Schutz y Gafner, 1993).

Las técnicas basadas en PCR permiten la detección de secuencias de ADN con extrema especificidad y sensibilidad, por lo que son más utilizadas para identificación de microorganismos que para recuentos (Deak, 1995; Jay, 2002). A partir del método de PCR se han desarrollado otras técnicas con el fin de aumentar la especificidad, simplificar los protocolos y disminuir el tiempo requerido para el análisis. Algunas de ellas incluyen la amplificación de diferentes regiones específicas del ADN como ADN<sub>r</sub> y ADN<sub>mt</sub> (ribosomal y mitocondrial, respectivamente) o la utilización de fragmentos específicos de los genes ARN

ribosomales. Otras, incluyen el desarrollo de nuevos iniciadores, nuevos geles de separación y diversas enzimas de restricción (Rath y Ansorg, 2000; Parenicova y col., 2001; Schmidt y col., 2003; Patiño y col., 2005). Aunque algunos materiales usados son muy costosos, se han desarrollado versiones simplificadas de las técnicas moleculares, las cuales requieren menos tiempo y tienen una mejor relación coste-beneficio. No obstante, los métodos moleculares implican técnicas sofisticadas que requieren personal cualificado. Además, están limitadas a la disponibilidad de secuencias de referencia lo que impide una determinación fiable de muchos aislamientos fúngicos (Deak, 1995; Crozier y col., 2006; Padliya y Cooper, 2006). En la actualidad se está realizando la secuenciación de genes adicionales para facilitar la identificación de estos aislamientos fúngicos (Crozier y col., 2006).

### **CAPITULO III**

---

#### **III. MÉTODO DE RECUENTO FÚNGICO MEDIANTE IMPEDANCIOMETRÍA: PUESTA A PUNTO**

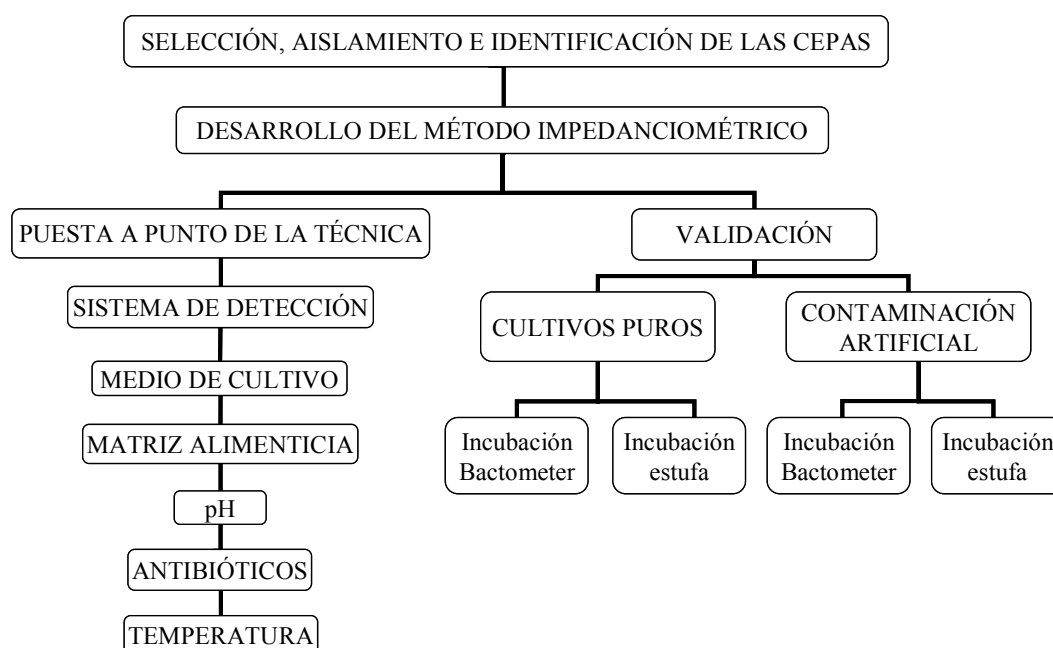


## 1. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.1. Diseño experimental

En la **Figura 1** se muestra el diseño experimental para realizar la puesta a punto del método de recuento fúngico mediante impedanciometría. Los análisis se realizaron por duplicado y los experimentos se repitieron tres veces.

**Figura 1.** Diseño experimental del estudio para realizar el recuento fúngico mediante impedanciometría en alimentos deshidratados.



### 1.2. Selección de las cepas

Con la finalidad de seleccionar las cepas fúngicas predominantes en los alimentos deshidratados y de las superficies de diversas áreas de producción de la industria agroalimentaria, se recibieron 295 placas de agar Rosa de Bengala. Estas placas fueron previamente sembradas e incubadas por el laboratorio de Control Calidad de la industria, lo que implicó que inicialmente no se tuviera el control del tiempo de incubación y del desarrollo fúngico. Fue necesario entonces, la visualización individual de cada una de las placas, para evaluar macroscópicamente el número de cepas que aparentemente eran diferentes. Finalmente se evaluaron 759 colonias fúngicas que se agruparon por sus características macroscópicas en 50 morfologías diferentes.

### **1.2.1. Aislamiento e identificación**

Se procedió al aislamiento de las 50 morfologías diferentes, resemebrando directamente en placas de agar con cuatro medios de cultivo comerciales: sabouraud dextrosa agar (SDA, Difco, Le Pont de Claix, Francia), potato dextrosa agar (PDA, Difco), extracto de malta agar (EMA, Difco) y solución de Czapek agar (Difco). Las placas se incubaron a 25°C, durante un periodo máximo de 30 días. Se realizó la observación de sus características macroscópicas, como el grado de crecimiento y el aspecto general de las colonias (forma, textura superficial y color). También se realizó la observación microscópica utilizando como líquido de montaje y de tinción el azul de lactofenol (Merck; Darmstadt, Alemania), evaluando las características de las hifas, de los órganos de fructificación maduros y de las esporas (tipo, forma, tamaño y tabicación) (Arx, 1981). Finalmente se consiguió una mejor agrupación de los mohos presentes, disminuyendo el número de 50 a 18 grupos fúngicos.

Para la identificación a nivel de género de los mohos, se realizó una resiembra de los 18 grupos fúngicos. Se prepararon las soluciones de esporas en solución fisiológica con Tween 80 al 5% (Panreac, Montcada i Reixac) y se sembraron en cinco medios de cultivo, utilizando la técnica de siembra en tres puntos equidistantes. Los cinco medios de cultivo fueron, los cuatro descritos anteriormente y el quinto fue el agar Czapek extracto de levadura (CYA), cuya preparación se realizó adicionando a la solución de agar Czapek, 0,5% de extracto de levadura (Difco) y 0,1% de una solución de trazas de metales (1%  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  y 0,5%  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ). Se incubaron a 25°C y se realizó el seguimiento de las características macro y microscópicas de cada una de la colonias durante 30 días. A partir de los parámetros observados se procedió a la clasificación de los mohos, hasta nivel de género, utilizando claves taxonómicas (Barnett y col., 1972; Campbell y col., 1996; Koneman y col., 1999).

### **1.3. Separación de esporas y conservación de las cepas**

Las colonias de los 18 grupos fúngicos se inocularon en botellas de Roux que contenían PDA. Se incubaron a 25°C durante 7 días o hasta que la esporulación se hizo evidente y posteriormente se procedió a hacer la separación de las esporas, siguiendo el protocolo establecido por la norma UNE-EN 13697 (Anónimo, 2002). Para ello, se suspendieron las células en 10 ml de una solución de Tween 80 al 0,05%, agitando suavemente. Dicha suspensión se filtró dos veces a través de filtros sinterizados número 2 (con un tamaño de

poro entre 40 y 100  $\mu\text{m}$ ). Se realizó la observación microscópica del número de esporas, verificando que éste, se encontrara en concentraciones superiores a  $10^5$  esporas /ml, para todas las cepas. Posteriormente, se procedió a retirar la solución de Tween 80, mediante centrifugación a 2000g durante 20 minutos y finalmente, se resuspendieron las esporas en una solución crioprotectora de glicerol al 10%. Las soluciones de esporas se distribuyeron en viales de polipropileno estériles, a razón de 1 ml/vial y se conservaron a  $-20^\circ\text{C}$ .

#### **1.4. Preparación de las suspensiones fúngicas en los productos alimenticios**

Se adquirieron siete productos comerciales, algunos de ellos elaborados a partir de la misma materia prima, que variaban en función de sus complementos nutritivos. Entre las muestras tres eran productos a base de leche, tres a base de cereales y/o otros productos alimenticios y uno de cereales con cacao.

A partir de estos productos alimenticios se prepararon soluciones acuosas (1/10), las cuales se esterilizaron por autoclave a  $105^\circ\text{C}$  por 10 minutos, con el fin de eliminar la microbiota presente en las muestras, antes de realizar la inoculación con la cepa fúngica a estudiar. La inoculación de las soluciones acuosas se realizó empleando las cepas que se tenían a  $-20^\circ\text{C}$  (concentración de esporas  $> 10^5$  esporas /ml), que previamente se descongelaron en un baño maría a  $28^\circ\text{C}$ . Este proceso permite evitar las alteraciones ocasionadas por la descongelación, produciendo a la vez la activación celular.

#### **1.5. Puesta a punto del método de recuento fúngico mediante impedanciometría**

Con el objetivo de poner a punto la técnica impedanciométrica para realizar el recuento fúngico en los productos alimenticios deshidratados, se realizaron diferentes ensayos utilizando una cepa identificada como *Penicillium* (representante de un 47,6% de la población fúngica aislada), con la finalidad de evaluar:

- El sistema óptimo de detección
- La influencia del medio de cultivo: composición y gelificante
- La influencia de la matriz alimenticia
- La influencia del pH

- El efecto de la adición de antibióticos
- El efecto de la temperatura de incubación

#### ***1.5.1. Determinación del sistema óptimo de detección***

Basados en las recomendaciones realizadas por diferentes autores (Schaertel y col., 1987; Watson-Craik y col., 1989) y los resultados obtenidos en un ensayo previo, se empleó la capacitancia para realizar la determinación de la respuesta fúngica, utilizando para ello el sistema Bactometer™ (bioMérieux Vitek, Inc.) que consta de una Unidad de Procesado Bactometer (BPU) con espacio para 4 módulos con 16 pocillos cada uno, lo cual permite la realización de 64 análisis individuales. Para los análisis se utilizó la técnica de impedancia directa, incluyendo dentro de cada pocillo 0,9 ml de medio de cultivo y 0,1 ml de suspensión fúngica. La incubación en el Bactometer se realizó a una temperatura de 25°C y se evaluó la respuesta por un tiempo de 48-72 horas. Al tiempo que se inocularon los pocillos del Bactometer, con las respectivas diluciones de las suspensiones fúngicas, se realizaron las siembras en placas de SDA y PDA. Las placas se incubaron a 25°C, durante 5 días y posteriormente, se hicieron los recuentos fúngicos.

Aunque Sawai y Yoshikawa (2003), destacan que utilizando el Bactometer, la técnica indirecta es la más apropiada para el recuento fúngico, cabe resaltar que dicha técnica requiere incluir dentro de los pocillos unas celdas con características especiales con respecto al material y las dimensiones de las mismas, sin mencionar el trabajo laborioso que ello supone, por lo que se decidió utilizar en este trabajo la técnica de impedancia directa.

#### ***1.5.2. Influencia del medio de cultivo***

Se evaluó la respuesta en cuatro medios de cultivo utilizados frecuentemente para el recuento fúngico, tres de ellos disponibles comercialmente: extracto de malta agar (EMA, Difco), sabouraud dextrosa agar (SDA, Difco) y medio levaduras y mohos agar (YMM, bioMérieux, Hazelwood, USA). El cuarto medio de cultivo utilizado fue peptona de soja y extracto de levadura al 0,5% (SP/YE, Difco), recomendado por Watson-Craik y col. (1989), para estos recuentos por impedanciometría. Al mismo tiempo, se comparó la respuesta en la señal de capacitancia obtenida, cuando se reemplazaba el agente gelificante agar-agar (1,5%) por

gelatina (Difco) al 8% (Twomey y Mackie, 1985), en los cuatro medios de cultivo. Adicionalmente, teniendo en cuenta las recomendaciones para el recuento de mohos xerófilos (Beuchat y Cousin, 2002), se realizó un ensayo utilizando Agar Glicerol Dichloran al 18% (DG 18, preparado por componentes), e igualmente se hizo una comparación de la respuesta cambiando el agar-agar por la gelatina al 8%. Sin embargo, no hubo una buena señal de la capacitancia con ninguno de los dos agentes gelificantes, por lo que no se incluyen los resultados encontrados con este medio, dentro del experimento.

### ***1.5.3. Influencia de la matriz alimenticia***

Teniendo en cuenta los resultados encontrados en ensayos preliminares, se seleccionaron al azar tres matrices, una por cada materia prima (leche, cereales y cacao) para la realización del experimento.

### ***1.5.4. Influencia del pH***

El pH influye notablemente en el crecimiento de los hongos (Jarvis y col., 1983) y en su respuesta impedanciométrica (Watson-Craik y col., 1989), por lo que se procedió a valorar el efecto de cuatro valores de pH del medio de cultivo: 4,5 – 5,0 – 5,5 y 6,0, sobre la respuesta impedanciométrica, utilizando el medio de cultivo y la matriz seleccionados.

### ***1.5.5. Efecto de la adición de antibióticos***

Con el fin de evitar el desarrollo de bacterias en el medio de cultivo que pudieran interferir con la determinación de la respuesta fúngica se realizó:

- Selección de los antibióticos y su efecto en la microbiota de los productos alimenticios
- Evaluación de la influencia de los antibióticos en la respuesta impedanciométrica

#### ***1.5.5.1 Selección de los antibióticos y su efecto en la microbiota de los productos alimenticios***

Para la selección de estos antibióticos y su concentración, se realizó previamente una recuperación de la microbiota existente en cada uno de los siete productos alimenticios, en

cinco diferentes medios de cultivo: SDA, PDA, agar rosa de bengala (Scharlau, Barcelona), agar de recuento en placa (PCA, Difco) y tripticasa de soja agar (TSA, Difco). Una vez recuperada toda la microbiota presente, se procedió a su purificación para luego hacer su identificación hasta nivel de género. Para los mohos, se siguieron las pautas de identificación descritas anteriormente. Para el caso de las bacterias, se realizaron pruebas de la catalasa (peróxido de hidrógeno al 3%), citocromo-oxidasa (diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina al 1%), Gram con hidróxido de potasio al 3%. Adicionalmente se evaluó su morfología utilizando una coloración de Gram.

Posteriormente, se realizaron antibiogramas en placas de PCA y TSA, para cada uno de los géneros bacterianos recuperados, utilizando siete antibióticos: trimetoprim, sulfametacina, estreptomicina, penicilina, cloranfenicol, novobiocina y bacitracina (Sigma, St Louis, USA) a tres concentraciones 0,005, 0,025 y 0,05%, con el fin de seleccionar el mejor antibiótico, así como su concentración, para la realización de los ensayos impedanciométricos.

#### *1.5.5.2 Evaluación de la influencia de los antibióticos en la respuesta impedanciométrica*

Se observó la respuesta en la señal de capacitancia para los antibióticos seleccionados, con la matriz alimenticia elegida y paralelamente, se verificó la inhibición bacteriana con estos tres antibióticos, en placas de agar con tres medios de cultivo: SDA, SP/YE agar y PCA, utilizando como control cada uno de estos medios, preparados sin antibiótico.

Finalmente, para determinar el efecto bactericida de los antibióticos se evaluó la técnica impedanciométrica utilizando muestras comerciales de las cuatro matrices, pero sin esterilizar previamente.

#### *1.5.6. Efecto de la temperatura de incubación*

Con las condiciones seleccionadas (medio de cultivo, matriz, pH y antibióticos), se comparó el efecto de dos temperaturas de incubación: 25 y 28°C.

### **1.6. Validación de la efectividad del método impedanciométrico**

#### *1.6.1. Validación con cultivos puros*

Una vez determinadas las condiciones óptimas de trabajo se procedió a comprobar la efectividad del medio de cultivo, con los otros tres géneros fúngicos predominantes:

*Rhizopus*, *Aspergillus* y *Cladosporium*. La evaluación se realizó siguiendo todos los parámetros establecidos y utilizando las suspensiones fúngicas que se tenían congeladas a -20°C. Sin embargo, se quiso determinar para estos tres géneros, la respuesta de la señal en las tres matrices utilizadas anteriormente y se incluyó además, una cuarta matriz basada en cereales, pero que contenía una alta variedad de ingredientes complementarios. Posteriormente, se estableció la relación entre el tiempo de detección (TD) y el número de esporas fúngicas inoculadas.

#### **1.6.2. Efecto de la incubación total o parcial en Bactometer**

Teniendo en cuenta que para cereales de desayuno, galletas y preparados alimenticios para regímenes dietéticos o especiales la norma microbiológica establece un recuento máximo de mohos y levaduras entre 100 y 300 ufc/g (Anónimo, 1976; 1982; 1987), y que el tiempo de respuesta de la señal impedanciométrica está directamente relacionado con la concentración de esporas presentes en el medio de cultivo, se decidió evaluar también, el efecto de incubar previamente los módulos del Bactometer en estufa, a 25°C por un tiempo de 15 horas y posteriormente, pasarlos al equipo para continuar la incubación y hacer el seguimiento de la señal de respuesta, con la finalidad de reducir el tiempo de ocupación del equipo y maximizar su aprovechamiento por parte de la industria.

#### **1.6.3. Validación con alimentos artificialmente contaminados**

Por último y con la finalidad de evaluar el comportamiento impedanciométrico de las muestras cuando en ellas existía más de un género fúngico, se forzó la contaminación de los productos deshidratados con una mezcla, a la misma proporción en volumen, de las cuatro suspensiones fúngicas (*Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* y *Aspergillus*), que se tenían congeladas a -20°C (Apartado 1.3. Separación de esporas y conservación de las cepas). Se pesaron 10 gramos de cada una de las cuatro matrices por separado en recipientes estériles y se adicionó a cada una de las muestras, 1,5 ml de la suspensión resultado de la mezcla de mohos. Se almacenaron durante 15 días a temperatura ambiente (18-22°C) y pasado este tiempo, se prepararon las diluciones decimales de los productos para su evaluación según el método descrito anteriormente. Finalmente, se estableció la relación entre el TD y el número

de hongos. Al igual que en el experimento anterior, también se realizó la comparación del método incubando total y parcialmente en el Bactometer.

### **1.7. Análisis estadístico**

Para la realización del estudio estadístico se utilizó el programa informático SPSS para Windows, versión 14.0. (SPSS Inc. 2005). Los resultados se evaluaron mediante análisis de la varianza utilizando el Modelo Lineal Generalizado (GLM) y los test de Tukey para comparación múltiple entre las medias con un nivel de significación  $p < 0,05$ . Para la calibración entre los tiempos de detección obtenidos en Bactometer y el recuento de esporas de las diferentes cepas, se utilizó el análisis estadístico de la varianza de regresión.



## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1. Selección, aislamiento e identificación de las cepas fúngicas

En la selección de las cepas fúngicas predominantes en los alimentos deshidratados y de las superficies de diversas áreas de producción de la industria agroalimentaria, y tras la observación de las características macro y microscópicas de los 18 grupos fúngicos iniciales, se determinaron 12 géneros diferentes, siendo predominantes *Penicillium*, *Rhizopus*, *Aspergillus* y *Cladosporium* (**Tabla 2**). Cabe destacar que dentro de cada género pueden existir diferentes especies de mohos, pero dado que el objetivo del trabajo no era la identificación completa de los microorganismos, se seleccionaron al azar cuatro cepas, una por cada uno de los géneros más representativos de la población total, de modo que al final estas cuatro cepas seleccionadas representaron el 77,5% de los géneros fúngicos encontrados. Estos resultados coinciden con los referidos para contaminantes habituales en alimentos elaborados a base de leche en polvo, cacao y cereales, así como en el ambiente (Müller, 1981; Larrañaga y col., 1999; Pascual-Anderson y Calderón y Pascual, 2000; Richter y Vedamuthu, 2002).

**Tabla 2.** Frecuencia y porcentaje, de los géneros fúngicos determinados en las 759 colonias evaluadas de las 295 placas de agar rosa de bengala.

GÉNERO	FRECUENCIA	PORCENTAJE
<i>Penicillium</i>	361	47,6
<i>Rhizopus</i>	92	12,10
<i>Aspergillus</i>	85	11,19
<i>Cladosporium</i>	70	9,22
<i>Geotrichum</i>	60	7,90
<i>Alternaria</i>	20	2,60
<i>Fusarium</i>	13	1,70
<i>Trichoderma</i>	10	1,30
Otros	48	6,32

## 2.2. Puesta a punto del método de recuento fúngico mediante impedanciometría

En la puesta a punto de la técnica impedanciométrica se realizaron diferentes ensayos con una cepa de *Penicillium*, evaluando la influencia del medio de cultivo (gelificante, composición, pH y adición de antibióticos), la temperatura de incubación y la matriz alimenticia.

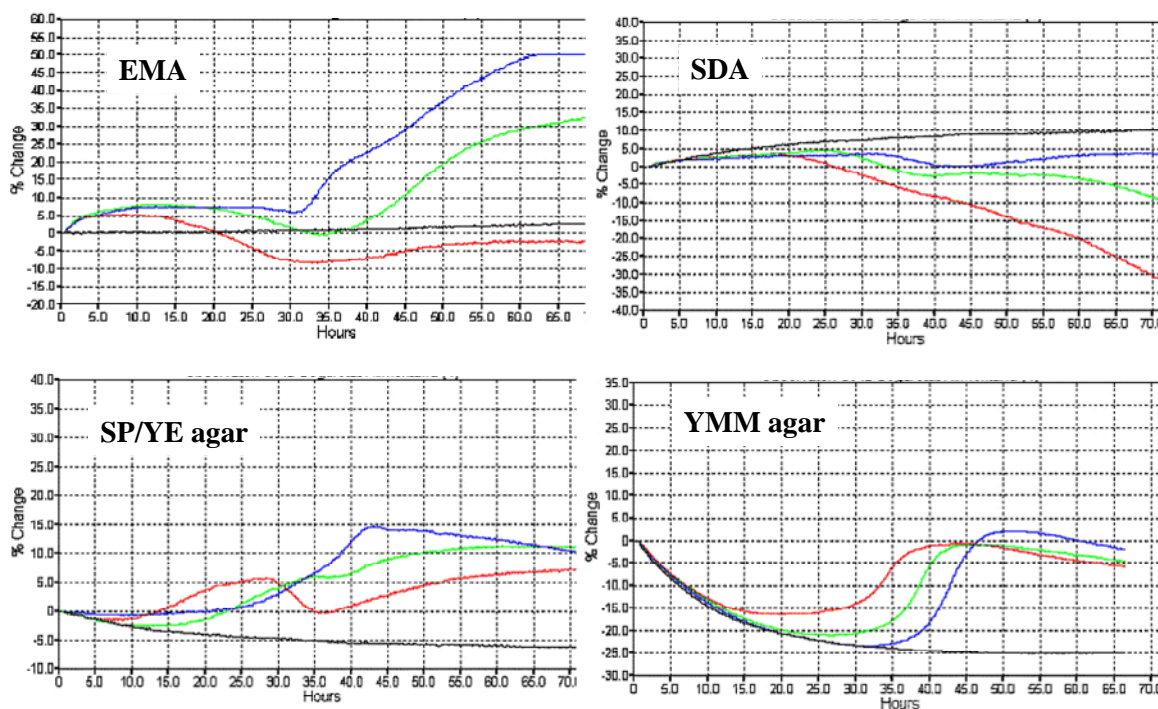
### 2.2.1. Influencia del medio de cultivo

En las **Figuras 2 y 3** se muestra el efecto del agar-agar y la gelatina como gelificantes en la respuesta de la capacitancia en extracto de malta, sabouraud dextrosa, SP/YE e YMM. En los resultados se observaron diferencias en la señal de respuesta de la capacitancia, así como en el tiempo de detección en función del medio de cultivo y del tipo de agente gelificante. En general, cuando se utilizó agar-agar, se presentó una inversión en las curvas de respuesta de la capacitancia para las concentraciones más altas de esporas, en todos los medios de cultivo ensayados (**Figura 2**). Con el SP/YE agar se presentó inversión en las concentraciones de  $10^4$  y  $10^5$  esporas/ml, para el agar extracto de malta con las concentraciones entre  $10^3$  y  $10^5$  y para el SDA, hubo inversión incluso hasta concentraciones de  $10^2$  esporas/ml. Los resultados obtenidos con SDA, son similares a los obtenidos por Schaertel y col. (1987), quienes observaron que el moho *Aspergillus niger* produjo irregularidades en las curvas de capacitancia, generando detecciones cuestionables, aún cuando el crecimiento fúngico se pudo visualizar fácilmente en los pocillos. Igualmente, coinciden con lo determinado por Watson-Craik y col. (1989), para el medio de cultivo EMA. Sin embargo, cuando estos autores utilizaron el medio de cultivo diseñado por ellos (SP/YE agar), obtuvieron una buena respuesta en la señal tanto por capacitancia como por conductancia.

En el medio YMM agar, hubo marcadas disminuciones en la señal de capacitancia para todas las concentraciones de esporas/ml, desde  $10^1$  hasta  $10^5$ , proporcionales a la concentración de las mismas. Estas disminuciones que originaron valores negativos de la señal, variaron entre  $-16$  y  $-26\%$ . Sin embargo, pasadas algunas horas se estabilizó la respuesta y posteriormente se inició el aumento de la señal, lo que permitió que el equipo detectara los TD, generando curvas que mantuvieron la proporción con respecto a las concentraciones de esporas. Estos incrementos de la capacitancia alcanzaron valores que oscilaron nuevamente alrededor de cero, es decir, que la respuesta llegó hasta el punto de partida de la señal (**Figura 2**). Si se

tiene en cuenta que el YMM agar es un medio diseñado específicamente para su uso con el Bactometer, y analizando únicamente el aumento en la señal de la capacitancia ocasionado por las diferentes concentraciones del moho, podría decirse que estos resultados coinciden con lo reportado por Schaertel y col. (1987), quienes afirmaron que utilizando un medio de cultivo específico para ensayos de impedancia con mohos y levaduras, es posible obtener una buena calidad en las curvas de capacitancia, con mohos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillim*. Aunque Watson-Craik y col. (1989) afirman que la inversión de las curvas debe ser considerada como no apropiada, para demostrar la respuesta eléctrica de los mohos.

**Figura 2.** Efecto del agar-agar como gelificante en las respuesta de la capacitancia en EMA, SDA, SP/YE agar e YMM agar. Recuento de esporas/ml (-): $10^5$ ; (-): $10^4$ ; (-): $10^3$  y (-): control.



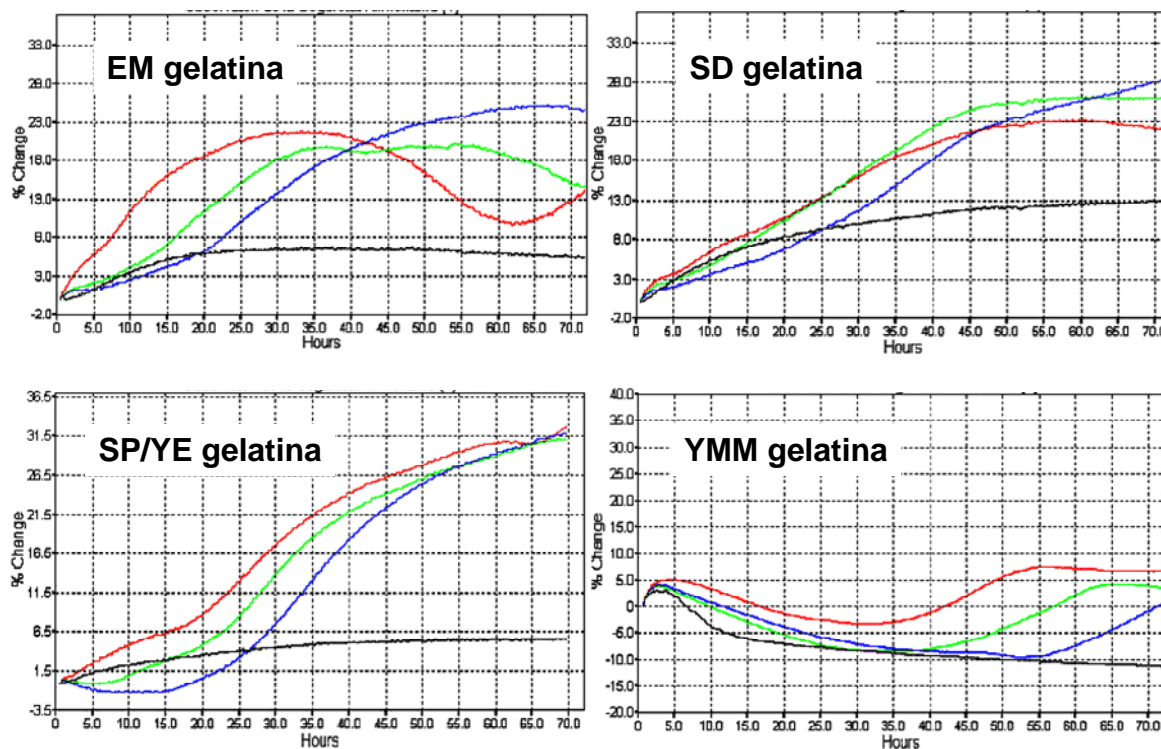
Cuando se utilizó gelatina como agente solidificante, los resultados variaron con relación al medio de cultivo (**Figura 3**). Para el medio extracto de malta se presentó inversión de las curvas de respuesta, en las concentraciones de  $10^4$  y  $10^5$  esporas/ml. Sin embargo, para el medio SP/YE, se presentó aumento de la señal de capacitancia que estuvo en relación con el recuento de esporas y aunque la línea base inicial, mostró un ligero descenso que varió entre 0 y 2%, para las concentraciones inferiores a  $10^4$  esporas/ml, se puede considerar como insignificante, dada la buena calidad de las curvas obtenidas (Schaertel y col., 1987). Hay que

destacar también, que con este medio se detectó respuesta en un intervalo de recuento de esporas/ml entre  $10^1$  y  $10^5$  esporas/ml. La alta sensibilidad de los sistemas de impedancia ya ha sido descrita por Silley y Forsythe (1996), quienes hicieron referencia a su capacidad para detectar presencia de organismos viables, a niveles inferiores a 10 ufc/ml. Cuando el recuento de esporas fue de  $10^5$ /ml la respuesta se obtuvo en menos de cinco horas, pero en la mayoría de los casos no fue posible detectar el tiempo de detección (TD) ni automática ni visualmente. Teniendo en cuenta que Firstenberg-Eden (1985), determinaron que el umbral de detección del equipo para el caso de levaduras, se encuentra entre concentraciones de  $10^4$  –  $10^5$  células /ml, podría pensarse también en el hecho de que al sobrepasarse este umbral, como en el caso de las mayores concentraciones de esporas evaluadas, se afecte la respuesta. Los resultados obtenidos con el medio SP/YE coinciden con lo recomendado por Twomey y Mackie (1985), en relación a la importancia de incluir gelatina en medios diseñados para el rápido crecimiento de algunas especies fúngicas.

En el medio sabouraud dextrosa con gelatina, se presentó un incremento en la señal de capacitancia para todas las concentraciones de esporas evaluadas. Sin embargo, no se pudo precisar el tiempo de detección para la concentración de  $10^5$  esporas/ml, lo que puede deberse como se comentó anteriormente, a que dicha concentración sobrepasa el umbral de detección del equipo. Para las concentraciones entre  $10^1$  y  $10^4$  esporas/ml, las curvas de respuesta mantienen la proporción según el recuento de esporas pudiéndose determinar los tiempos de respuesta (**Figura 3**).

Para el medio YMM gelatina, el comportamiento de la señal de capacitancia fue similar a lo encontrado con agar-agar, con la diferencia de que al inicio de la incubación se observa un ligero aumento de la señal. No obstante, al cabo de las 15 horas ya se presentan disminuciones para todas las concentraciones de esporas con valores negativos de la capacitancia (**Figura 3**). La calidad de las curvas generadas fue menor que la obtenida en agar-agar (**Figura 2**), aunque se mantiene también la relación entre las respectivas diluciones fúngicas. Los porcentajes de disminución de la capacitancia fueron menores y oscilan entre – 11 y –17%, pero al igual que con agar-agar, el aumento en la señal de respuesta alcanza hasta el punto donde se había iniciado el descenso.

**Figura 3.** Efecto de la gelatina como gelificante en la respuesta de la capacitancia en EM, SD, SP/YE y YMM. Recuento de esporas/ml (-): $10^5$ ; (-): $10^4$ ; (-): $10^3$  y (-): control.



De los resultados se puede concluir que los medios que presentaron mejor respuesta en la señal de capacitancia fueron el SP/YE gelatina y el YMM agar y gelatina. Sin embargo, al comparar los tiempos de detección en función del medio de cultivo y del recuento de esporas, se apreció que con el medio SP/YE con gelatina fueron estadísticamente inferiores a los obtenidos con YMM tanto con agar como con gelatina, excepto cuando el recuento de esporas estaba entorno a 1,6 unidades logarítmicas/ml. A diferencia del medio SP/YE gelatina, los tiempos de respuesta obtenidos con el medio YMM agar, estuvieron por encima de 30 horas para todas las concentraciones de esporas evaluadas, lo que pudo deberse posiblemente a las marcadas disminuciones de la señal de capacitancia en las primeras horas de incubación (**Tabla 3**).

La gelatina no tuvo un efecto positivo en la disminución del tiempo de detección en el medio YMM. Así en este medio con gelatina se observó un retraso estadísticamente significativo en comparación con el agar-agar, aunque al igual que lo descrito anteriormente, estas diferencias desaparecen en recuentos de esporas entorno a 1,5 unidades logarítmicas/ml.

**Tabla 3.** Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas (media y desviación estándar), en diferentes medios de cultivo.

Log esporas/ml	TD (horas)		
	YMM gelatina	YMM agar	SP/YE gelatina
5,58 ± 0,26	38,50 ± 3,04 <sup>a</sup>	32,33 ± 1,89 <sup>b</sup>	19,00 ± 2,18 <sup>c</sup>
4,58 ± 0,26	47,17 ± 1,04 <sup>a</sup>	36,00 ± 0,50 <sup>b</sup>	22,33 ± 3,51 <sup>c</sup>
3,58 ± 0,26	57,33 ± 2,08 <sup>a</sup>	41,00 ± 1,50 <sup>b</sup>	29,17 ± 4,65 <sup>c</sup>
2,58 ± 0,26	60,00 ± 1,80 <sup>a</sup>	48,90 ± 2,25 <sup>b</sup>	40,83 ± 1,04 <sup>c</sup>
1,58 ± 0,26	64,33 ± 2,75 <sup>a</sup>	61,33 ± 0,29 <sup>ab</sup>	56,25 ± 6,01 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup>: Letras diferentes en la misma fila corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

En general, los resultados encontrados con relación al agente gelificante, no coinciden en su totalidad con los obtenidos en otros trabajos (Schaertel y col., 1987; Watson-Craik y col., 1989), en los que se resalta el efecto positivo que ofrece el agar-agar para el desarrollo de los mohos y su consecuente respuesta eléctrica. Sin embargo, se debe puntualizar que en estos trabajos, la comparación se realizó entre caldo y agar, pero en ningún momento se utilizó gelatina.

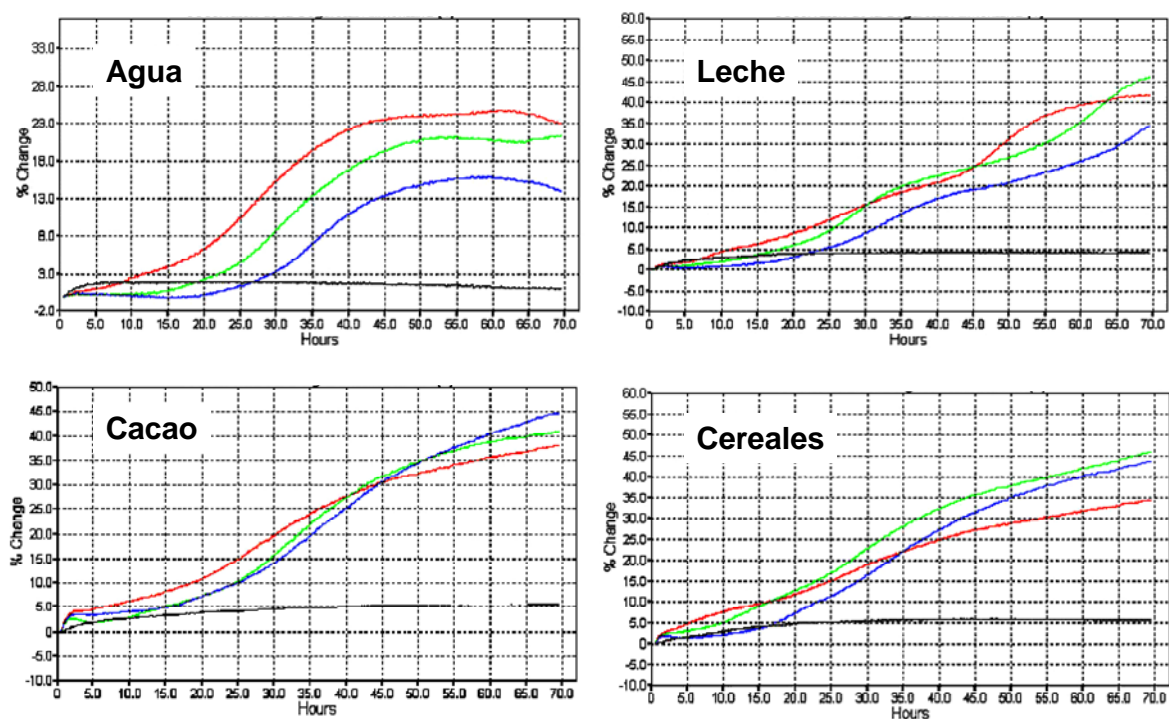
En función de los resultados obtenidos, en relación a la composición del medio y el agente gelificante, se seleccionó para la realización de los siguientes ensayos el medio SP/YE gelatina, no sólo por presentar los menores tiempos de detección sino también, por la buena calidad de las curvas de respuesta en la señal de capacitancia.

### 2.2.2. *Influencia de la matriz alimenticia*

En la **Figura 4** se muestran las curvas de capacitancia en función de las matrices evaluadas, inoculadas con diferentes concentraciones de esporas fúngicas. Estas curvas de capacitancia reflejaron un incremento de la señal para todas las matrices. El análisis visual de las curvas generadas con la matriz agua para las mayores concentraciones de esporas, mostró claramente el momento en el que se produjo el cambio en la respuesta de la capacitancia, lo que facilitó la determinación del TD y al mismo tiempo permitió verificar que cuando se

utiliza como matriz cualquiera de las soluciones acuosas de los productos alimenticios, el tiempo de detección estuvo directamente influenciado por los nutrientes presentes en dichas soluciones. Cuando el recuento de esporas fue de  $10^6$ /ml, la respuesta se obtuvo en menos de cinco horas, especialmente para la matriz a base de cereales. En la mayoría de los casos no fue posible detectar el tiempo de cambio automática ni visualmente, lo que podría deberse, probablemente a que los productos alimenticios proporcionaron nutrientes que facilitaron el desarrollo de los mohos.

**Figura 4.** Efecto de la matriz alimenticia (agua, leche, cacao y cereales) en la respuesta de capacitancia. Recuento de esporas/ml (-): $10^5$ ; (-): $10^4$ ; (-): $10^3$  y (-): control.



En el análisis estadístico teniendo en cuenta el factor matriz se apreciaron diferencias entre el agua y el resto de matrices. Aunque los tiempos de detección (TD) para el agua fueron los más tardíos (**Tabla 4**), hay que destacar la buena calidad de las curvas generadas, lo que puede representar una ventaja al momento de querer estandarizar esta metodología como protocolo de trabajo para el recuento fúngico en determinados estudios de investigación, como sería la evaluación de la actividad de los desinfectantes.

Cuando se comparó el efecto de la interacción de la matriz y el logaritmo del recuento de esporas, no se observaron diferencias estadísticas. Sin embargo, cuando se hizo la comparación por logaritmo en las cuatro matrices, se apreciaron diferencias significativas

para el recuento de esporas entorno a  $10^5$ /ml entre cereales y las otras tres matrices, observando un TD claramente inferior (**Tabla 4**).

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Watson-Craik y cols. (1989), quienes en medio agar peptona de soja y extracto de levadura, consiguieron una buena calidad de las curvas cuando utilizaron como diluyente agua. Cuando la matriz fue zumo de frutas, ellos encontraron alteraciones en las curvas de respuesta con relación a la dirección y al porcentaje de cambio, dependientes de la dilución del zumo, siendo menor la variación en las curvas cuando la dilución era mayor. También Ji-Cheng y col. (2003), obtuvieron una buena correlación del recuento de hongos en muestras de agua purificada entre la técnica impedanciométrica y el método tradicional, con la ventaja adicional de una reducción del tiempo de prueba desde 5 días con el método tradicional a 44 horas por impedancia, lo que permite mejorar la eficiencia del trabajo de control de calidad de rutina en el laboratorio de alimentos. Sin embargo, describen como desventajas del método, la variación de los resultados que puede presentarse con el cambio del medio de cultivo y la interferencia de la matriz alimentaria.

**Tabla 4.** Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas en medio de cultivo SP/YE gelatina con diferentes matrices alimenticias (media y desviación estándar).

Log esporas/ml	TD (horas)			
	agua	leche	chocolate	cereales
6,21 ± 0,14	18,50 ± 3,12 <sup>a</sup>	11,83 ± 1,76 <sup>a</sup>	14,75 ± 3,89 <sup>a</sup>	< 5,00 <sup>b</sup>
5,19 ± 0,15	24,00 ± 1,00 <sup>a</sup>	19,67 ± 4,48 <sup>a</sup>	21,50 ± 3,04 <sup>a</sup>	11,17 ± 3,62 <sup>b</sup>
4,19 ± 0,15	30,50 ± 1,00 <sup>a</sup>	26,17 ± 2,02 <sup>b</sup>	27,50 ± 2,12 <sup>b</sup>	20,33 ± 6,29 <sup>b</sup>
3,19 ± 0,15	37,33 ± 0,58 <sup>a</sup>	30,50 ± 3,46 <sup>b</sup>	32,50 ± 4,44 <sup>b</sup>	27,33 ± 6,25 <sup>b</sup>
2,19 ± 0,15	49,83 ± 4,07 <sup>a</sup>	43,83 ± 4,25 <sup>b</sup>	38,17 ± 7,08 <sup>b</sup>	35,50 ± 3,12 <sup>b</sup>
1,23 ± 0,13	55,50 ± 2,12 <sup>a</sup>	55,50 ± 0,71 <sup>a</sup>	50,50 ± 9,54 <sup>a</sup>	55,83 ± 8,02 <sup>a</sup>

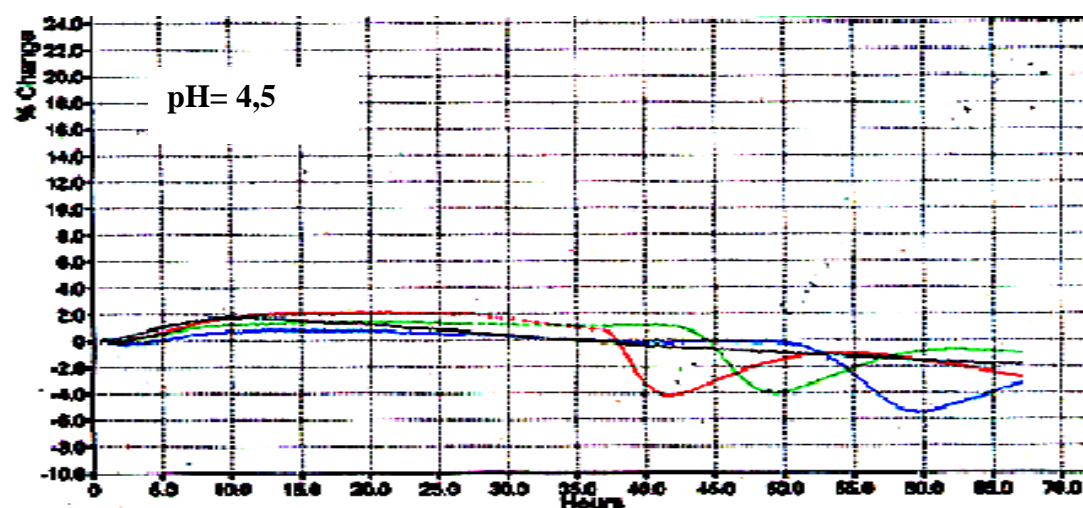
<sup>a-b</sup>: Letras diferentes en la misma fila corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).



### 2.2.3. Influencia del pH

El pH 4,5, ocasionó inversión de las curvas para las mayores concentraciones de esporas. Los otros tres valores de pH (5,0; 5,5 y 6,0), reflejaron un incremento de la respuesta de la capacitancia para recuentos de esporas menores o iguales a  $10^5$ /ml. (Figura 5). Este efecto de inversión de las curvas encontrado a bajos pH, fue observado también por Watson-Craik y col. (1989), cuando analizaron zumos de frutas diluidos a la mitad, mientras que a diluciones 1:10 la inversión de la señal fue transitoria, lo que según estos autores puede ser atribuible al efecto del pH. Coincidiendo con este autor y según nuestros resultados, es importante controlar este factor en la determinación del recuento fúngico mediante impedanciometría.

**Figura 5.** Efecto del pH 4,5 del medio de cultivo SP/YE gelatina en la respuesta de la capacitancia. Recuento de esporas/ml (-): $10^5$ ; (-): $10^4$ ; (-): $10^3$  y (-): control.



El análisis estadístico no reveló diferencias en los tiempos de detección obtenidos para los otros tres valores de pH (Tabla 5). De igual manera, tampoco se observaron marcadas diferencias visuales en la calidad de las curvas obtenidas excepto por un ligero aumento registrado en el porcentaje total de cambio de la capacitancia, que fue de aproximadamente 33% para el pH 5,5; de 21% para pH 5,0 y del 19% para pH 6,0. Teniendo en cuenta el mayor porcentaje de cambio total, se seleccionó el pH 5,5 para los siguientes ensayos, coincidiendo con las recomendaciones de Schaertel y col. (1987).

**Tabla 5.** Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas en medio SP/YE gelatina a diferentes pH y en solución acuosa de cereales (media y desviación estándar).

Log esporas/ml	TD (horas)		
	pH 5,0	pH 5,5	pH 6
5,78 ± 0,00	6,33 ± 0,29	5,67 ± 0,58	4,75 ± 1,06
4,80 ± 0,07	15,00 ± 2,18	15,00 ± 1,00	11,00 ± 3,46
3,80 ± 0,07	20,83 ± 0,76	20,83 ± 2,25	17,83 ± 2,93
2,80 ± 0,07	29,00 ± 2,18	29,33 ± 3,21	25,17 ± 3,82
1,80 ± 0,07	39,17 ± 2,25	43,67 ± 6,51	38,50 ± 3,50

#### 2.2.4. Efecto de la adición de antibióticos

##### 2.2.4.1 Selección de los antibióticos y su efecto en la microbiota de los productos alimenticios

La microbiota aislada de los productos alimenticios estaba constituida por *Bacillus* de forma predominante y, en menor proporción *Lactobacillus*, *Streptococcus* y microorganismos pertenecientes a la familia *Micrococcaceae*. Los resultados de los antibiogramas mostraron que sólo con estreptomycin, novobiocina y cloranfenicol se obtenían halos de sensibilidad iguales o mayores a 15 mm, para todos los géneros bacterianos encontrados. Todas las bacterias fueron sensibles a las tres concentraciones de novobiocina y estreptomycin, pero los mayores halos de sensibilidad se observaron con la concentración de 0,005%. Con el cloranfenicol, los mejores resultados se obtuvieron con la concentración de 0,025%.

##### 2.2.4.2 Evaluación de la influencia de los antibióticos en la respuesta impedanciométrica

Los resultados mostraron incrementos en la señal de capacitancia con los tres antibióticos probados para concentraciones de esporas entre  $10^1$  y  $10^5$ /ml. El análisis estadístico mostró diferencias significativas con relación a los tiempos de detección entre la novobiocina y los otros dos antibióticos. Sin embargo, en el análisis de la interacción entre antibiótico y logaritmo del recuento de esporas estas diferencias no fueron evidenciadas, excepto para la concentración entorno a 10 esporas/ml (**Tabla 6**). De igual modo, el análisis visual de las

curvas de respuesta de la capacitancia tampoco reflejó claras diferencias entre los antibióticos. Paralelamente al ensayo en Bactometer, las siembras de los productos en los tres medios de cultivo (SDA, SP/YE agar y PCA), preparados con los antibióticos a las concentraciones seleccionadas, evidenciaron inhibición del crecimiento bacteriano. Con relación a las colonias fúngicas no se observaron diferencias de crecimiento entre los medios con o sin antibiótico.

Aunque en general, los tres antibióticos fueron efectivos e incluso la novobiocina permitió menores TD, se seleccionó el cloranfenicol dada su alta resistencia térmica que representa una facilidad al momento de preparar el medio de cultivo (Beuchat y Cousin, 2002), mientras que para los otros dos antibióticos se hace necesaria la esterilización por filtración y la adición posterior al medio. Además, estos autores afirman que los antibióticos más recomendados para la preparación de medios de cultivo son el cloranfenicol y la gentamicina, no sólo por su alta estabilidad térmica sino también por su amplio espectro antibacteriano.

**Tabla 6.** Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas en medio SP/YE gelatina con diferentes antibióticos y en solución acuosa de cereales (media y desviación estándar).

Log esporas/ml	TD (horas)		
	Cloranfenicol (0,025%)	Estreptomina (0,005%)	Novobiocina (0,005%)
5,26 ± 0,12	6,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	5,33 ± 1,6 <sup>a</sup>	7,25 ± 1,06 <sup>a</sup>
4,26 ± 0,12	14,25 ± 3,18 <sup>a</sup>	14,17 ± 4,0 <sup>a</sup>	10,00 ± 0,50 <sup>a</sup>
3,26 ± 0,12	20,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	20,83 ± 3,55 <sup>a</sup>	14,67 ± 4,07 <sup>a</sup>
2,26 ± 0,12	28,75 ± 5,30 <sup>a</sup>	32,17 ± 4,54 <sup>a</sup>	23,83 ± 1,6 <sup>a</sup>
1,30 ± 0,00	43,75 ± 1,77 <sup>a</sup>	42,50 ± 2,18 <sup>a</sup>	36,17 ± 2,57 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup>: Letras diferentes en la misma fila corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

Finalmente, para comprobar la eficacia del cloranfenicol al 0,025% en los ensayos impedanciométricos realizados en muestras de productos deshidratados se realizó el estudio con las soluciones acuosas de los productos sin esterilizar. En los resultados obtenidos no se observaron aumentos en la señal de capacitancia, lo que indica la ausencia de contaminación fúngica en estos productos y la inhibición de la población bacteriana presente, teniendo en

cuenta que en la evaluación mediante la técnica de recuento en placa se apreció en las placas de SDA y PDA, una elevada contaminación bacteriana y la ausencia de crecimiento fúngico.

#### 2.2.5. Efecto de la temperatura de incubación

Los resultados demostraron una aceleración media en el tiempo de detección de aproximadamente 11 horas, cuando la incubación se realizó a 28°C. Sin embargo, se presentó una gran variabilidad en los tiempos de detección para algunas de las concentraciones de esporas evaluadas a esta temperatura (**Tabla 7**). Además, el análisis visual de las gráficas mostró superposición en las curvas debido a que no se mantenía la proporción según el factor de dilución, haciendo también más difícil su interpretación. Por estas razones se seleccionó la temperatura de 25°C para las siguientes actividades. Silley y Forsythe (1996), indican la importancia de mantener constante la temperatura de incubación en el Bactometer no sólo por las propiedades físicas y eléctricas sino también, por el efecto directo que ejerce la temperatura sobre el tiempo de generación de los microorganismos, lo cual pudo comprobarse por las diferencias observadas entre los tiempos de respuesta a estas dos temperaturas.

**Tabla 7.** Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas en medio de cultivo SP/YE gelatina a dos temperaturas de incubación (media y desviación estándar).

Log esporas/ml	TD (horas)	
	25°C	28°C
5,34 ± 0,11	16,17 ± 6,25	6,83 ± 1,89
4,34 ± 0,11	20,50 ± 4,77	11,67 ± 1,76
3,34 ± 0,11	27,17 ± 2,57	16,17 ± 5,01
2,34 ± 0,11	35,00 ± 4,36	23,50 ± 12,76
1,34 ± 0,11	51,33 ± 3,21	35,33 ± 20,01

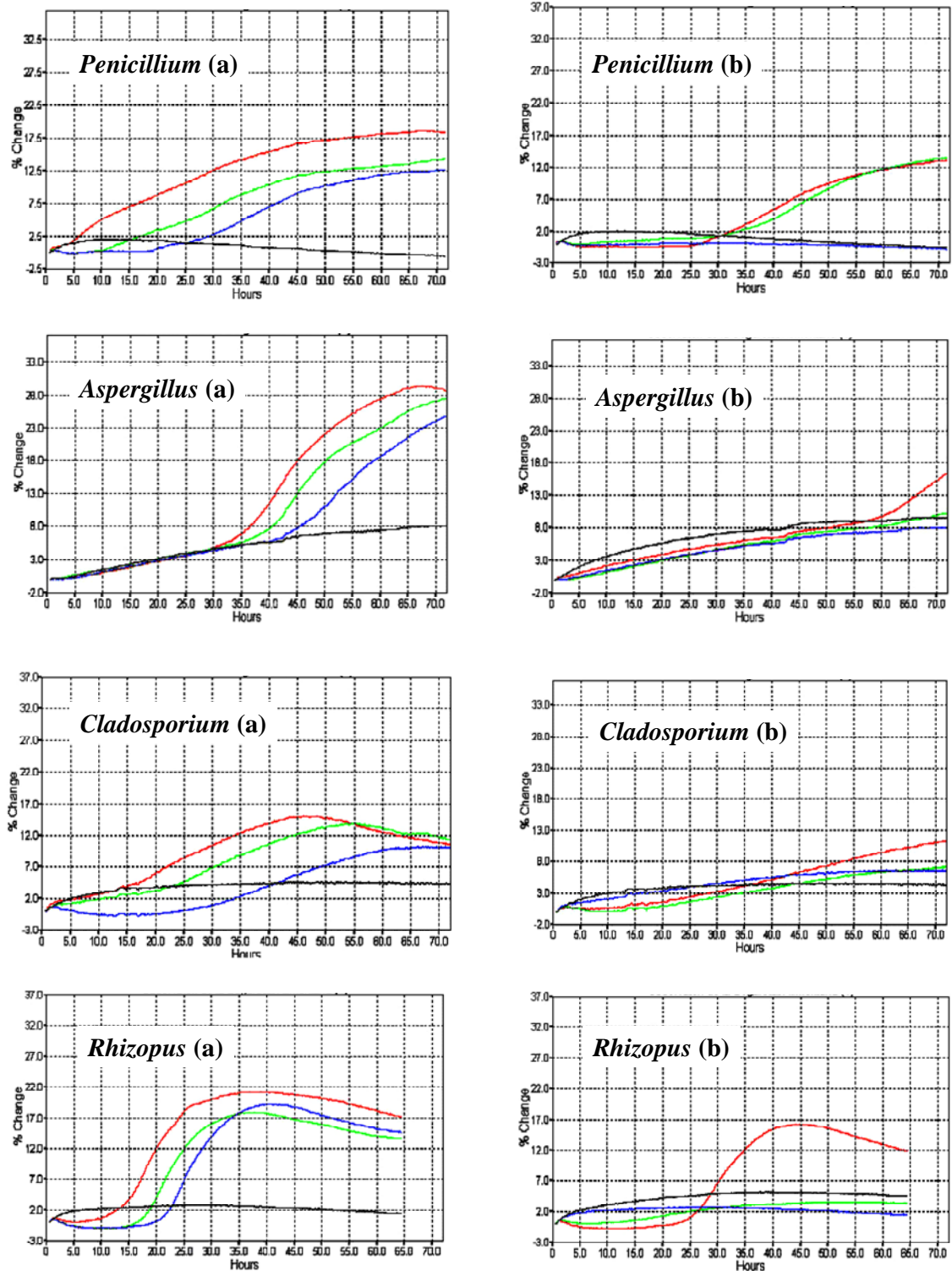
### 2.3. Validación de la efectividad del método impedanciométrico

#### 2.3.1. Validación con cultivos puros

Con las condiciones óptimas de trabajo, es decir una vez seleccionado el medio de cultivo SP/YE al 0,5% con 8% de gelatina, a pH 5,5 y con 0,025% de cloranfenicol, incubado a 25°C, se procedió a comprobar su efectividad con las cepas de los géneros fúngicos: *Penicillium*, *Rhizopus*, *Aspergillus* y *Cladosporium* en las cuatro matrices (leche, cacao y dos productos a base de cereales).

Los resultados mostraron un aumento de la señal de capacitancia para las cuatro cepas de los mohos, en las matrices ensayadas (**Figura 6**), apreciándose que los tiempos de detección determinados estaban directamente relacionados con el recuento de esporas/ml. Sin embargo, si bien fue posible obtener aumentos en la señal de capacitancia para las cuatro cepas fúngicas ensayadas, el porcentaje total de cambio obtenido con la cepa *Cladosporium* fue muy bajo, entorno al 15% cuando el recuento de esporas fue de  $10^5$ /ml.

**Figura 6.** Comparación en la respuesta de la capacitancia de las cepas de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Rhizopus* en medio de cultivo SP/YE gelatina. Recuento de esporas/ml en las figuras a): (-): $10^5$ ; (-): $10^4$ ; (-): $10^3$  y (-): control y en las figuras b): (-): $10^2$ ; (-):10; (-):1-9 y (-): control.



En la evaluación individual de cada una de las cepas ensayadas, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de detección en función del tipo de matriz (**Tablas 8-11**), por lo que se puede concluir que este medio es adecuado para evaluar la contaminación fúngica de productos alimenticios deshidratados elaborados a partir de diversas materias primas como leche, cacao, cereales y otros productos alimenticios.

Los diferentes géneros mostraron diferencias en su crecimiento y por lo tanto en los tiempos de detección obtenidos. Así, el género *Aspergillus*, mostró retrasos en los tiempos de detección para todas las matrices y en los diferentes recuentos (**Figura 6 y Tablas 9**). Por el contrario la cepa que mostró un menor tiempo de detección fue *Rhizopus* (**Tabla 11**). Esta característica, ya había sido referida para cepas de este género por Sawai y Yoshikawa (2003), quienes demostraron que mediante ensayos conductimétricos indirectos con *R. stolonifer*, era posible obtener respuestas a las 20 y 23 horas, para concentraciones de esporas de  $6 \times 10^4$  y  $6 \times 10^3$  /ml. Sin embargo, para el género *Aspergillus* en nuestro estudio se necesitó el doble del tiempo (**Tabla 9**), en comparación con lo observado por dichos autores para una cepa de *A. niger* (40 y 47 horas frente a 20–23 horas para concentraciones de esporas de  $6 \times 10^4$  y  $6 \times 10^3$  /ml, respectivamente). No obstante, cabe resaltar que cuando ellos emplearon la técnica directa para realizar el seguimiento de estas mismas cepas en cuatro medios de cultivo, no observaron cambios en la respuesta de conductividad, siendo inefectivo este método para evaluar el crecimiento fúngico.

**Tabla 8.** Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas de *Penicillium*, en medio SP/YE gelatina en soluciones acuosas de diferentes productos alimenticios (media y desviación estándar).

Log esporas/ml	TD (horas)			
	Cereales	Cacao	Leche	Cereales enriquecidos
5,94 ± 0,00	9,00	9,00	12,50	23,50
4,91 ± 0,04	14,50 ± 5,66	14,50 ± 5,66	13,50 ± 0,71	24,25 ± 2,47
3,94 ± 0,05	17,33 ± 10,12	17,33 ± 10,12	20,33 ± 2,57	29,67 ± 2,02
2,94 ± 0,05	30,67 ± 3,51	30,67 ± 3,51	27,17 ± 3,33	33,83 ± 2,57
1,94 ± 0,05	37,67 ± 3,21	37,67 ± 3,21	39,00 ± 4,36	42,17 ± 4,16
0,99 ± 0,02	51,00	51,00	41,00	54,00

III. Método de recuento impedanciométrico

**Tabla 9.** Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas de *Aspergillus*, en medio SP/YE gelatina en soluciones acuosas de diferentes productos alimenticios (media y desviación estándar).

Log esporas/ml	TD (horas)			
	Cereales	Cacao	Leche	Cereales enriquecidos
4,85 ± 0,15	35,00 ± 2,00	36,50 ± 2,18	36,67 ± 1,76	37,83 ± 1,53
3,85 ± 0,15	39,67 ± 0,76	41,17 ± 2,93	40,17 ± 1,89	41,33 ± 2,02
2,85 ± 0,15	46,50 ± 3,04	46,33 ± 3,62	47,33 ± 1,76	46,00 ± 2,78
1,85 ± 0,15	59,33 ± 2,25	56,50 ± 4,77	60,33 ± 4,73	57,67 ± 3,21
0,84 ± 0,16		63,25 ± 2,47		63,50

**Tabla 10.** Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas de *Cladosporium*, en medio SP/YE gelatina en soluciones acuosas de diferentes productos alimenticios (media y desviación estándar).

Log esporas/ml	TD (horas)			
	Cereales	Cacao	Leche	Cereales enriquecidos
6,04 ± 0,20	8,50 ± 2,12	9,05 ± 2,19	10,25 ± 3,89	9,00 ± 1,41
5,18 ± 0,27	14,00 ± 3,46	12,00 ± 0,87	15,50 ± 3,12	12,50 ± 2,78
4,18 ± 0,27	20,67 ± 3,79	16,67 ± 1,04	21,33 ± 1,89	19,00 ± 3,00
3,18 ± 0,27	28,33 ± 3,62	26,17 ± 3,69	28,17 ± 2,93	27,67 ± 1,61
2,18 ± 0,27	33,50 ± 3,04	34,83 ± 1,89	35,33 ± 3,75	37,83 ± 3,01
1,17 ± 0,32	50,50 ± 1,32	40,50 ± 2,12	44,50 ± 0,71	50,25 ± 8,84



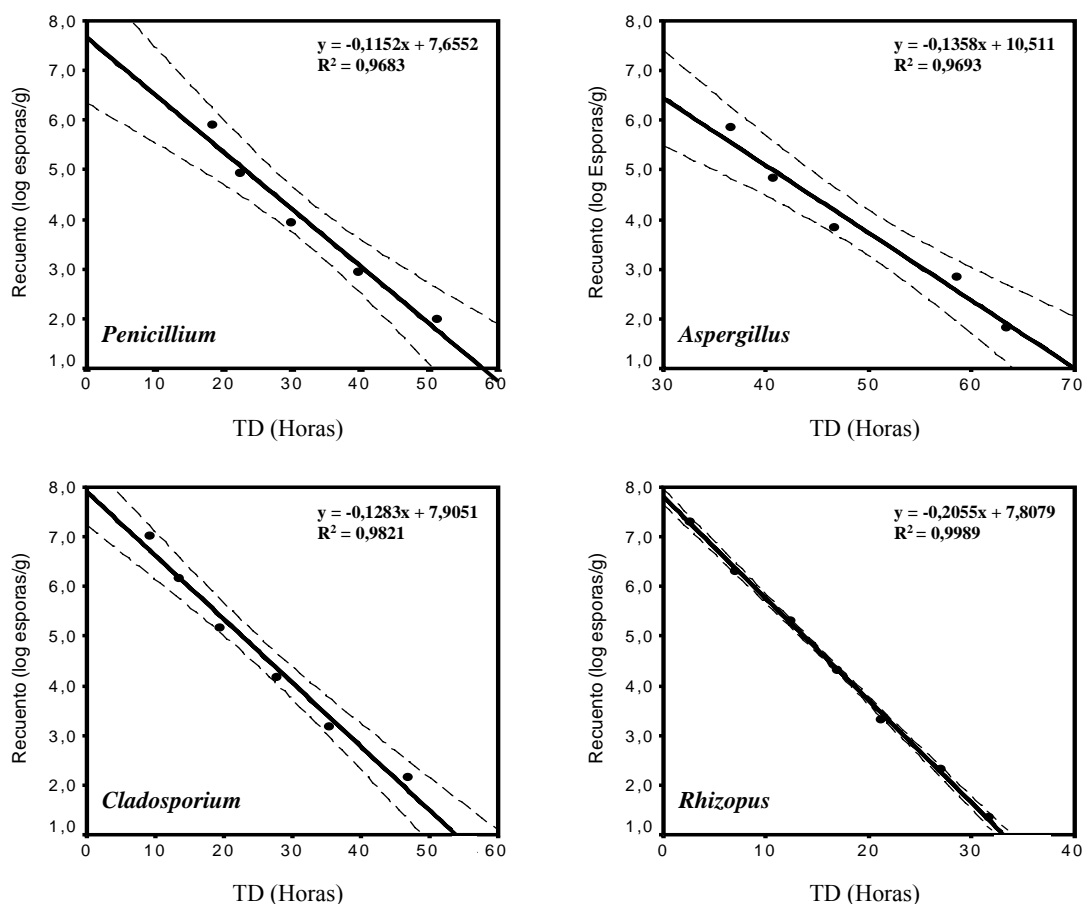
**Tabla 11.** Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas de *Rhizopus*, en medio SP/YE gelatina en soluciones acuosas de diferentes productos alimenticios (media y desviación estándar).

Log esporas/ml	TD (horas)			
	Cereales	Cacao	Leche	Cereales enriquecidos
6,32 ± 0,05	2,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,33 ± 0,58	2,00 ± 0,00
5,33 ± 0,05	6,57 ± 1,40	6,83 ± 1,44	8,83 ± 3,62	5,83 ± 0,76
4,33 ± 0,05	11,33 ± 1,26	11,73 ± 0,70	13,97 ± 2,70	12,17 ± 0,29
3,33 ± 0,05	15,83 ± 1,61	16,83 ± 0,76	18,43 ± 1,10	16,50 ± 0,00
2,33 ± 0,05	20,83 ± 0,76	20,17 ± 1,04	22,00 ± 0,87	21,33 ± 0,76
1,33 ± 0,05	26,83 ± 1,26	27,17 ± 3,75	28,00 ± 3,61	25,83 ± 1,04
0,35 ± 0,05	30,75 ± 1,06	32,00	32,00 ± 4,24	32,00

En la **Figura 7** se muestran las rectas de calibración obtenidas entre el recuento fúngico presente en las diferentes matrices (esporas/g de alimento) con las cepas ensayadas y el tiempo de detección, apreciándose un elevado coeficiente de determinación ( $R^2 > 0,97$ ) altamente significativo ( $P < 0,01$ ) entre estos dos parámetros. Por lo que el método, al menos en estas cuatro cepas, puede ser útil para evaluar la contaminación fúngica de estos alimentos.

Una consideración a realizar respecto al control del recuento fúngico por parte de la industria es que los recuentos máximos permitidos por la normativa para cereales de desayuno, galletas y preparados alimenticios para regímenes dietéticos o especiales está entre 100 y 300 ufc/g (Anónimo, 1976; 1982; 1987). Atendiendo a esta consideración y observando las rectas de calibración realizadas con los recuentos de esporas/g de alimento y el tiempo de detección del conjunto de matrices (al no observarse diferencias estadísticas entre ellas), podemos señalar que según nuestros resultados, para *Penicillium* tiempos de detección superiores a 45 y 49 horas serían indicativos de recuentos inferiores a 300 y 100 ufc/g, respectivamente. Para *Aspergillus* sería de 59 y 63 horas, para *Cladosporium* 43 y 46 horas y para *Rhizopus* 26 y 28 horas (**Figura 7**).

**Figura 7.** Rectas de calibración de las cepas de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Rhizopus* en medio de cultivo SP/YE gelatina.



### 2.3.2. Efecto de la incubación total o parcial en Bactometer

Para mejorar la eficiencia del trabajo de control de calidad de rutina en el laboratorio de alimentos y con la finalidad de reducir el tiempo de ocupación del equipo Bactometer y maximizar su aprovechamiento por parte de la industria, fundamentalmente teniendo en cuenta que como media se necesitan unas 45 horas de ocupación cuando los recuentos fúngicos son bajos, se decidió evaluar también el efecto de incubar previamente los módulos del Bactometer en estufa a 25°C por un tiempo de 15 horas y posteriormente, pasarlos al equipo para continuar la incubación y hacer el seguimiento de la señal de respuesta.

El análisis de la interacción entre el tiempo de detección y el logaritmo del recuento de esporas realizado sólo para los casos en que la respuesta impedanciométrica se presentó después de 15 horas de incubación, mostró que el tiempo de detección para *Penicillium*,

*Cladosporium* y *Rhizopus*, no se afectaba por el tipo de incubación. Lo contrario sucedió con *Aspergillus*, que mostró diferencias significativas según el tipo de incubación para todos los recuentos de esporas, excepto para recuentos alrededor de 10 esporas/ml, observándose disminuciones de aproximadamente cinco horas en el tiempo de respuesta cuando se incubaba en estufa (**Tabla 12**). Este recuento de esporas (entorno a 10 esporas/ml) se corresponde aproximadamente a  $10^2$  ufc/g por lo que los tiempos recomendados indicativos de recuentos inferiores a 300 y 100 ufc/g, para *Aspergillus* serían iguales a los descritos anteriormente.

**Tabla 12.** Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas de las cuatro cepas en soluciones acuosas de los diferentes productos alimenticios incubadas total o parcialmente en Bactometer (media y desviación estándar).

Cepa	Log esporas/ml	TD (horas)	
		Bactometer	Estufa
<i>Penicillium</i>	3,94 ± 0,05	22,33 ± 6,70	24,86 ± 4,47
	2,94 ± 0,05	29,83 ± 3,67	29,25 ± 4,15
	1,94 ± 0,05	39,50 ± 3,40	39,38 ± 4,01
	0,98 ± 0,03	51,10 ± 6,17	51,71 ± 7,71
<i>Aspergillus</i>	4,85 ± 0,15	36,50 ± 1,92 <sup>a</sup>	28,17 ± 3,11 <sup>b</sup>
	3,85 ± 0,15	40,58 ± 1,89 <sup>a</sup>	32,54 ± 3,54 <sup>b</sup>
	2,85 ± 0,15	46,54 ± 2,51 <sup>a</sup>	39,71 ± 3,70 <sup>b</sup>
	1,85 ± 0,15	58,46 ± 3,66 <sup>a</sup>	50,21 ± 7,41 <sup>b</sup>
	0,84 ± 0,14	63,33 ± 1,76	58,08 ± 11,06
<i>Cladosporium</i>	4,18 ± 0,27	19,42 ± 2,94	23,29 ± 3,29
	3,18 ± 0,27	27,58 ± 2,77	30,95 ± 3,24
	2,18 ± 0,27	35,38 ± 3,04	42,54 ± 7,12
	1,20 ± 0,30	46,89 ± 5,49	45,63 ± 3,12
<i>Rhizopus</i>	3,33 ± 0,05	16,90 ± 1,34	16,32 ± 1,23
	2,33 ± 0,05	21,08 ± 1,02	19,92 ± 1,00
	1,33 ± 0,05	26,96 ± 2,46	25,96 ± 1,89
	0,35 ± 0,05	31,58 ± 2,06	30,17 ± 2,25

<sup>a-b</sup>: Letras diferentes en la misma fila corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

### 2.3.3. Validación del método con alimentos artificialmente contaminados

En las muestras inoculadas con los 4 géneros fúngicos y tras su conservación a temperatura ambiente durante 15 días, se obtuvieron unas curvas de capacitancia que reflejaron incremento de la señal para todas las matrices evaluadas. Cuando el recuento de esporas estuvo entorno a  $10^6$ /ml o superior, la respuesta se obtuvo en menos de cinco horas pero en la mayoría de los casos, a estos recuentos, no fue posible detectar el tiempo de cambio automática ni visualmente, posiblemente por sobrepasar el umbral de detección del equipo. Sin embargo, cuando las concentraciones de esporas estuvieron entre  $10^1$  y  $10^5$ /ml presentaron un incremento de la respuesta de la capacitancia proporcional al recuento fúngico, con una buena calidad en las curvas.

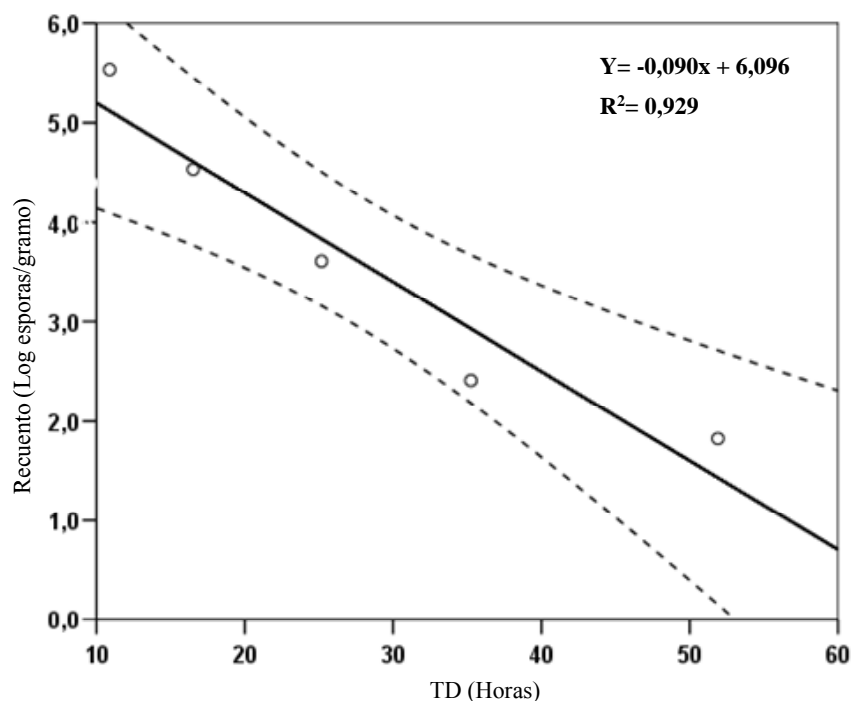
A partir de los resultados obtenidos se realizó la recta de calibración entre el recuento de esporas/gramo y el tiempo de detección del conjunto de matrices, obteniéndose un coeficiente de determinación elevado ( $R^2 > 0,92$ ) y altamente significativo ( $p < 0,001$ ). En función de estos resultados se apreció que tiempos de detección superiores a 40 y 45 horas serían indicativos de recuentos inferiores a 300 y 100 ufc/g, respectivamente, cuando en la muestra está presente más de un género fúngico (**Figura 8**).

En general, podría decirse que el tiempo requerido para que se presenten los cambios en la señal de capacitancia está determinado por el género fúngico que se establece mayoritariamente en el producto (Watson-Craik y col., 1989; Silley y Forsythe, 1996). Teniendo en cuenta estos tiempos (40 y 45 horas) y las rectas de calibración realizadas con cultivos puros, se puede decir que los géneros *Rhizopus* y *Aspergillus* no alcanzaron a establecerse en los alimentos, puesto que para *Rhizopus* los recuentos de 300 ufc/g, producen cambios de la señal de capacitancia en TD muy inferiores (26 horas), mientras que con el género *Aspergillus* los cambios para este mismo recuento se producen entorno a las 59 horas. Por el contrario, es posible pensar que los mohos que alcanzaron su mayor desarrollo después de realizar la contaminación artificial fueron *Penicillium* y/o *Cladosporium*, los cuales habían producido cambios en la capacitancia para este mismo recuento a las 45 y 43 horas, respectivamente, cuando fueron inoculados como cultivo puro.

Para confirmar que los cambios producidos en el tiempo de detección dependían del género que puede desarrollarse en el alimento, se realizó un estudio adicional en muestras de leche en polvo, a las que se les modificó el contenido de humedad y se mantuvieron durante 30 días a una temperatura ambiente, con el fin de favorecer el desarrollo de los hongos que pudieran

estar presentes naturalmente en las muestras. En la evaluación impedanciométrica se observó que los cambios en la señal de capacitancia se produjeron en un tiempo de  $71,0 \pm 1,0$  horas para recuentos de esporas de 200 ufc/g. Tras el aislamiento de la microbiota se determinó que el género contaminante presente pertenecía a *Aspergillus*, lo que confirma que el tiempo de detección obtenido en la evaluación del recuento fúngico mediante impedanciometría en este tipo de productos depende de la microbiota predominante. Es pues importante antes de establecer los límites críticos en el tiempo de detección, realizar experimentos previos para obtener la recta de calibración adaptada a la microbiota predominante del alimento. A pesar de este inconveniente, una vez el método se ha adaptado al tipo de producto a analizar, tiene la ventaja de reducir el tiempo necesario para realizar el recuento fúngico de 5-7 días obtenido con el método tradicional, a 26-70 horas (dependiendo del género fúngico predominante), especialmente cuando estos recuentos fúngicos son bajos. Lo que permite mejorar la eficiencia del trabajo de control de calidad de rutina en el laboratorio de alimentos, coincidiendo con lo observado por Ji-Cheng y col. (2003), en muestras de agua purificada.

**Figura 8.** Recta de calibración en medio de cultivo SP/YE gelatina, para alimentos artificialmente contaminados con *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* y *Aspergillus*.



Al igual que en el experimento anterior, se evaluó de forma paralela, el efecto de la incubación previa de los módulos del Bactometer en estufa a 25°C durante las primeras 15 horas, con las cuatro matrices. Aunque los resultados mostraron incrementos en la señal de capacitancia en todas las matrices, los tiempos de respuesta detectados automáticamente fueron cuestionables para todas las muestras. El análisis visual de las gráficas sólo permitió detectar el momento en el que se producían los cambios de la capacitancia para las menores concentraciones de esporas. Recuentos de  $10^4$  esporas/g o superiores, produjeron curvas muy difíciles de interpretar debido posiblemente a que los cambios ya se habían producido en las primeras 15 horas de incubación. A pesar de ello, se comprobó que el procedimiento de incubación previa en estufa permitía determinar recuentos de esporas inferiores al límite establecido en la norma microbiológica, puesto que el tiempo de detección medio para el recuento de esporas equivalente a  $10^2$  ufc/g fue de  $65,5 \pm 4,09$  horas. Sin embargo, para recuentos entre  $10^2$  y  $10^3$  esporas/g, en las muestras que contenían más de un género fúngico, se observó que el tiempo de respuesta si se afectaba según el tipo de incubación, con prolongaciones medias en el TD de 11 horas para las muestras parcialmente incubadas en estufa. Por lo que este procedimiento no es adecuado para optimizar el aprovechamiento del Bactometer puesto que no se reduce de manera efectiva el tiempo de ocupación del equipo (Tabla 13).

**Tabla 13.** Comparación del tiempo de detección (TD) con relación al recuento de esporas para alimentos artificialmente contaminados con *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium* y *Aspergillus* incubadas total o parcialmente en Bactometer (media y desviación estándar).

Log esporas/ml	TD (horas)	
	Bactometer	Estufa
$5,66 \pm 0,55$	$12,41 \pm 5,92$	< 15
$4,81 \pm 0,02$	$17,12 \pm 6,34$	< 15
$3,82 \pm 0,02$	$25,57 \pm 4,20$	$25,58 \pm 5,54$
2,83	$39,67 \pm 4,04$	$48,80 \pm 5,30$
1,83	$51,90 \pm 7,79$	$65,50 \pm 4,09$

## **CAPITULO IV**

---

### **IV. EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA DURANTE LAS ETAPAS DE PRODUCCIÓN Y COMERCIALIZACIÓN DE ALIMENTOS**

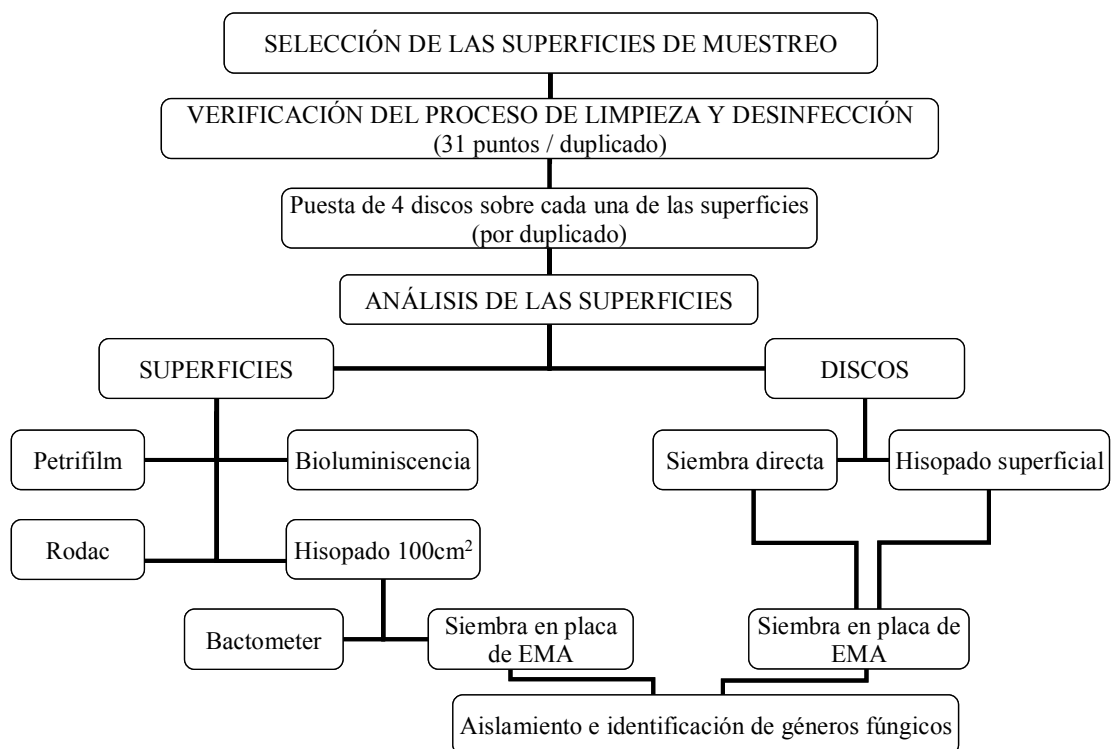
**EVALUACIÓN DURANTE LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS DESHIDRATADOS**

**1. MATERIAL Y MÉTODOS**

**1.1. Diseño experimental**

En la **Figura 9**, se muestra el diseño experimental para realizar inicialmente la selección de las superficies de trabajo más contaminadas, así como para la comparación de diferentes métodos de muestreo y análisis con el fin de verificar la eficacia del programa de higienización de una industria alimentaria en el control de la contaminación fúngica. Para la toma de muestras se realizaron tres visitas a la industria, una por semana, después de realizada la limpieza y desinfección y antes de iniciar la producción. Se tomaron muestras por duplicado de cada una de las superficies.

**Figura 9.** Diseño experimental del estudio para verificar la eficacia del programa de higienización en una industria de productos deshidratados.





## **1.2. Características de la industria de alimentos**

El control fúngico de las superficies se llevó a cabo en una industria alimentaria que elabora o envasa alimentos deshidratados.

## **1.3. Selección de las superficies de muestreo**

Con la finalidad de seleccionar los puntos o superficies de mayor contaminación fúngica que pudieran afectar directamente a la calidad de los alimentos debido a una contaminación cruzada, se evaluaron 98 superficies que la empresa tenía previamente identificadas como de posible riesgo. En la zona de producción 1 se muestrearon y analizaron 50 puntos, 42 puntos en la de producción nº2 y 6 puntos en la de producción nº 3.

El material de todas las superficies evaluadas era acero inoxidable, a excepción de 4 puntos que se correspondían a muros recubiertos con pintura plastificada, cuya función es actuar como basamento firme para un conjunto de máquinas.

Para la toma de muestras de las superficies se utilizaron placas Petrifilm™, hidratadas con 1ml de diluyente, posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 horas en bolsas autosellables, para finalmente almacenarlas durante al menos 4 horas en la nevera para permitir la gelificación del gel. La casa comercial recomienda realizar la hidratación con caldo Lethen (1% peptamina, 0,5% de extracto de carne, 0,07% de lecitina, 0,5% de Tween 80 y 0,05% de cloruro sódico), aunque puede usarse otro diluyente siempre que no contenga citratos o tiosulfatos. Debido a problemas de textura, por ruptura del gel formado en las placas hidratadas con este caldo, se probaron dos diluyentes más, seleccionando el caldo MRD (Maximum Recovery Diluent), compuesto por Tween 80 (3%), lecitina (0,3%), triptona (0,1%) y cloruro de sodio (0,85%), con el que se obtuvo, las mejores características de textura y uniformidad.

Se tomaron muestras por duplicado de cada una de las 98 superficies. Las placas se incubaron a 25°C y la revisión del crecimiento para el recuento fúngico se realizó hasta el día 7 de incubación.

Teniendo en cuenta los mayores recuentos fúngicos ( $> 10$  ufc/100 cm<sup>2</sup>), así como la importancia que representaban algunas superficies para el proceso por la posibilidad de

contaminaciones cruzadas, se seleccionaron 31 puntos distribuidos en las diferentes zonas de producción.

#### **1.4. Verificación del proceso de limpieza y desinfección**

Para la verificación de la limpieza y desinfección, se realizaron muestreos de las superficies en tres ocasiones diferentes, teniendo en cuenta que hubiesen transcurrido mínimo 48 horas después de efectuada la higienización, pero siempre antes de iniciar la producción. Una semana previa al muestreo se colocaron sobre cada una de las superficies seleccionadas, cuatro discos de acero inoxidable con acabado tipo AISI 304-2b, de 2 cm de diámetro, ligeramente convexos y con un grosor máximo de 1mm. Los discos fueron limpiados con un detergente (Dipol®, Dino, S.L., España) y desengrasados con 70% isopropanol (Panreac) de acuerdo con el protocolo descrito en la UNE-EN 13697 (Anónimo, 2002). Posteriormente se esterilizaron a 121°C durante 15 minutos. Los discos se dejaron adheridos en las superficies seleccionadas durante una semana, sometidos a condiciones normales de producción, limpieza y desinfección.

##### **1.4.1. Análisis de las superficies**

Con el fin de verificar el proceso de limpieza y desinfección, se emplearon diferentes procedimientos para evaluar el recuento fúngico en las superficies. Para ello, se procedió al muestreo con cada una de las técnicas de las superficies contiguas a los discos. Los discos fueron recuperados y llevados al laboratorio en placas de Petri estériles. El muestreo se realizó por duplicado para cada una de las superficies y con cada técnica. Las técnicas analíticas utilizadas fueron:

- Placas de contacto Petrifilm™.
- Placas de contacto Rodac: El medio de cultivo utilizado fue el agar rosa de bengala cloranfenicol (Biokar Diagnostics, Beauvais - Francia). Con la finalidad de controlar el tiempo y la presión de contacto ejercida en la toma de muestras se empleó un aplicador para placas de 55 mm de diámetro (Biocontact-99, Vinon Sur Verdon, Francia), que permite realizar dicho muestreo con una presión de 600 g y un tiempo de 10 segundos. Según la ISO 18593:2004 para obtener resultados óptimos en el muestreo de superficies

mediante placas de contacto, es necesario utilizar un tiempo de contacto de 10 segundos y una presión de al menos 500 g (Anónimo, 2004). La incubación de las placas se llevó a cabo a 25°C, realizando observaciones para el recuento fúngico desde el segundo al séptimo día.

- Hisopado de 100 cm<sup>2</sup>: Se utilizaron escobillones de algodón estériles (IASA, Barcelona, España), humedecidos con agua de peptona tamponada (bioMerieux). Cada superficie de 100 cm<sup>2</sup> se escobillonó en dos direcciones en un ángulo de 90° cada una. La posición del hisopo respecto a la superficie tenía una inclinación de aproximadamente 45° para ejercer el mismo grado de presión en toda el área. Según la norma ISO 18593:2004 el área de muestreo óptima para muestrear superficies es de 20 a 100 cm<sup>2</sup> (Anónimo, 2004). Tras el hisopado los escobillones se introdujeron en tubos con agua de peptona tamponada estéril y se homogenizaron con un agitador mecánico durante 60 segundos, siendo 30 segundos el tiempo mínimo recomendado por la norma ISO.

El recuento fúngico se llevo a cabo utilizando dos protocolos:

- 1) Recuento en placa: se realizó el método tradicional de siembra en placa con extracto de malta agar (EMA, Difco), incubando a 25°C durante 7 días. Se realizaron revisiones diarias para el recuento desde el segundo día.
  - 2) Técnica impedanciométrica: en cada pocillo de los módulos para Bactometer se adicionó 0,9 ml de medio de cultivo SP/YE gelatina y 0,1 ml de la suspensión en agua de peptona. La incubación en el Bactometer se realizó a una temperatura de 25°C y se evaluó la respuesta por un tiempo de 72 horas.
- Evaluación de la contaminación fúngica en los discos: Dos de los discos se sembraron directamente por inclusión en placas con EMA. A los otros dos discos se les realizó un hisopado superficial con escobillones previamente humedecidos en agua de peptona estéril, procediéndose de forma similar a lo que se realizó en el hisopado de 100 cm<sup>2</sup>. Todas las placas fueron incubadas a 25°C por 7 días, realizando observaciones para el recuento a partir del segundo día.
  - Técnica de bioluminiscencia: Se utilizaron hisopos CLEAN-TRACE Rapid Cleanliness Test UXL100 (Biotrace, Reino Unido), humedecidos con un agente catiónico, realizando el muestreo de un área de 100 cm<sup>2</sup>. La determinación del contenido en ATP se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando el luminómetro UNI-LITE Xcel

XCE V3.0A (Biotrace) para las mediciones. Los resultados se expresaron en URL (Unidades Relativas de Luz).

## **1.5. Aislamiento e identificación de los hongos**

### ***1.5.1. Identificación de géneros fúngicos***

Con el propósito de identificar hasta nivel de género los hongos predominantes en las superficies de la planta de producción, se separaron al azar dos placas de EMA con crecimiento fúngico, por cada uno de los puntos evaluados. La selección se realizó agrupando las colonias de acuerdo a sus características macroscópicas y posteriormente, se procedió a realizar la identificación hasta nivel de género según sus características macro y microscópicas (Barnett y col., 1972; Campbell y col., 1996; Koneman y col., 1999).

### ***1.5.2. Identificación de especies de *Aspergillus****

Todas las colonias correspondientes al género *Aspergillus* se identificaron hasta nivel de especie, para lo cual se sembraron nuevamente en placas de EMA y se incubaron a 25°C durante 7 días. Pasado este tiempo se prepararon suspensiones de esporas en un medio compuesto de 0,05% de Tween 80 y 0,2% de agar (Pitt y Hocking, 1997). A partir de las suspensiones de esporas se realizaron las siembras en placa, en cuatro medios de cultivo diferentes (Klich, 2002), y en tres puntos equidistantes inoculando 2 µl en cada uno de los puntos. Los medios de cultivo fueron: 1) Agar extracto de malta; 2) Agar Czapek extracto de levadura (CYA) preparado con K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0,1%, sacarosa al 3%, extracto de levadura al 0,5%, agar al 1,5% y solución de Czapek concentrado (NaNO<sub>3</sub> al 30%, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O al 5%, KCl al 5%, FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O al 0,1%, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O al 0,1% y CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O al 0,05%) al 1%; 3) Agar Czapek Dox Agar (CZ) preparado de forma similar al anterior pero sin extracto de levadura y 4) agar Czapek extracto de levadura con 20% de Sacarosa (CY20S).

Para cada aislamiento de *Aspergillus* se utilizó una placa por medio de cultivo excepto para el CYA que se sembraron dos placas. La incubación se realizó en oscuridad a 25°C. Adicionalmente se incubó una placa de CYA a 37°C. Finalmente se realizó la identificación de las diferentes especies utilizando las claves de Klich (2002) y Campbell y col. (1996).

### **1.6. Análisis estadístico**

Para la realización del estudio estadístico se utilizó el programa informático SPSS para Windows, versión 14.0. (SPSS Inc. 2005).

Todas las visitas para toma de muestras, tanto en la evaluación de la contaminación durante la producción como en la comercialización, se realizaron tres veces, tomando muestras por duplicado de cada una de las superficies y con cada una de las técnicas empleadas. Los resultados se evaluaron mediante análisis de la varianza utilizando el Modelo Lineal Generalizado (GLM) y el test de Tukey para comparación múltiple entre las medias con un nivel de significación  $p < 0,05$ .

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1. Selección de las superficies de muestreo

De las 98 superficies evaluadas con placas de Petrifilm, fueron seleccionados 31 superficies de trabajo por presentar mayores recuentos fúngicos ( $> 10$  ufc/100 cm<sup>2</sup>) o por su importancia en el proceso dada la posibilidad de contaminaciones cruzadas. Estos puntos estuvieron divididos en las tres zonas de producción: 16 superficies en la zona de producción 1, 13 puntos en la zona de producción 2 y 2 superficies en la zona de producción 3 (**Tabla 14**). Entre los 31 puntos seleccionados y concretamente en las zonas de producción de alimentos deshidratados, cabe destacar que los mayores recuentos fúngicos aparecieron en la superficie correspondiente a un basamento firme para máquinas, correspondiente a muros recubiertos con pintura plastificada. En las diferentes visitas realizadas se observó en estos puntos, una elevada condensación de agua, lo que podría explicar estos recuentos elevados. La condensación de agua es un factor primordial en la contaminación y crecimiento fúngico, así el Instituto de Medio Ambiente y Sostenibilidad de la Comisión Europea (Anónimo, 1993), señaló que en las superficies internas de las viviendas, la principal fuente de humedad para el crecimiento de hongos es la condensación superficial y describió que además de este tipo de condensación, las condensaciones intersticiales dentro de materiales de construcción porosos tales como el concreto, el ladrillo y el yeso, pueden proporcionar un depósito que permite el continuo crecimiento fúngico.

Respecto a la lectura de las placas de Petrifilm Levaduras y Mohos cabe mencionar algunos inconvenientes asociados a las características del medio. Estas placas contienen un indicador que se activa en presencia de un enzima, la fosfatasa, coloreando las colonias de azul. De igual manera, la presencia de células vivas (no microbianas) en algunos alimentos crudos o procesados, puede ocasionar esta reacción con dos tipos de cambio: un color azul uniforme del medio o puntos azules intensos (comúnmente observados en productos granulados). Para solucionar estos problemas, el fabricante recomienda realizar uno o varios de los siguientes procedimientos: diluir la muestra, inocular las placas sólo con sobrenadante, controlar la temperatura de incubación ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ ) y/o leer las placas tras un corto periodo de incubación (24-48 horas). Teniendo en cuenta que las placas habían sido utilizadas para tomar muestras de la superficie por contacto directo, sólo era posible controlar este fenómeno con una adecuada incubación y realizar los recuentos a partir de las 24 horas.

Al valorar las placas de Petrifilm después del primer muestreo en la industria, se observó que tras 24 horas de incubación, el 18% de las placas estaban ya totalmente coloreadas de azul y que además, presentaban las características descritas por el fabricante como típicas de colonias de mohos, por lo que fueron consideradas según las especificaciones, como recuento demasiado numeroso para ser contado (TNTC). Es por ello que tras la segunda visita se realizó un recuento previo a las 12 horas de incubación y posteriormente, se dejaron las placas a 25°C para realizar su seguimiento. Sin embargo, a las 12 horas no había recuentos fúngicos, aunque de nuevo a las 24 horas aparecían totalmente azules, mostrando además las características que obligaban a su expresión como TNTC. Estos problemas provocaron en muchos casos que los recuentos no fueran fiables, puesto que se hacía difícil establecer si el crecimiento equivalía realmente a una alta presencia de mohos en la superficie, o por el contrario correspondía al crecimiento de alguna especie fúngica con crecimiento expansivo. Este fenómeno ya ha sido descrito en otros medios de cultivo (Jarvis, 1973; Hocking y Pitt, 1980), haciendo referencia a la capacidad que tienen algunos géneros fúngicos de crecer abundantemente sobre determinados medios, estableciendo una competencia con otros mohos que por tener un crecimiento más lento son inhibidos o enmascarados, lo que ocasiona diferencias entre los recuentos realizados. El seguimiento de estas placas, permitió establecer que este fenómeno era común para todos los mohos invasivos (por ejemplo *Mucor* y *Rhizopus*), con el agravante de que en estos períodos cortos de incubación el moho alcanzaba su mayor crecimiento y se desbordaba de la placa, contaminando las demás con las que estaba en contacto.

Como una posible solución a estos inconvenientes, se decidió para las posteriores evaluaciones, llevar a cabo una valoración intermedia de las placas entre las 12 y las 24 horas y, entre las 24 y las 48 horas, con el fin de evitar recuentos TNTC. Si bien en la mayoría de los casos fue posible obtener un valor numérico para los recuentos, cabe destacar la necesidad de hacer un seguimiento continuo de las placas no sólo para evitar la descripción TNTC sino también, para evitar la contaminación de otras placas con posibles mohos invasivos.

**Tabla 14.** Recuento de hongos con placas Petrifilm™, en las superficies de muestreo seleccionadas (media  $\pm$  desviación estándar).

ZONA DE PROCESAMIENTO	SUPERFICIE	log ufc/100 cm <sup>2</sup>
Producción 1	1	2,11 $\pm$ 0,11
	2	0,55 $\pm$ 0,48
	3	1,37 $\pm$ 0,54
	4	0,52 $\pm$ 0,00
	5	1,56 $\pm$ 0,51
	6	1,22 $\pm$ 1,07
	7	1,33 $\pm$ 0,44
	8	0,45 $\pm$ 0,42
	9	1,53 $\pm$ 0,32
	10	1,46 $\pm$ 0,34
	11	1,92 $\pm$ 0,36
	12	1,67 $\pm$ 0,55
	13	1,38 $\pm$ 0,74
	14	0,69 $\pm$ 0,29
	15	1,38 $\pm$ 0,68
	16	1,72 $\pm$ 0,34
Producción 2	17	1,31 $\pm$ 0,74
	18	0,37 $\pm$ 0,65
	19	0,27 $\pm$ 0,48
	20	0,61 $\pm$ 0,53
	21	1,02 $\pm$ 0,61
	22	1,05 $\pm$ 0,73
	23	1,17 $\pm$ 0,44
	24	0,27 $\pm$ 0,48
	25	0,78 $\pm$ 0,24
	26	0,67 $\pm$ 0,75
	27	1,38 $\pm$ 0,46
	28	1,14 $\pm$ 0,49
	29	0,72 $\pm$ 0,17
Producción 3	30	0,58 $\pm$ 0,61
	31	0,65 $\pm$ 0,72

## 2.2. Verificación del proceso de limpieza y desinfección

El recuento de mohos y levaduras es considerado uno de los indicadores importantes de buena higienización durante la manipulación, el procesamiento y las prácticas de almacenamiento en la elaboración de productos a base de cereales (Deibel y Swanson, 2002). Por esta razón y con el fin de conocer el número de hongos presentes en las superficies de la



planta de procesamiento, se evaluaron los recuentos obtenidos con las técnicas de impronta utilizando placas Petrifilm y Rodac, de hisopado de 100 cm<sup>2</sup> (recuento fúngico por siembra en placas de agar), de siembra directa del disco en las placas de agar e hisopado superficial del disco.

### 2.2.1. Establecimiento de límites críticos en el recuento fúngico

Sabiendo que no existe un método universal que permita satisfacer todos los requerimientos para el recuento de mohos; considerando además que la elección del método debe relacionarse con las circunstancias de cada caso particular (Jarvis y col., 1983) y teniendo en cuenta la variación en la recuperación fúngica obtenida con cada técnica de muestreo, así como las ventajas e inconvenientes que puede ofrecer cada metodología, se decidió establecer límites críticos de contaminación fijando un valor máximo de hongos permitidos para cada técnica particular (log ufc/100cm<sup>2</sup>). Para establecer estos límites, se tuvo en cuenta la media de todos los puntos muestreados en los diferentes días de evaluación y se estableció como límite crítico el valor superior del intervalo de confianza al 95% (**Tabla 15**).

No obstante y debido a que todos estos métodos requieren varios días para dar resultados de la contaminación, es decir, que no permiten la corrección inmediata del problema para prevenir un daño potencial del producto (Holah y col., 1989; Latge, 1999), se decidió establecer también un nivel objetivo por debajo del límite crítico, ofreciendo así un margen de contaminación antes de alcanzar el valor crítico, de esta manera se permite evaluar el comportamiento de la contaminación de las superficies y tomar medidas correctoras antes de alcanzar valores de rechazo. Este nivel objetivo corresponde al valor inferior del intervalo de confianza al 95% (**Tabla 15**).

**Tabla 15.** Límites críticos y niveles objetivos de la contaminación fúngica establecidos para cada técnica de muestreo (valores por 100cm<sup>2</sup>).

TÉCNICA	NIVEL OBJETIVO		LÍMITE CRÍTICO	
	log ufc	Equivalente ufc	log ufc	Equivalente ufc
Petrifilm	<b>1,02</b>	10,5	<b>1,22</b>	16,5
Rodac	<b>1,01</b>	10,3	<b>1,25</b>	17,8
Disco siembra directa	<b>1,33</b>	21,5	<b>1,60</b>	40
Hisopado disco	<b>0,59</b>	3,9	<b>0,93</b>	8,5
Hisopado 100 cm <sup>2</sup>	<b>0,74</b>	5,5	<b>0,96</b>	9,2

Como puede observarse en la **Tabla 15**, la presencia de hongos a nivel general antes de empezar el proceso de elaboración es muy baja, indicando posiblemente que el proceso de limpieza y desinfección realizado en esta empresa es adecuado para disminuir la contaminación fúngica. No obstante, considerando que los límites críticos son establecidos con datos de los recuentos obtenidos durante el seguimiento efectuado a la empresa, puede decirse que valores superiores al nivel objetivo serían indicativos de fallos en el proceso de higienización, aunque el número de ufc se encuentre en niveles muy bajos. De hecho, los valores propuestos por otros autores son muy superiores a los establecidos en este estudio. Así, Houhala y col. (1996), recomiendan para evaluar el grado de higienización de superficies, un nivel objetivo de 60 ufc/100cm<sup>2</sup> y un límite crítico de 160 ufc/100cm<sup>2</sup>, establecidos mediante métodos de impronta. Sin embargo, es necesario considerar que algunos de los productos elaborados en esta empresa podrían estar destinados a una población muy susceptible. Jarvis y col. (1983), señalaron que fijar un requisito a cumplir respecto al número de mohos, es un procedimiento que se usa con frecuencia para tener un valor cuantitativo que proporcione un sentimiento de seguridad y simplifique la toma de decisiones durante el proceso.

A pesar de los bajos recuentos determinados, es posible que éstos se encuentren infraestimados, ya que se ha descrito que existe un gran número de esporas transportadas por el aire que no crecen en los medios de cultivo ni pueden identificarse visualmente con los métodos tradicionales (Anónimo, 1993). Reij y Den Aantrekker (2004), especificaron que en los ambientes secos de las plantas de elaboración de productos como leche en polvo, chocolate o sopas deshidratadas, los niveles de microorganismos pueden permanecer bajos. Sin embargo, en los ambientes húmedos o después de un procedimiento de limpieza húmeda, los patógenos pueden incluso multiplicarse hasta altos niveles. También es importante considerar que varias de las especies de mohos que son contaminantes comunes de los cereales, pueden producir micotoxinas, lo cual representa un riesgo potencial para la salud de los consumidores (Deibel y Swanson, 2002), especialmente considerando que estas micotoxinas pueden estar presentes tanto en esporas viables como no viables (Jarvis, 2002). Así, en ambientes cerrados, como el interior de las casas y los edificios, se ha indicado que los propágulos viables pueden solo comprender el 1-2% del número total de propágulos (Anónimo, 1993). Sumado a esto, se encuentra el hecho de que todas las técnicas de muestreo utilizadas en este experimento se basan en el recuento de partes viables de los mohos

(esporas o micelio), con lo que bajos recuentos de hongos no garantizan que el producto sea seguro (De Ruiter y col., 1993; Gourama y Bullerman, 1995).

### **2.3. Valoración de la contaminación fúngica en las superficies**

#### **2.3.1. En función del día de visita**

En los recuentos fúngicos obtenidos, independientemente de la técnica de muestreo y análisis utilizada, se apreció una elevada variabilidad que puede deberse a diferentes causas. Por una parte, se debe considerar que en el ambiente industrial los microorganismos se encuentran distribuidos de forma irregular por lo que existe una gran variación en la densidad celular y la composición de las poblaciones microbianas, a través del espacio y el tiempo (Maukonen y col., 2003). Además, se ha descrito que la precisión y la repetibilidad de las metodologías usadas para la toma de muestras desde las superficies, se encuentran muy influenciadas por las habilidades manuales de los operarios y por las técnicas de recuperación utilizadas (Foschino y col., 2003a). Con relación a la metodología de recuento fúngico esta puede verse afectada por diversos factores analíticos así, Jarvis y col. (1983), describieron la posibilidad de encontrar grandes diferencias en los recuentos de hongos para las réplicas de una misma muestra, atribuidas en parte a la presencia de estructuras de esporulación que pueden desintegrarse liberando un gran número de esporas o conidias, con lo que el recuento de propágulos en determinadas muestras, sería una consecuencia de la desintegración de dichas estructuras. Finalmente, una cuantificación fiable de la adherencia microbiana a superficies inertes así como la eficacia de la recuperación por tratamientos físicos, es difícil debido al extremo pleomorfismo del mecanismo de adhesión. El recuento en placa de las células adheridas, presenta en general una gran variación, particularmente cuando el nivel de contaminación inicial es bajo (Foschino y col., 2003b).

A pesar de la gran variabilidad observada, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en la contaminación fúngica en función del día de visita con ninguna de las técnicas de muestreo, a excepción de la técnica Petrifilm, en la que se obtuvo un menor recuento fúngico en la segunda visita, no obstante, estas diferencias pueden estar asociadas a los inconvenientes anteriormente descritos (**Tabla 16**).

**Tabla 16.** Contaminación fúngica determinada en las tres visitas en función de la técnica de muestreo utilizada (media log ufc/100cm<sup>2</sup> ± desviación estándar).

VISITA	Petrifilm	Rodac	Disco en agar	Hisopado del disco	Hisopado 100 cm <sup>2</sup>
1	1,28± 0,64 <sup>a</sup>	1,23±0,78 <sup>a</sup>	1,52±0,85 <sup>a</sup>	0,52±1,13 <sup>a</sup>	0,91±0,88 <sup>a</sup>
2	0,97±0,73 <sup>b</sup>	1,25±0,84 <sup>a</sup>	1,56±0,98 <sup>a</sup>	0,85±1,10 <sup>a</sup>	0,92±0,75 <sup>a</sup>
3	1,11±0,69 <sup>ab</sup>	0,91±0,83 <sup>a</sup>	1,30±0,97 <sup>a</sup>	0,92±1,25 <sup>a</sup>	0,72±0,71 <sup>a</sup>

<sup>a-b</sup>: Letras diferentes en la misma columna corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).

### 2.3.2. En función de la técnica de muestreo

En la evaluación global de la contaminación fúngica la mayor recuperación de la micobiota se obtuvo con la técnica del disco sembrado directamente en agar. La menor recuperación se determinó con las técnicas de hisopado (entre un 50-60% respecto al disco sembrado directamente), y una recuperación intermedia se consiguió cuando se aplicaron las técnicas de impronta (aproximadamente un 78%).

Las diferencias encontradas entre las técnicas de hisopado e impronta, coinciden en parte con los resultados de Foschino y col. (2003a), que evaluando la efectividad de las técnicas de placas Rodac e hisopado, para la recuperación de esporas de *A. niger* a partir de superficies de acero inoxidable con diferente acabado, observaron una mayor recuperación con el método Rodac (60%), que con el de hisopado (26%). En el caso de método de Rodac, estos autores no aplicaron presión sobre las superficies. Igualmente otros autores han descrito una mayor recuperación con la técnica de Rodac en células y esporas bacterianas, especialmente cuando los recuentos son bajos (Bredholt y col., 1999; Moore y col., 2001; Moore y Griffith, 2002b).

Holah y col. (1998), describieron que dentro de los ambientes de proceso de los alimentos, los microorganismos se adhieren a las superficies de diversas maneras relacionadas básicamente con el tiempo, la temperatura y la disponibilidad del agua. Davidson y col. (1999), describieron que el límite de detección mínimo para la técnica del hisopado, esta influenciado por varios factores que incluyen el estado de las superficies al momento de la toma de muestras (húmedas o secas), el microorganismo evaluado y el método de cultivo utilizado. Probablemente, en este estudio el medio de cultivo no tuvo influencia en la

recuperación fúngica, ya que el EMA fue el medio utilizado tanto en la siembra directa del disco como en las de hisopado, lo que además demuestra que el EMA es un medio relativamente rico que permite el crecimiento de un amplio rango de hongos (Anónimo, 1993). Una consideración adicional se refiere al efecto estresante implícito del proceso de hisopado sobre los microorganismos (Holah y col., 1998; Moore y Griffith, 2002b), de forma que puede disminuirse su detección en placa especialmente cuando están sometidos a efectos inhibidores como los desinfectantes (Moore y Griffith, 2002a; Martyny y col., 2005).

Tomando como base los límites críticos establecidos con cada técnica en particular, se realizó la valoración global del porcentaje de puntos rechazados (**Tabla 17**). Se determinó que la técnica de siembra directa del disco, fue la que rechazó el mayor porcentaje de superficies. Del total de puntos aceptados con esta misma metodología, un 9,68% de las superficies se encontraron en el nivel objetivo lo cual sería indicativo de la necesidad de llevar a cabo la rutina de limpieza y desinfección de forma más cuidadosa, para evitar así que en períodos cortos el porcentaje de puntos rechazados pase de 51,61 a 61,29%. Contrariamente, las técnicas que rechazaron el menor porcentaje de superficies fueron el hisopado de 100 cm<sup>2</sup> e hisopado del disco.

**Tabla 17.** Recuento fúngico y porcentaje global de superficies rechazadas de acuerdo a los valores establecidos como límite crítico para cada una de las técnicas de muestreo empleadas (media ± desviación estándar).

TÉCNICA	Superficies aceptadas	Superficies rechazadas	log ufc/100 cm <sup>2</sup>
Petrifilm	61,29%	38,71%	1,12± 0,70 <sup>a</sup>
Rodac	54,84%	45,16%	1,13±0,83 <sup>a</sup>
Disco siembra directa	48,39%	51,61%	1,46±0,94 <sup>b</sup>
Hisopado del disco	67,74%	32,26%	0,76±1,17 <sup>c</sup>
Hisopado de 100 cm <sup>2</sup>	67,74%	32,26%	0,85 ±0,78 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup>: Letras diferentes corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05).

De acuerdo a las diferencias encontradas entre los dos procedimientos de toma de muestra realizados sobre los discos (siembra directa e hisopado superficial), en relación al porcentaje de superficies rechazadas y, sabiendo que su selección para cada técnica de muestreo fue

totalmente al azar, podrían contemplarse dos argumentos para explicar dichas discrepancias. El primero hace referencia al beneficio que sobre el desarrollo de los hongos, ejerce el pegamento empleado para adherir los discos a las superficies, ya que actuaría no sólo como adhesivo sino también, ofrecería una barrera de protección sobre los detergentes y desinfectantes utilizados dentro del programa de higienización. Respecto a este punto, cabe decir que en la visualización de las placas para el recuento fúngico se observó el crecimiento de hongos a partir de dicho pegamento. En segundo lugar, podría decirse que la técnica de hisopado no es adecuada para retirar el total de microorganismos que se adhieren sobre una superficie, lo cual puede corroborarse también con el hecho de que no existen diferencias entre las dos técnicas de hisopado (hisopado de disco e hisopado de 100 cm<sup>2</sup>).

Si bien cuando se realizó la comparación de los recuentos fúngicos no se apreciaron diferencias estadísticas entre las técnicas de impronta, cuando se determinó el porcentaje de superficies aceptables/rechazables, se observó que el número de superficies rechazadas era superior con la técnica de Rodac (**Tabla 17**). Una posible explicación es que la efectividad de los métodos de impronta depende de la tensión superficial, del contacto entre el medio y la superficie a evaluar (Jarvis y col., 1983).

### **2.3.3. En función de la zona de producción**

La **Tabla 18** muestra los resultados obtenidos en función de la zona de producción y las técnicas de análisis utilizadas. En la comparación de la contaminación fúngica entre las tres zonas de producción con cada técnica de muestreo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos zonas de producción 1 y 2, mientras que los recuentos en la zona de producción 3 (zona de envasado de producto) fueron significativamente superiores con tres de las cinco metodologías utilizadas.

La recuperación obtenida de la microbiota presente con cada técnica de muestreo varió en función de la zona. En la zona de producción 3 no se apreciaron diferencias en función de la técnica de muestreo, mientras que en las de producción 1 y 2 de características muy similares, la técnica que mostró una mayor recuperación de la microbiota fue la del disco sembrado directamente en agar. Para la zona de producción 2 tampoco se apreciaron diferencias entre las otras cuatro técnicas, mientras que en la zona de producción 1 se obtuvieron diferencias entre las técnicas de impronta e hisopado, con una menor recuperación

#### IV. Contaminación durante la producción

con las técnicas de hisopado y una recuperación intermedia con las técnicas de impronta. En el caso de la zona de producción 3 es posible que no se haya detectado diferencias estadísticas entre las diferentes técnicas debido a que el número de superficies muestreadas fue muy reducido ( $n=12$ ), mientras que en las otras dos zonas, el número de superficies totales muestreadas fue 96 y 78, respectivamente.

**Tabla 18.** Comparación de la recuperación fúngica obtenida con diferentes técnicas de muestreo, a partir de las superficies de cada zona de elaboración (media log ufc/100cm<sup>2</sup> ± desviación estándar).

TÉCNICA	Producción 1	Producción 2	Producción 3
Petrifilm	1,15 ± 0,73 <sup>b A</sup>	0,99 ± 0,63 <sup>b A</sup>	1,74 ± 0,52 <sup>a B</sup>
Rodac	1,11 ± 0,82 <sup>b A</sup>	1,05 ± 0,77 <sup>b A</sup>	1,89 ± 0,92 <sup>a B</sup>
Disco siembra directa	1,42 ± 0,89 <sup>a A</sup>	1,46 ± 1,00 <sup>a A</sup>	1,87 ± 0,92 <sup>a A</sup>
Hisopado del disco	0,70 ± 1,17 <sup>c A</sup>	0,75 ± 1,17 <sup>b A</sup>	1,31 ± 1,20 <sup>a A</sup>
Hisopado de 100 cm <sup>2</sup>	0,85 ± 0,82 <sup>c A</sup>	0,72 ± 0,73 <sup>b A</sup>	1,66 ± 0,27 <sup>a B</sup>

<sup>a-c</sup>: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias estadísticas entre las técnicas para cada zona de producción ( $p<0,05$ ).

<sup>A-B</sup>: Letras diferentes en la misma fila indican diferencias estadísticas entre zonas de producción ( $p<0,05$ ).

Cuando se realizó la valoración de la contaminación fúngica en función de los límites descritos anteriormente para cada zona de producción se observó igualmente que la zona más contaminada era la de envasado (Zona de producción 3). Sin embargo, entre las dos zonas de producción 1 y 2, se apreció un menor porcentaje de puntos rechazados para la zona 2 con la mayoría de técnicas de muestreo (**Tabla 19**). Esto puede deberse a que en este sector las instalaciones son nuevas y se encuentran aisladas del tránsito de empleados. Según Hocking (1997), el control estricto del acceso a las instalaciones así como en el vestuario, permiten mantener más bajos los niveles de esporas fúngicas.

**Tabla 19.** Porcentajes de superficies que se rechazan de acuerdo a las zonas de elaboración, por cada técnica de muestreo.

<b>TÉCNICA</b>	<b>Producción 1</b>	<b>Producción 2</b>	<b>Producción 3</b>
Petrifilm	37,5%	30,77%	100%
Rodac	43,75%	38,46%	100%
Disco siembra directa	56,25%	30,77%	100%
Hisopado del disco	25%	15,39%	100%
Hisopado de 100 cm <sup>2</sup>	37,5%	38,46%	100%

Jarvis y col. (1983), señalaron que reducir el número de esporas fúngicas es fundamental para evitar contaminaciones de los productos y pérdidas durante la producción, el almacenamiento y la distribución de los alimentos puesto que si bien, la mayoría de las pérdidas por este tipo de contaminación se producen en la despensa del consumidor, la alteración de los ingredientes y los productos durante la elaboración también es común.

Para el caso concreto de la leche en polvo, Richter y Vedamuthu (2002), indicaron que el número y el tipo de microbiota encontrado, puede reflejar la calidad de la leche utilizada o indicar contaminación de los equipos o el medio ambiente durante, o después de su elaboración. Considerando esta afirmación y teniendo en cuenta que uno de los dos puntos evaluados en esta zona, entra en contacto directo con el producto y que éste, puede estar dirigido a lactantes y niños de corta edad, se hace necesario entonces replantear el procedimiento de limpieza y desinfección realizado en esta zona, puesto que el medio actual más eficaz para limitar el crecimiento de los microorganismos es una buena higiene en la producción, un funcionamiento razonable de la línea del proceso y un uso bien diseñado de biocidas y desinfectantes (Maukonen y col., 2003). No obstante, sería adecuado también tomar precauciones respecto a la posible contaminación de los componentes de la materia prima, debido a su reconocimiento como fuente importante de contaminación (Holah, 1995b; Duran y Marshall, 2002; Reij y Den Aantrekker, 2004).

#### **2.3.4. En función del área de tratamiento**

Con el propósito de realizar un seguimiento de la contaminación a lo largo de la línea de elaboración, se dividieron las zonas de producción 1 y 2 de características similares en tres



#### IV. Contaminación durante la producción

áreas: pre-tratamiento, tratamiento (equivalente al secado) y post-tratamiento. La zona de producción 3 (de envasado) no se incluyó en el análisis puesto que en esta planta sólo se lleva a cabo el envasado de la misma. Teniendo en cuenta que los resultados de la contaminación fúngica total no habían mostrado diferencias estadísticas entre las dos zonas (**Tabla 18**), se realizó conjuntamente el análisis estadístico.

Los resultados demostraron en general la menor contaminación en el área de tratamiento, lo que puede justificarse por la alta temperatura a la que se encuentran los cilindros de desecación (entre 140 y 150°C). Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas para los recuentos obtenidos entre esta zona y la de pre-tratamiento (**Tabla 20**). El área que presentó la mayor contaminación con cada una de las técnicas de muestreo fue la de post-tratamiento, siendo estadísticamente diferente de las otras.

**Tabla 20.** Recuentos de hongos obtenidos de las superficies a lo largo de la línea de elaboración, con diferentes técnicas de muestreo (media log ufc/100cm<sup>2</sup> ± desviación estándar).

<b>TÉCNICA</b>	<b>Pre-tratamiento</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Post-tratamiento</b>
Petrifilm	0,99 ± 0,73 <sup>a</sup>	0,85 ± 0,69 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,50 <sup>b</sup>
Rodac	1,10 ± 0,83 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,77 <sup>a</sup>	1,42 ± 0,70 <sup>b</sup>
Disco siembra directa	1,05 ± 0,94 <sup>a</sup>	1,17 ± 0,88 <sup>a</sup>	2,01 ± 0,73 <sup>b</sup>
Hisopado del disco	0,51 ± 0,98 <sup>a</sup>	0,55 ± 1,08 <sup>a</sup>	1,09 ± 1,29 <sup>b</sup>
Hisopado de 100 cm <sup>2</sup>	0,66 ± 0,75 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,76 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,74 <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup>: Letras diferentes en la misma fila corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

Deibel y Swanson (2002), indican que factores como una inadecuada higiene de la maquinaria a través de todo el proceso de elaboración de cereales, pueden ocasionar contaminaciones del producto final. Ellos describen además, que las mayores reducciones del nivel de microorganismos se producen durante el tratamiento térmico aplicado al producto húmedo, lo que indicaría un comportamiento similar al observado en este estudio, para la contaminación fúngica de las superficies. De igual manera, explican los riesgos de contaminaciones post-tratamiento que se presentan como consecuencia de las operaciones de enriquecimiento de los cereales. Recontaminaciones de productos alimenticios a través de

superficies contaminadas con bacterias han sido descritas por otros autores (Reij y Den Aantrekker, 2004).

Aplicando los límites críticos en las áreas de tratamiento para las zonas de producción 1 y 2 (**Tabla 21**), se confirmó que existe un riesgo de recontaminación del producto a partir de las superficies, puesto que en general en las áreas de pre-secado y secado los porcentajes de puntos rechazados fueron bajos con todas las técnicas de muestreo, mientras que en el área de post-tratamiento estos porcentajes variaron entre 50 y 100%. Foschino y col. (2003a), indicaron que las esporas pueden adherirse a las superficies y por lo tanto, ser una fuente de contaminación para los materiales que entran en contacto con ellas. Además, se ha descrito que la manipulación de elevadas cantidades de ingredientes secos, puede aumentar el recuento de mohos en la atmósfera ocasionando una reducción en la vida útil de los productos tratados por calor, que se han enfriado en esta atmósfera (Jarvis y col., 1983).

**Tabla 21.** Porcentajes de superficies que se rechazan por áreas de tratamiento (presecado, secado y post-secado), evaluando en conjunto las zonas de producción 1 y 2.

<b>TÉCNICA</b>	<b>Pre-tratamiento</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Post-tratamiento</b>
Petrifilm	0%	15,39%	80%
Rodac	33,3%	23,08%	70%
Disco siembra directa	16,67%	23,08%	100%
Hisopado del disco	16,67%	15,39%	50%
Hisopado de 100 cm <sup>2</sup>	16,67%	7,69%	60%

Atendiendo a la capacidad de recuperación de cada técnica de muestreo y teniendo en cuenta además su carácter restrictivo en la calificación de una superficie como aceptable, se podría recomendar la utilización de la técnica de siembra directa del disco dejándolo adherido a la superficie durante una semana, como sistema de verificación de la limpieza y desinfección con una periodicidad semestral y la técnica de placa de contacto tipo Rodac para las evaluaciones de rutina.

#### **2.4. Recuento fúngico por impedancia directa**

En la comparación de los resultados obtenidos en los dos protocolos de recuento fúngico (método tradicional e impedancia directa) para las muestras que se tomaron con el hisopado

de 100 cm<sup>2</sup>, se observó que en las placas de EMA en las que no hubo crecimiento fúngico tampoco se presentó respuesta en la señal de capacitancia durante las 72 horas de incubación, es decir que en ningún caso hubo falsos positivos. En relación a los falsos negativos, se observó que los componentes del medio de cultivo utilizado en el experimento (SP/YE gelatina – cloranfenicol), no afectaron los cambios electroquímicos del medio, puesto que en ningún caso se evidenció crecimiento fúngico dentro de los pocillos, sin un cambio consecuente en las curvas de capacitancia (Firstenberg-Eden, 1985; Watson-Craik y col., 1989).

Cabe destacar que en relación a la detección mediante impedanciometría de la contaminación fúngica se observó un incremento en el porcentaje de muestras con resultado positivo a medida que aumentó el recuento fúngico (**Tabla 22**). Para recuentos de hongos entre 1 y 9 ufc/100cm<sup>2</sup>, solamente se registraron cambios de impedancia para el 6,25% de los casos, mientras que recuentos superiores a 300 ufc/100cm<sup>2</sup> dieron respuesta positiva en el 100% de los casos. Estos resultados confirman que mayores recuentos de esporas, creciendo en condiciones definidas, necesitan un menor tiempo para alcanzar el umbral de detección del equipo y producir los cambios en la señal de capacitancia (Silley y Forsythe, 1996).

Los TD variaron entre las 22,5 y las 44 horas, pero no fueron proporcionales al número de ufc/100cm<sup>2</sup>. Considerando que el medio de cultivo fue igual en todos los casos y que la temperatura de incubación fue siempre constante, podría decirse que estas variaciones en los tiempos de respuesta se deben a la diferencia de géneros fúngicos presentes en las muestras como ya se observó en el estudio de puesta a punto del método impedanciométrico.

**Tabla 22.** Relación de los resultados obtenidos con los dos protocolos de análisis fúngico (método tradicional e impedancia directa) en las muestras de hisopado de 100 cm<sup>2</sup>.

Intervalo del recuento (ufc/ 100cm <sup>2</sup> )	Total de muestras que produjeron cambios de impedancia
< 10	6,25%
Entre 10 y 99	8,22%
Entre 100 y 300	66,7%
> 300	100%

Según estos resultados, la utilización de la técnica impedanciométrica tendría una utilidad limitada como sistema de verificación de la higienización en esta industria, teniendo en

cuenta que el valor crítico recomendado para el hisopado de 100cm<sup>2</sup> ha sido de 9 ufc/100cm<sup>2</sup>. Para optimizar la utilización de esta técnica en la determinación de la contaminación fúngica de las superficies, se debería aumentar la superficie de muestreo, para lo cual el procedimiento recomendado sería realizar el hisopado con esponjas o bayetas de muestreo, reduciendo el tiempo de análisis como máximo a 72 horas.

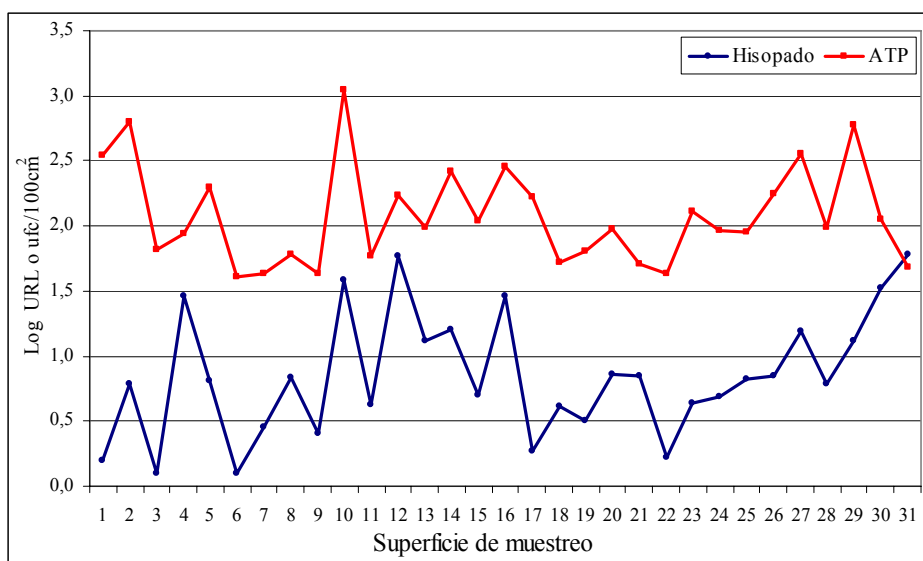
### 2.5. Técnica de bioluminiscencia

La molécula de ATP abunda en la mayoría de seres vivos incluyendo secreciones del cuerpo y alimentos, entre otros. Por lo tanto, la técnica de ATP medida por bioluminiscencia, detecta contaminación procedente de células (eucariotas y procariotas) y residuos de materia orgánica (Griffit y col., 1997).

En la **Figura 10** se muestra la relación entre el recuento fúngico obtenido mediante el hisopado de 100cm<sup>2</sup> y los valores de ATP. Los resultados mostraron una gran variabilidad en la relación recuento - valor ATP, obteniéndose una correlación muy reducida ( $r = 0,388$ ;  $p < 0,05$ ), lo cual indica que este método no es adecuado para determinar la contaminación fúngica. Bajas correlaciones entre el nivel de ATP y la contaminación bacteriana también han sido descritas por otros autores (Griffit y col., 1997).

El límite de detección de bacterias por la técnica de bioluminiscencia es de 10<sup>4</sup> ufc/100cm<sup>2</sup> (Davidson y col., 1999). Aunque para hongos no se ha establecido este límite de detección, teniendo en cuenta que el contenido de ATP de estos microorganismos es 100 veces superior al de las bacterias (Fung, 2002; Venkateswaran y col., 2003), posiblemente este valor sería más reducido. Sin embargo, se ha descrito que si bien los kits comerciales dan resultados satisfactorios para la determinación del ATP procedente de las levaduras, no sucede lo mismo en el caso de las esporas fúngicas (Rakotonirainy y col., 2003). Estos autores atribuyen esta situación a que los reactivos de extracción del ATP son ineficaces cuando se utilizan en esporas fúngicas relacionándolo con las características y el tamaño de su pared, por lo que se infraestima el contenido real de este compuesto.

**Figura 10.** Recuento fúngico obtenido mediante el hisopado de 100cm<sup>2</sup> y los valores de ATP en las 31 superficies de muestreo.



## 2.6. Aislamiento e identificación de los hongos

### 2.6.1. Identificación de géneros fúngicos

El análisis de las características macro y microscópicas permitió determinar diversos géneros de mohos. Los predominantes fueron: *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Cladosporium* que representaron un 74,5% del total (**Tabla 23**). También se encontraron levaduras pero aunque se visualizaron diferencias macro y microscópicas entre ellas, no se realizó la identificación de género.

**Tabla 23.** Géneros fúngicos identificados en las superficies de la industria después de la limpieza y desinfección.

GÉNERO	PORCENTAJE
<i>Rhizopus</i>	25,1
<i>Penicillium</i>	21,5
<i>Aspergillus</i>	19,2
<i>Cladosporium</i>	9,7
<i>Alternaria</i>	7,4
<i>Trichoderma</i>	3,3
<i>Mucor</i>	2,1
<i>Geotrichum</i>	1,7
<i>Fusarium</i>	1,5
Levaduras	5,1
Otros	3,4

Todos los géneros fúngicos observados en las superficies de esta industria son considerados habitantes naturales del suelo y el aire, aunque considerando las condiciones de acceso y vestimenta establecidas, probablemente esta microbiota tiene su origen en las materias primas, puesto que las levaduras y los mohos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* y *Mucor*, se han descrito como contaminantes habituales de cereales y cacao. Además en harinas, es común también encontrar además de estos géneros, diversas especies de *Fusarium*, *Alternaria* y *Cladosporium* (Müller, 1981; Larrañaga y col., 1999; Pascual-Anderson y Calderón y Pascual, 2000).

### **2.6.2. Identificación de especies de *Aspergillus***

Con respecto a la identificación dentro del género *Aspergillus*, se encontró como especie predominante *A. niger*. Las otras especies identificadas fueron *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. ustus* y *A. nidulans*. Dentro de estas especies se destaca la capacidad que tiene *Aspergillus flavus* de producir cuatro aflatoxinas, con potencial cancerígeno, cuando se desarrolla sobre granos de cacahuete o de maíz demasiado húmedos (Larrañaga y col., 1999). De otra parte, *Aspergillus fumigatus*, es una de las principales especies descritas como saprófitos en los edificios que en determinados casos, puede comportarse como patógeno oportunista en humanos (Anónimo, 1993). Además de *A. flavus* y *A. fumigatus*, también *A. niger*, *A. terreus*, *A. niveus* y *A. restrictus*, son potencialmente patógenos para humanos (Fischer y Dott, 2003). Beuchat (1992), refiere que detecciones de *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* en alimentos, pueden indicar la posibilidad de contaminación con aflatoxinas.

Debido a que algunos de los productos elaborados en esta empresa podrían estar destinados a una población muy vulnerable al efecto de las micotoxinas y teniendo en cuenta además, que varios de estos géneros fúngicos identificados a partir de las superficies se encuentran dentro del grupo de hongos micotoxigénicos, se considera esencial llevar a cabo una selección rigurosa de las materias primas utilizadas en la elaboración de estos preparados alimenticios (Anónimo, 2003a; 2006), así como realizar un estricto control microbiológico a lo largo de todas las etapas del tratamiento, hasta alcanzar el producto terminado, con el fin de asegurar que el perfil microbiológico garantiza una óptima condición comercial (García-Ramírez, 1989). Sería importante con el fin de evitar contaminaciones cruzadas, incluir dentro del programa de limpieza y desinfección tratamientos que permitan reducir la contaminación ambiental, como sería la aplicación de sistemas de nebulización con productos desinfectantes

#### *IV. Contaminación durante la producción*

---

de amplio espectro antimicrobiano, como la ozonización, que ha demostrado una elevada actividad fungicida cuando se utiliza en aerosol, con la ventaja adicional de tener un bajo efecto residual, aunque en su aplicación y dado su alto poder tóxico se deben extremar las medidas de seguridad (Kim y col., 1999; Wu y col., 2006; Pascual y col., 2007).

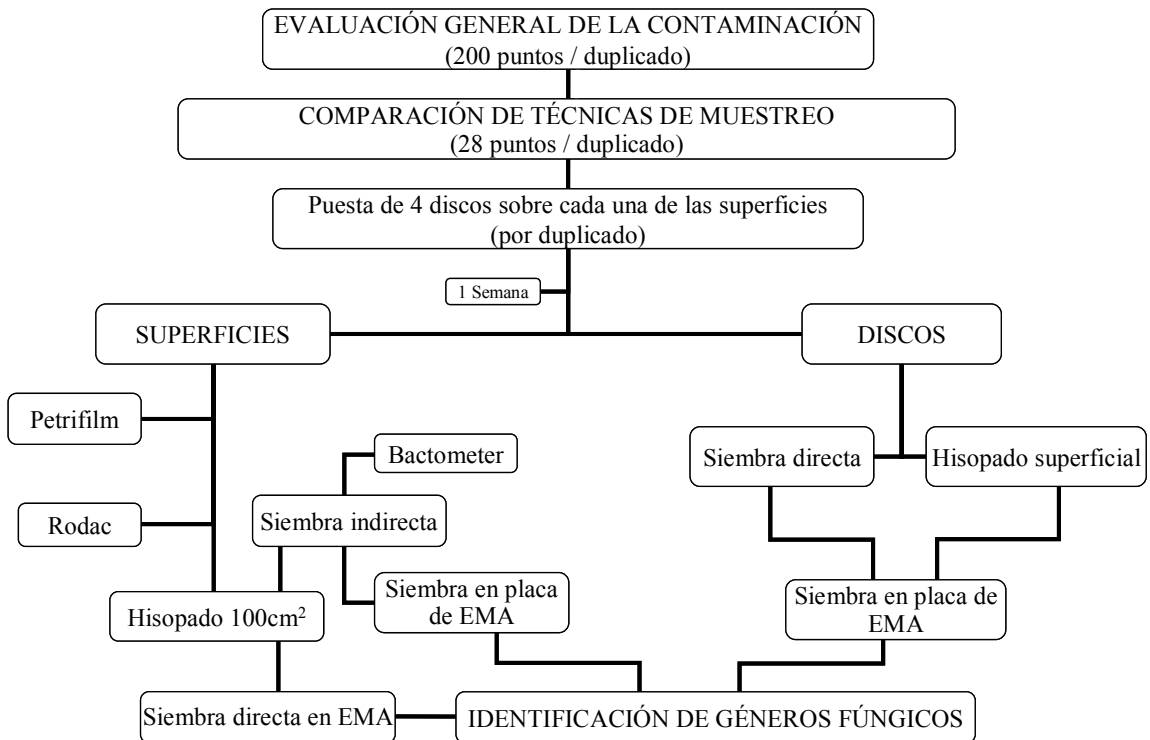
## EVALUACIÓN DURANTE LA COMERCIALIZACIÓN

### 1. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 1.1. Diseño experimental

En la **Figura 11**, se muestra el diseño experimental para realizar inicialmente la selección de las superficies de trabajo más contaminadas, así como para la comparación de diferentes métodos de muestreo y análisis, para evaluar la contaminación fúngica de una gran superficie de comercialización. Para la toma de muestras se realizaron tres visitas al hipermercado, con un intervalo de una semana entre ellas, en horario de no atención al público, tomando muestras por duplicado de cada una de las superficies.

**Figura 11.** Diseño del experimento para evaluar la contaminación fúngica durante la comercialización.





### 1.2. Descripción de la empresa y selección de las superficies de muestreo

El experimento se llevo a cabo en una gran superficie de comercialización de alimentos ubicada en la provincia de Barcelona.

Con la finalidad de conocer la contaminación fúngica general del hipermercado se seleccionaron de forma aleatoria 200 puntos para realizar la toma de muestras. La **Tabla 24** indica la división asumida de acuerdo a la distribución de productos en el hipermercado y al tamaño de la sección, así como el número de superficies muestreadas en cada una de las secciones. Las superficies de trabajo estaban constituidas por diferentes materiales de acuerdo a los productos que se comercializan; para producto seco los materiales comunes son la madera barnizada o pintada, aluminio y papel plastificado, mientras que para productos refrigerados y congelados son el acero inoxidable o láminas metálicas pintadas.

**Tabla 24.** Distribución de las secciones y de las superficies de muestreo en las que se evaluó la contaminación fúngica en el hipermercado.

SECCIÓN	SUPERFICIES
Arcones de charcutería y queso	11
Arcones refrigerados	5
Batidos	2
Carne	26
Charcutería y queso	11
Frutas y verduras fresca	25
Helados y mariscos	12
Huevos	3
Jamón y paleta curado envasado	2
Panadería	4
Pasillos (con diferentes productos)	58
Pescado congelado	4
Pescado fresco	7
Refrigeradores de verduras envasadas	6
Verduras congeladas	24

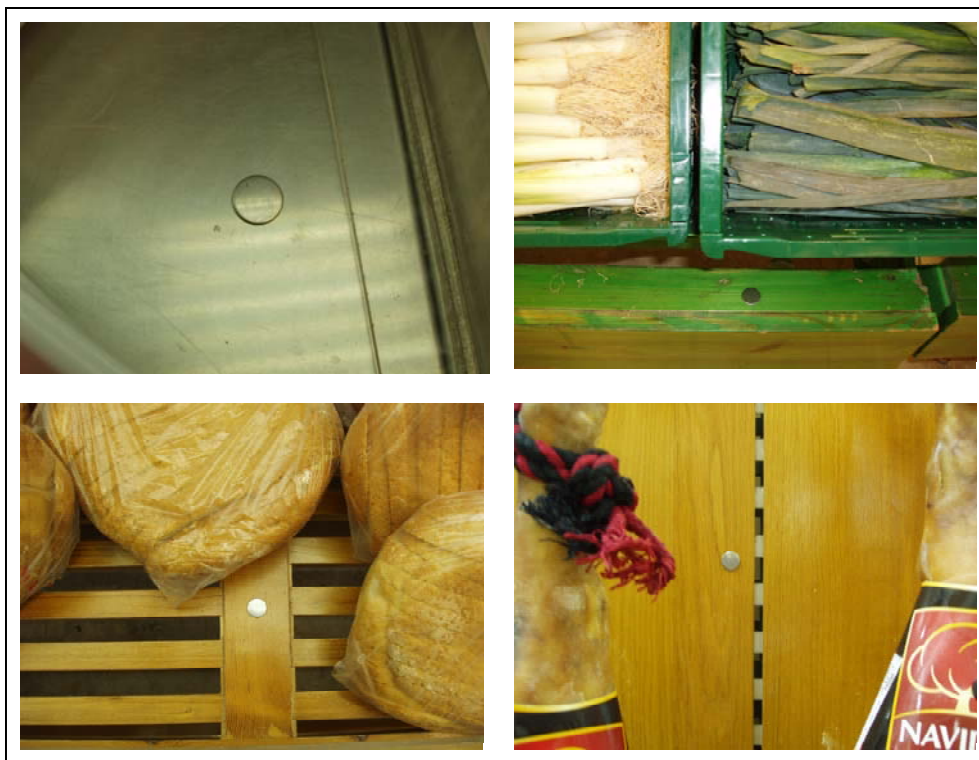
La toma de muestras de las superficies se realizó con placas Petrifilm<sup>TM</sup>, hidratadas con 1ml de diluyente MRD. Se tomaron muestras por duplicado de cada una de las 200 superficies indicadas. Las placas Petrifilm<sup>TM</sup>, se incubaron a 25°C durante 7 días, efectuando para el recuento de ufc fúngicas, un seguimiento continuo del crecimiento a partir de las 12 horas de incubación.

De acuerdo a los recuentos obtenidos con Petrifilm™ se escogieron las secciones que presentaron mayor contaminación fúngica (superficies con un recuento superior a la media) para realizar la comparación de las metodologías de muestreo. El total de superficies seleccionadas fueron 28 distribuidas en 6 secciones. En cada una de las secciones se evaluaron 5 puntos diferentes, excepto para el área de refrigeración de verduras envasadas, que sólo se tomaron 3 puntos debido al menor tamaño de dicha superficie.

### 1.3. Evaluación de la contaminación de las superficies

Para la comparación de las metodologías se realizaron muestreos en tres ocasiones diferentes, con intervalo de una semana entre ellos. Una semana previa al primer muestreo se colocaron sobre cada una de las 28 superficies seleccionadas, cuatro discos de acero inoxidable previamente higienizados y esterilizados (**Figura 12**). Los discos se dejaron adheridos a las superficies durante una semana.

**Figura 12.** Imágenes de superficies con los discos de acero inoxidable en algunas de las secciones evaluadas.



En los días de ensayo, se tomaron muestras por duplicado de las superficies cercanas a los discos con cada una de las técnicas empleadas; posteriormente se despegaron los discos y se llevaron al laboratorio dentro de placas de petri estériles para su evaluación.

Las metodologías empleadas para la toma de muestras de las superficies y los discos fueron las mismas que las utilizadas en el estudio anterior (Apartado 1.4.1. Análisis de superficies.), excepto en la técnica de hisopado de 100 cm<sup>2</sup> en el que se compararon dos protocolos de siembra:

- Siembra directa: En placas de agar EMA estriando toda la superficie directamente con el hisopo, previamente humedecido.
- Siembra indirecta: Tras hisopar la superficie, se pasaron los escobillones a tubos con agua de peptona estéril y se homogenizaron con un agitador mecánico durante 60 segundos. El análisis fúngico se llevo a cabo utilizando el método tradicional de siembra en placa con EMA y por la técnica de impedancia directa.

#### **1.4. Aislamiento e identificación de los hongos**

Una vez realizados los recuentos generales para cada una de las 28 superficies muestreadas, se seleccionaron aleatoriamente dos placas de EMA con presencia de hongos. Con la finalidad de identificar los géneros fúngicos predominantes en cada sección, se hicieron los recuentos agrupando las colonias según su morfología macroscópica. Por último, se hizo el seguimiento de las características macro y microscópicas de cada uno de los grupos de hongos, para su identificación hasta nivel de género (Barnett y col., 1972; Campbell y col., 1996; Koneman y col., 1999).

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1. Selección de las superficies de muestreo

Para escoger las secciones en las que se presentó la mayor contaminación fúngica se tuvo en cuenta el valor medio de los recuentos en el total de superficies evaluadas (200 superficies por duplicado), seleccionándose aquellas, cuyo valor medio en el recuento era superior al valor medio de la contaminación fúngica global (1,83 log ufc/100 cm<sup>2</sup>, 68 ufc/100 cm<sup>2</sup>) (Tabla 25).

**Tabla 25.** Distribución de los recuentos fúngicos en las 15 secciones evaluadas, en función del valor medio de la contaminación global (media en placas Petrifilm).

SECCIÓN	log ufc/100 cm <sup>2</sup>
Arcones refrigerados	0,59±0,78
Jamón y paleta curado	0,65± 0,58
Carne	0,73± 0,51
Verduras congeladas	0,84± 0,73
Pescado congelado	0,98± 0,82
Helados y mariscos	1,14± 0,54
Arcones de charcutería y queso	1,43± 0,53
Batidos	1,50± 0,53
Huevos	1,60± 0,28
Charcutería y queso	1,83± 0,36
Pasillos (con diferentes productos)	1,87± 0,08
Refrigeradores de verduras envasadas	1,95± 0,30
Pescado fresco	2,04± 0,11
Panadería	2,10± 0,22
Frutas y verduras fresca	2,13± 0,31

La contaminación fúngica evaluada no presentó un parámetro común con relación al tipo de material de la superficie, la temperatura o la humedad relativa. Así, si bien en las secciones de panadería y frutas y verduras frescas donde el material de las superficies era madera, la contaminación fúngica fue elevada, en las otras secciones con madera ésto no se evidenció (jamones, huevos y batidos), debido probablemente a que la contaminación deriva del propio

alimento. En relación al efecto de la temperatura, se observaron diferencias en la contaminación entre secciones similares como la carne y el pescado fresco. Esta distribución irregular coincide con lo descrito por el Instituto de Medio Ambiente y Sostenibilidad de la Comisión Europea (Anónimo, 1993), el cual indica que los niveles de partículas biológicas en el aire varían ampliamente en tiempo y espacio, tanto de forma cualitativa como cuantitativa, ya que se encuentran fuertemente influenciados por las características de los organismos y por factores ambientales.

## 2.2. Evaluación de la contaminación de las superficies

### 2.2.1. En función del día de ensayo

El análisis de los resultados mostró diferencias estadísticas en la contaminación respecto a los tres días de la toma de muestras (**Tabla 26**). Los mayores recuentos se registraron en la segunda visita indicando peores condiciones higiénicas de las superficies, mientras que en la primera visita se determinó una menor contaminación fúngica. Estas diferencias en los recuentos fúngicos, así como posibles variaciones en el tipo de especies aisladas, dependen en gran parte del nivel y el tipo de actividad del local durante el muestreo (Hunter y col., 1988). Igualmente, la precisión y la repetibilidad de las metodologías usadas para la toma de muestras de las superficies, se encuentran muy influenciadas por las técnicas de recuperación utilizadas (Foschino y col., 2003a).

En referencia a los dos muestras tomadas de la misma superficie (réplicas), no se encontraron diferencias estadísticas en los recuentos para ninguna de las tres visitas realizadas al hipermercado (**Tabla 26**), indicando así que la contaminación era homogénea, en toda la superficie.

**Tabla 26.** Recuentos totales de la contaminación fúngica de las superficies en función del día de visita (media  $\pm$  desviación estándar).

	log ufc/100cm <sup>2</sup>		
	VISITA 1	VISITA 2	VISITA 3
<b>Réplica 1</b>	1,37 $\pm$ 0,96 <sup>a</sup>	1,79 $\pm$ 1,03 <sup>b</sup>	1,56 $\pm$ 1,11 <sup>c</sup>
<b>Réplica 2</b>	1,49 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	2,00 $\pm$ 0,93 <sup>b</sup>	1,74 $\pm$ 1,08 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup>: Letras diferentes en la misma fila corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

La contaminación fúngica de las superficies evaluadas de este hipermercado fue en el 62,5% inferior a 160 ufc/100 cm<sup>2</sup>, establecido como límite crítico por Houhala y col. (1996), para hongos en superficies alimentarias tras la desinfección. Teniendo en cuenta este valor y que en el hipermercado no se realizan con frecuencia tratamientos de desinfección, puede considerarse que la contaminación fúngica a nivel general no fue elevada. Es difícil establecer límites de recuento fúngico dada la naturaleza ubicua de hongos en nuestro ambiente, sus diversas propiedades físicas y las variaciones estacionales, asociadas con la diversidad de climas en los que ellos se desarrollan (Gots y col., 2003).

### **2.2.2. En función de la técnica de muestreo**

En la **Tabla 27** se muestra la comparación de la recuperación fúngica en función de la técnica de muestreo utilizada. Los resultados mostraron diferencias estadísticas en función a la técnica. La menor recuperación de hongos de las superficies se obtuvo con la técnica del hisopado de 100 cm<sup>2</sup>, cuando se realizó la siembra directa con el hisopo sobre placas de EMA. Contrariamente, con la siembra indirecta de esta misma metodología, se recuperó el mayor número de hongos. En este punto particular, cabe destacar que las siembras de la técnica indirecta se realizaron por inclusión, con lo cual estos resultados estarían en desacuerdo con lo descrito por Beuchat y Cousin (2002), en relación a la necesidad de enumerar las levaduras y los mohos por siembras en superficie debido a la mayor exposición de las células al oxígeno atmosférico. No obstante, es importante también tener en cuenta las posibles diferencias relacionadas con la técnica en sí, puesto que se ha descrito que la técnica de hisopado es inadecuada para la detección de bajas concentraciones de esporas fúngicas (Foschino y col., 2003a).

Al contrario de lo observado en nuestros resultados, estudios realizados en bacterias (Davidson y col., 1999), demostraron mejores recuperaciones con el hisopado de superficies de acero inoxidable, cuando las siembras se realizaron directamente del hisopo a la superficie del agar, en comparación con la siembra indirecta (hisopos en tubos con diluyente de recuperación, previo a la siembra). De igual manera, estos autores señalaron que la obtención de recuentos fiables con la técnica de hisopado, sólo es posible si los microorganismos recuperados han sido efectivamente liberados del hisopo, ya sea en la siembra directa sobre la superficie del agar o en el diluyente de recuperación, usado previamente a la siembra en placas. Gourama y Bullerman (1995), señalaron que esporas de mohos dañadas o lesionadas,

pueden no crecer fácilmente sobre algunos medios, por lo que se recomienda para alimentos secos y alimentos con humedad intermedia o bajos valores de pH, activar estas esporas en solución humectante antes de realizar la siembra en placa; lo que podría también explicar los bajos recuentos obtenidos a partir de la siembra directa, puesto que en la mayoría de los casos las muestras fueron tomadas a partir de superficies secas y si bien, los hisopos estaban previamente humedecidos, al realizar el doble hisopado de las superficies éstos perdieron considerablemente su humedad, por lo que al realizar la siembra directamente con el hisopo en el agar, la liberación de las esporas pudo ser insuficiente.

No se observaron diferencias estadísticas entre los recuentos obtenidos con la siembra indirecta del hisopado de 100 cm<sup>2</sup>, los métodos de placas de contacto (Rodac y Petrifilm) y la siembra directa del disco en placas de agar (**Tabla 27**). Si se tiene en cuenta que en las diversas superficies del hipermercado no se realiza un continuo protocolo de limpieza y desinfección y, considerando que en este experimento no hubo diferencias en la recuperación fúngica entre la técnica de siembra directa del disco y otras metodologías, se podría pensar entonces, que el pegamento utilizado para adherir los discos a las superficies no actúa como adhesivo para los hongos, sino más bien que ofrece una barrera de protección sobre los detergentes y desinfectantes, especialmente teniendo en cuenta los resultados del estudio realizado en la industria de alimentos deshidratados.

Con la técnica del hisopado del disco se consiguió una recuperación intermedia de hongos desde las superficies, con valores que fueron significativamente diferentes a los obtenidos con las otras técnicas (**Tabla 27**). Es importante destacar que en el anterior estudio no se apreciaron diferencias en la recuperación entre las técnicas de hisopado. Lo que hace pensar que el hecho de muestrear una mayor superficie que no ha sido higienizada, favorece una mayor recuperación de la microbiota presente.

**Tabla 27.** Comparación de la recuperación fúngica total, obtenida con diferentes técnicas de muestreo a partir de las superficies del hipermercado (media  $\pm$  desviación estándar).

<b>TÉCNICA</b>	<b>log ufc/100cm<sup>2</sup></b>
Petrifilm	1,69 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>
Rodac	1,79 $\pm$ 0,93 <sup>a</sup>
Disco siembra directa	1,85 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>
Hisopado del disco	1,44 $\pm$ 1,32 <sup>b</sup>
Hisopado de 100 cm <sup>2</sup> siembra indirecta	1,85 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup>
Hisopado de 100 cm <sup>2</sup> siembra directa	0,94 $\pm$ 0,78 <sup>c</sup>

<sup>a-c</sup>: Letras diferentes corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

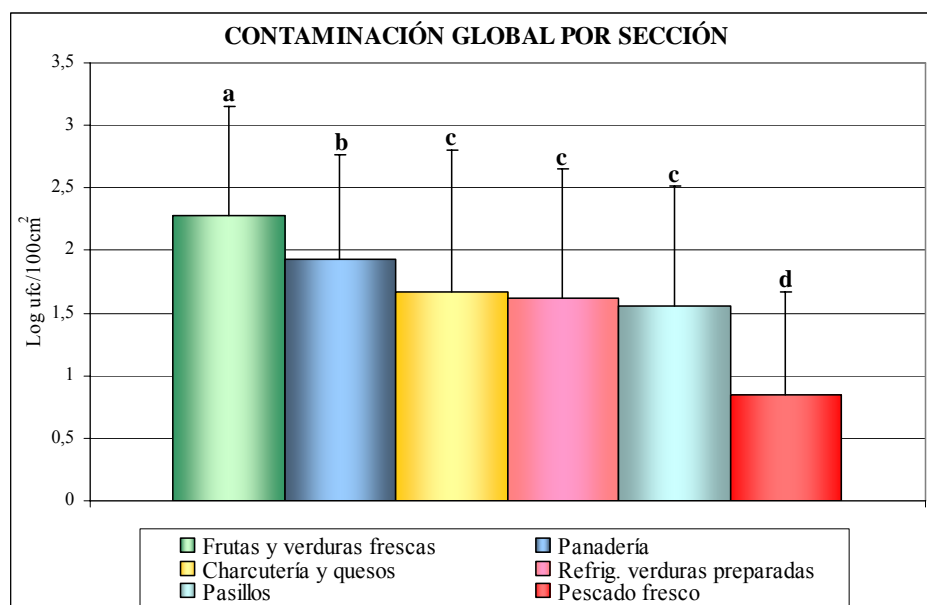
### 2.2.3. En función de la sección

En la **Figura 13** se muestra la contaminación fúngica de las superficies de las seis secciones. Los resultados mostraron la mayor contaminación en la sección de frutas y verduras frescas, con recuentos que fueron estadísticamente diferentes de los encontrados en las otras áreas. De hecho, del total de superficies que mostraron recuentos superiores a  $10^3$  (ufc/100cm<sup>2</sup>), un 42% se encontraron en esta sección. La contaminación de frutas y verduras por diferentes géneros fúngicos afecta a su calidad, siendo común la podredumbre en la post-cosecha lo que ocasiona grandes pérdidas durante la comercialización, incluso cuando se conserva a temperaturas de refrigeración (Logrieco y col., 2003; Tournas, 2004). Además, su desarrollo puede representar un riesgo para la salud debido a la capacidad que tienen diferentes hongos productores de micotoxinas, de crecer sobre frutas frescas a temperatura ambiente (Tournas y Katsoudas, 2005).

En orden decreciente de contaminación, se encontró a continuación la sección de panadería con recuentos significativamente diferentes de las otras áreas. La presencia de mohos en harinas de cereales y algunos de sus productos como el pan, ha sido ampliamente descrita. No obstante, se ha definido que su contaminación se produce después del proceso de cocción y se origina a partir de las esporas y las conidias que son transportadas por el aire (Legan, 1993; Filtenborg y col., 1996; Deibel y Swanson, 2002; McKevith, 2004). En algunas ocasiones, el crecimiento de levaduras representa también un problema serio en la contaminación del pan (Filtenborg y col., 1996).



**Figura 13.** Nivel de contaminación fúngica en las superficies de las seis secciones evaluadas (media y desviación estándar).



El análisis estadístico no mostró diferencias significativas en la contaminación fúngica, entre las secciones de charcutería y quesos, pasillos y refrigeradores de verduras envasadas (**Figura 13**). Estos datos permiten confirmar la capacidad que tienen algunos hongos de crecer a bajas temperaturas (Anónimo, 1993; Tournas, 2004), puesto que en las áreas de charcutería y quesos y en los refrigeradores de verduras envasadas, la temperatura oscilaba entre 2 y 5°C. También se ha descrito que la mayoría de los hongos que crecen en ambientes cerrados lo hacen a temperaturas entre 10 y 35°C, considerando en estos casos, al contenido de agua como el factor determinante para su desarrollo (Hunter y col., 1988; Anónimo, 1993). La capacidad de crecimiento de géneros como *Penicillium* spp. a bajas temperaturas, asociada a su alta incidencia en brotes de leguminosas, se ha tomado como indicador de la producción potencial de micotoxinas durante la comercialización de estos alimentos (Tournas, 2004).

La contaminación fúngica determinada en las superficies de los refrigeradores de verduras envasadas podría repercutir sobre los productos de dos maneras, por contaminación directa, ya que en algunos casos hay orificios en su envase (fresas, puerros) y/o, por la contaminación cruzada posterior, cuando se abren dichos envases. La presencia de hongos y levaduras en vegetales crudos o mínimamente procesados, usados como ingredientes en productos “listos

para comer”, así como en diversos tipos de leguminosas, disminuye notablemente su vida de anaquel. Estos vegetales conservan gran parte de su carga microbiana después de su mínimo procesamiento y además, pueden contaminarse durante su comercialización con levaduras y mohos de géneros toxigénicos (Girardin, 1997; Francis y col., 1999; Hilgren y Salverda, 2000; Tournas, 2004). En quesos y productos de charcutería, las causas más frecuentes de contaminación son los mohos y las levaduras (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1996; Palmas y Meloni, 1997). Su origen deriva del proceso de elaboración, destacando el aire como principal fuente de contaminación (Palmas y Meloni, 1997; Kure y col., 2004), por lo que posiblemente la contaminación determinada en esta sección, deriva de los propios alimentos. Puesto que los hongos se introducen en los ambientes cerrados a través de sistemas de ventilación natural (como ventanas y puertas abiertas), de sistemas de ventilación mecánica, a través de las personas (prendas de vestir y zapatos) y de las mascotas y, considerando que la sección de pasillos se refiere a las áreas contiguas a las cajas de pago, que se encuentran justo en frente de las puertas, podría decirse que ésta sección contempla el mayor tránsito de personas dentro del hipermercado, lo que podría explicar los recuentos aquí encontrados (Gots y col., 2003). No obstante, es necesario recordar también la naturaleza ubicua de los hongos en el ambiente (Gourama y Bullerman, 1995; Gent y col., 2002; Gots y col., 2003).

La menor contaminación fúngica se observó en la sección de pescado fresco (**Figura 13**). Teniendo en cuenta las recomendaciones de Houhala y col. (2001), cuyo valor de aceptabilidad para mohos en superficies alimentarias tras la limpieza y desinfección es inferior a 60 ufc/100cm<sup>2</sup>, se puede considerar que los recuentos obtenidos en esta sección fueron considerablemente reducidos (7ufc/100cm<sup>2</sup>). Miettinen y col. (2001), determinaron que la contaminación fúngica puede ser en algunas industrias de pescado un problema importante, determinando en estas superficies una contaminación media fúngica de 70 ufc/100cm<sup>2</sup>. Al contrario de lo que ocurre en las anteriores secciones, en esta área se realiza cada día al acabar la jornada el lavado de todas las superficies con abundante agua, además una o dos veces por semana se aplica hipoclorito de sodio comercial sobre las superficies. Reynolds y col. (2004), observaron que bajas concentraciones de hipoclorito de sodio (2,4%), similares a las comúnmente encontradas en los desinfectantes domésticos, fueron efectivas para reducir la contaminación fúngica en las superficies, hasta alcanzar niveles no detectables para mohos de los géneros *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, entre otros.

A pesar de que la contaminación fúngica generalizada ha sido relativamente baja, sería recomendable establecer un programa de higienización en el que se incremente la frecuencia de limpieza y especialmente de desinfección. Particularmente, teniendo en cuenta las implicaciones higiénico-sanitarias (alteración, alergias y micotoxinas) que tiene la presencia de hongos en alimentos y que la comercialización, es el último eslabón para la adquisición de los alimentos por parte del consumidor.

### 2.3. Análisis fúngico por impedancia directa

Al igual que en el estudio anterior, la comparación de los resultados con los dos protocolos de recuento fúngico (método tradicional e impedancia directa) para las muestras que se tomaron con el hisopado de 100 cm<sup>2</sup>, no se observaron respuestas falsas positivas, es decir, no se registraron cambios en la señal de capacitancia hasta las 72 horas de incubación para las muestras que no presentaron crecimiento fúngico en placas de EMA. Tampoco, se presentaron respuestas falsas negativas, es decir que las muestras que no presentaron cambios en la señal, tampoco evidenciaron desarrollo fúngico visual en los pocillos.

Aunque se observó un incremento en el porcentaje de muestras positivas en el Bactometer a medida que aumentó el número de ufc/100cm<sup>2</sup> (**Tabla 28**), el total de positivos fue muy bajo y sólo el 47% de las muestras con recuentos superiores a 100 ufc/cm<sup>2</sup>, produjeron cambios de la capacitancia. Cuando los recuentos fueron superiores a 300 ufc/100cm<sup>2</sup>, sólo el 51% de las muestras presentó cambios en la señal de capacitancia. Estos valores fueron inferiores a los obtenidos en el estudio anterior, en el que el 100% de las muestras con recuentos superiores a 300 ufc/100cm<sup>2</sup> fueron positivas. Esto puede atribuirse a la gran variabilidad de géneros fúngicos aislados en cada una de las secciones. Los TD variaron entre las 22,5 y las 69,2 horas, pero no fueron proporcionales al número de ufc/100cm<sup>2</sup>. El TD puede variar en función de la cepa evaluada, como ya ha sido evidenciado tanto en los experimentos previos como por otros autores (Watson-Craik y col., 1989; Silley y Forsythe, 1996).

Estudios realizados por Meletiadis y col. (2001), en cinéticas de crecimiento fúngico basadas en mediciones de turbidez, permitieron concluir que si bien es posible encontrar un medio de cultivo común para el adecuado crecimiento de muchos hongos, es posible también que se requieran diferentes medios nutritivos para cada especie y por lo tanto diferentes tiempos de lecturas de las curvas de crecimiento. Investigaciones relativas a una especie no deben ser

extrapoladas a otras, particularmente en el caso de hongos filamentosos, donde existen significativas variaciones morfológicas y fisiológicas. En el mismo sentido y en estudios impedanciométricos, Watson-Craik y col. (1989), señalaron la importancia de desarrollar medios específicos para evaluar impedanciométricamente el desarrollo de levaduras y mohos. A pesar de ello, estos mismos autores obtuvieron respuestas positivas en las curvas de capacitancia con 27 especies de mohos incluidos en los géneros *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* y con 4 especies de levaduras, utilizando medio SP/YE al 0,5%, pero solidificado con agar al 1,5% (w/v).

**Tabla 28.** Relación de los resultados obtenidos con los dos protocolos de análisis fúngico (método tradicional e impedancia directa) en las muestras de hisopado de 100 cm<sup>2</sup>.

Intervalo del recuento (ufc/ 100cm <sup>2</sup> )	Total de muestras que produjeron cambios de impedancia
< 10	4,5%
Entre 10 y 99	4,6%
Entre 100 y 300	42,5%
> 300	51%

#### 2.4. Aislamiento e identificación de los hongos

El análisis de las características macro y microscópicas de las colonias fúngicas, permitió identificar los principales géneros presentes en cada una de las seis secciones evaluadas (**Tabla 29**). Sin embargo, debido al rápido crecimiento de los mucorales y a su presencia en algunas muestras, es posible que no se hayan identificado cepas con crecimiento más lento. Para el caso de las levaduras, aunque se observaron diferencias macro y microscópicas entre ellas, no se realizó la identificación de género y únicamente se agruparon dentro de la categoría de levaduras.

Los resultados mostraron a las levaduras como los microorganismos predominantes en las tres secciones que se encontraban a temperaturas de refrigeración, entre 2 y 5°C, alcanzando incluso a representar en el área de charcutería y quesos, el 80% del total de la microbiota (**Tabla 29**). La mayor presencia de levaduras en la sección de pescado coincide con los resultados obtenidos por Bagge-Ravn y col. (2003), cuando evaluaron la adherencia de

#### IV. Contaminación durante la comercialización

levaduras y diferentes géneros bacterianos, a las superficies de equipos durante el procesamiento y después de la limpieza y desinfección, en cuatro industrias de pescado. En dicho estudio, las levaduras fueron los microorganismos predominantes, indicando posiblemente su mejor adherencia a las superficies así como su mayor resistencia a los desinfectantes. Con relación a los mohos, los géneros predominantes variaron en función de la sección. En las superficies de charcutería y quesos, *Penicillium* con un 60% fue el predominante, siendo comúnmente aislado en estos productos y a bajas temperaturas (Palmas y Meloni, 1997; Tournas, 2004; Kure y col., 2004). El género *Cladosporium* descrito como contaminante habitual de alimentos conservados a bajas temperaturas (Tournas, 2004), representó el 70% del total de mohos aislados de las superficies de verduras envasadas.

**Tabla 29.** Principales géneros fúngicos y su porcentaje de frecuencia, determinados en las secciones de charcutería y quesos (C y Q), pescado, verdura envasada (V-E), panadería, pasillos y frutas y verduras frescas (F y V).

GÉNERO	C y Q	Pescado	V-E	Panadería	Pasillos	F y V
Levaduras	80,8	57,6	62,3	2,8	0,5	2,8
<i>Acremonium</i>	-	0,8	-	-	-	-
<i>Alternaria</i>	1,8	5,6	0,1	6,1	0,5	0,6
<i>Arthrimum</i>	0,3	-	2,4	1,2	7,9	1,7
<i>Aspergillus</i>	0,1	2,4	0,7	3,1	1,4	7,8
<i>Aureobasidium</i>	0,5	8,8	-	0,6	-	-
<i>Cladosporium</i>	1,5	8,0	26,5	26,4	21,3	25,1
<i>Fusarium</i>	0,5	1,6	0,1	-	-	-
<i>Mucor</i>	1,8	-	0,7	1,8	4,3	-
<i>Paecilomyces</i>	0,2	2,4	2,1	6,1	1,7	30,2
<i>Penicillium</i>	10,7	8,8	1,9	30,7	30,9	29,1
<i>Rhizopus</i>	0,5	0,8	1,2	-	-	-
<i>Trichoderma</i>	-	2,4	0,4	17,8	31,2	1,1
Sin identificar	1,3	0,8	1,6	3,4	0,2	1,7

En las tres secciones que se encontraban a temperatura ambiente (panadería, pasillos y frutas y verduras frescas), los géneros *Penicillium* y *Cladosporium* representaron aproximadamente

la mitad de la micobiota (57, 52 y 54%, respectivamente). En las áreas de panadería y pasillos, el género *Trichoderma* se presentó también en un alto porcentaje, que sumado a los otros dos géneros anteriores, equivalían al 75 y 83% de la contaminación, respectivamente. Para el área de frutas y verduras frescas, junto con el género *Paecilomyces* constituyeron el 85% de la micobiota.

Todos los géneros fúngicos identificados, se consideran contaminantes frecuentes de los alimentos y habitantes naturales del aire, el suelo y las superficies. Teniendo en cuenta los resultados de Filtenborg y col. (1996), respecto a la presencia de un número limitado de especies fúngicas asociadas a la contaminación de cada producto (micobiota asociada), como posible consecuencia de una combinación de factores intrínsecos, extrínsecos y de procesamiento del alimento, se podría decir que sólo una baja proporción de los géneros fúngicos aislados en cada una de las seis secciones (*Alternaria*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Cladosporium* y *Aspergillus*), provienen de los alimentos y que la gran mayoría tienen su origen en el aire, el suelo y las superficies.

## **CAPITULO V**

---

### **V. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA DE DIFERENTES SOLUCIONES DESINFECTANTES**

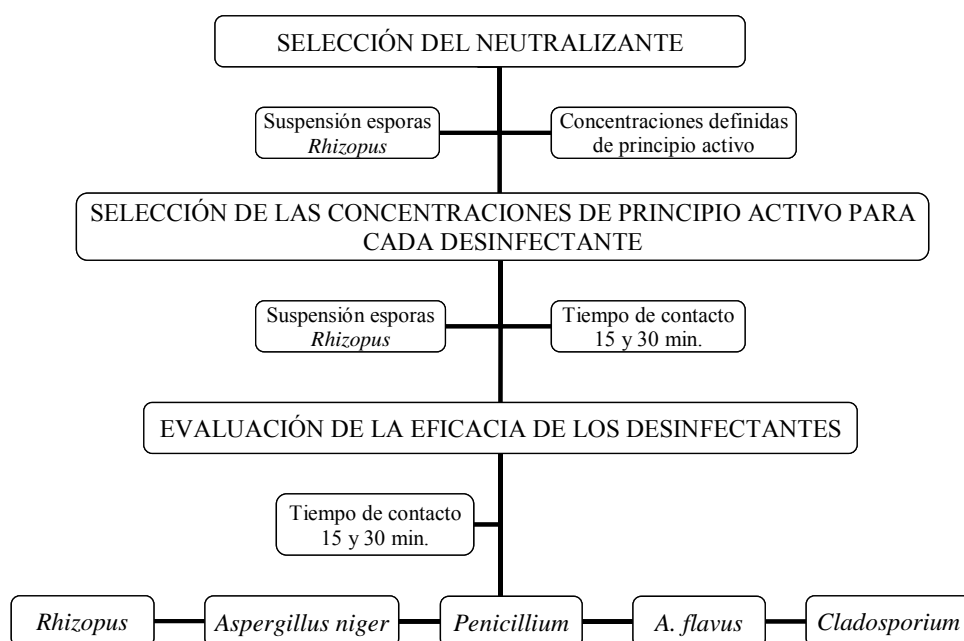
## 1. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.1. Diseño experimental

En la **Figura 14**, se muestra el diseño que se utilizó para evaluar la actividad fungicida de cuatro desinfectantes diluidos en agua dura y en condiciones sucias, sobre cepas de mohos recuperadas de superficies de la industria elaboradora de alimentos deshidratados. El experimento se realizó por duplicado.

El estudio se llevo a cabo tomando como base el protocolo establecido por la norma UNE-EN 13697 (Anónimo, 2002), para la evaluación de la actividad fungicida de cuatro productos desinfectantes sobre superficies no porosas. Se decidió aplicar la metodología de esta norma, puesto que contempla los factores más importantes que pueden afectar a la eficacia de un desinfectante aplicado a una industria, como son: la disolución del desinfectante en agua dura, la suciedad y la adhesión de los microorganismos a las superficies. La actividad fungicida se demuestra cuando se produce una reducción logarítmica de la viabilidad igual o superior a 3 logaritmos decimales en las condiciones de ensayo de 10-25°C y condiciones limpias (0,3 g/l de seroalbúmina bovina) o sucias (3 g/l de seroalbúmina bovina).

**Figura 14.** Diseño del experimento para evaluar la eficacia de los desinfectantes.





## 1.2. Cepas y desinfectantes

Los ensayos se realizaron con cinco cepas de mohos, cuatro de ellas (*Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Cladosporium*), correspondientes a los principales géneros fúngicos recuperados de las superficies de la industria de alimentos deshidratados. La cepa de *Aspergillus* seleccionada fue *A. flavus*. Adicionalmente se incluyó la cepa de *A. niger* CECT 2574 procedente de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Universidad de Valencia, España) y que se corresponde con la cepa ATCC 16404, recomendada por la norma. La separación de las esporas se realizó según lo descrito en el Apartado 1.3. Separación de esporas y conservación de las cepas (Capítulo III), incluyendo además, las recomendaciones de Tortorano y col. (2005), para simplificar el procedimiento.

De los cuatro productos evaluados, tres soluciones fueron suministradas por una firma comercial. Sus principios activos fueron: amonio cuaternario (con un 50% de cloruro de didecildimetilamonio), hipoclorito sódico (14% de cloro libre) y ácido peracético (15% con una proporción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre el 20-25%). El cuarto desinfectante ensayado fue el utilizado por la industria y su composición era: cloruro de didecildimetilamonio (5%), glutaraldehído (2%) y formol (1,52%).

## 1.3. Selección del neutralizante

Con el fin de seleccionar el neutralizador adecuado para todos los productos desinfectantes ensayados, se realizaron las validaciones según lo recomendado en la norma. Se ensayaron diferentes soluciones neutralizantes, basadas en la siguiente composición: 3g/l de lecitina (Lucas Meyer GMBH&Co, Hamburgo); 30g/l de polisorbato 80 (Panreac); 5g/l de tiosulfato de sodio (Panreac); 1g/l de L-histidina (Aldrich, Milwaukee, USA) y 30g/l de saponina (Sigma). Estas soluciones fueron:

- Neutralizante base diluido en una solución de cloruro de sodio (0,85%) y triptona (0,1%, Difco).
- Neutralizante base diluido en tampón fosfato 0,25 M al 1% (pH 7,2)
- Neutralizante base con doble concentración de tiosulfato y sin saponina, diluido en tampón fosfato

- Neutralizante base con doble concentración de componentes diluido en solución de cloruro de sodio y triptona.

La efectividad de los neutralizadores se evaluó sobre tres concentraciones de principio activo de cada uno de los cuatro desinfectantes. Para el desinfectante industrial y el amonio cuaternario estas concentraciones fueron: 20, 35 y 50%. Para el hipoclorito sódico y el ácido peracético fueron: 2,5, 5 y 10%. La determinación de estos porcentajes se realizó en función de la concentración del principio activo presente en los productos, así como de los resultados obtenidos en ensayos previos. Inicialmente, se validó la capacidad de inactivación de la actividad fungicida así como su toxicidad, sobre una suspensión de esporas de *Rhizopus* ( $10^7$  esporas/ml), puesto que fue el moho predominante cuando se realizó la identificación de los principales géneros fúngicos presentes en las superficies de la industria.

Sólo el neutralizante base con doble concentración de componentes diluido en solución de cloruro de sodio y triptona, fue efectivo sobre los cuatro desinfectantes a las tres concentraciones de principio activo ensayadas y sobre las cinco cepas evaluadas. Una vez seleccionado este neutralizante, se validó su capacidad de inactivación y su toxicidad, sobre las otras cuatro cepas de mohos.

#### **1.4. Selección de las concentraciones de principio activo para cada desinfectante**

A partir de las soluciones de desinfectantes concentradas, se prepararon diferentes diluciones en agua dura. Se realizaron diversos ensayos por duplicado, con el fin de seleccionar para cada desinfectante tres concentraciones diferentes que incluyeran una concentración en el intervalo activo, es decir, que permitiera reducciones de los recuentos fúngicos en al menos 3 unidades logarítmicas y una concentración en el intervalo no activo, según lo descrito en la norma. La evaluación de la actividad fungicida de cada uno de los desinfectantes se realizó sobre una suspensión de esporas de *Rhizopus* ( $10^7$  esporas/ml), evaluando dos tiempos de contacto: 15 y 30 minutos.

Las concentraciones seleccionadas de los diferentes productos fueron: 0,1-0,5 y 1% para el desinfectante industrial; 20, 35 y 50% de principio activo del amonio cuaternario, 0,01-0,05 y 0,1% de ácido peracético y de hipoclorito sódico (equivalentes a 100, 500 y 1000 mg/l de cloro libre, respectivamente).

### 1.5. Evaluación de la eficacia fungicida de los desinfectantes

Una vez seleccionadas las tres concentraciones de principio activo para cada uno de los desinfectantes, se procedió a evaluar por duplicado, la eficacia de éstas soluciones sobre las cinco cepas de mohos (*Rhizopus*, *Penicillium*, *A. flavus*, *A. niger* y *Cladosporium*). La realización del ensayo por microorganismo y desinfectante a tres concentraciones y dos tiempos (15 y 30 minutos) se efectuó de la siguiente manera:

- Se dispusieron 8 discos (superficies de ensayo descritas en el Apartado 1.4. Verificación del proceso de limpieza y desinfección del capítulo IV) en diferentes placas de Petri.
- Se preparó la suspensión de esporas y se ajustó la concentración ( $10^7$  esporas/ml) mediante observación microscópica. Se pasaron 2 ml de esta suspensión a un tubo de ensayo estéril, a los que se adicionaron 2 ml de albúmina bovina (Sigma, preparada al 0,6% en agua destilada estéril).
- Esta mezcla se homogenizó en un agitador mecánico durante 60 segundos e inmediatamente, se depositaron 50  $\mu$ l en cada uno de los discos, intentando cubrir toda la superficie. Los discos inoculados se secaron en un incubador con ventilador a 37°C hasta que su superficie estuvo visualmente seca (cuidando siempre de no superar los 45 minutos). Pasado este tiempo, los discos se retiraron del incubador y se dejaron a temperatura ambiente durante unos minutos con el objetivo de equilibrar la temperatura para que el ensayo se realizara a esta temperatura ambiente.
- Se prepararon las tres concentraciones de cada desinfectante en agua dura (300 mg/kg de  $\text{CaCO}_3$ ) y de cada concentración, se depositaron 100  $\mu$ l sobre los discos (2 discos/concentración), asegurando que el inóculo seco quedara totalmente cubierto por la solución desinfectante. Sobre otros dos discos se depositó agua dura (100  $\mu$ l/disco), en lugar de solución desinfectante. Estos discos correspondieron al control.
- Inmediatamente después de adicionada la solución desinfectante o el agua dura, se accionó un cronómetro con el fin de controlar dos tiempos de contacto (15 y 30 minutos). Pasado ese tiempo, el disco se pasó a una placa de Petri que contenía 10 ml del neutralizante seleccionado y 5g de perlas de vidrio, cuidando de que la superficie inoculada quedara boca abajo, en contacto con las perlas. Cada una de las placas se agitó manualmente durante un minuto, sobre una superficie horizontal y se dejó actuar al neutralizador por cuatro minutos más.

- Pasados los 5 minutos, se prepararon por duplicado, diluciones de las mezclas neutralizadas y se realizaron siembras por inclusión en placas de agar extracto de malta (EMA).
- Los discos se recuperaron, se decantó el neutralizador y se aclararon con 10 ml de agua destilada estéril. A continuación, se pasaron a placas de Petri con medio EMA con la superficie inoculada hacia arriba. Sobre cada disco, se depositaron 100  $\mu$ l de agua destilada estéril y con la ayuda de una punta de pipeta estéril, se rascó el inóculo residual. Finalmente, se adicionó de nuevo agar extracto de malta.
- Las placas sembradas se incubaron a 30°C hasta que fue posible el recuento.

#### **1.6. Ensayo de validación de la neutralización**

Se prepararon dos superficies de ensayo inoculando 50  $\mu$ l de la suspensión de esporas sobre cada disco. De forma similar a lo descrito previamente se secaron a 37°C. Paralelamente se prepararon dos placas de Petri que contenían 10 ml del neutralizante seleccionado y 5g de perlas de vidrio. A una de ellas se le adicionó 100  $\mu$ l de agua destilada (para el control de la neutralización) y a la otra 100  $\mu$ l de la solución desinfectante a la concentración más elevada (para el ensayo de la neutralización). Se mezclaron y se dejaron en contacto durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se depositaron los discos en las respectivas placas cuidando de que la superficie inoculada quedara boca abajo, en contacto con las perlas. Cada una de las placas se agitó manualmente. Se prepararon las diluciones de las mezclas y se realizaron siembras por inclusión en placas de agar extracto de malta (EMA). Las placas sembradas se incubaron a 30°C hasta que fue posible el recuento.

#### **1.7. Verificación de la metodología y cálculo de la eficacia de los desinfectantes**

Para cada ensayo se comprobó que:

- **N- Nc** no es superior a 2 logaritmos
- **N-NC** no es superior a 2 logaritmos
- **NC-NT** no es superior a  $\pm 0,3$

- **Nts** es inferior a 100 ufc/100 ml para las concentraciones activas. Si no es así la recuperación de microorganismos no es suficiente. Para las concentraciones no activas, Nts puede no ser contable, siendo

**N** es el logaritmo del número de ufc por 0,05 de la suspensión de ensayo utilizada

**Nc** es el logaritmo decimal del número de ufc por superficie de ensayo para el control del agua.

**NC** es el logaritmo decimal del número de ufc por superficie de ensayo del control de neutralización.

**NT** es el logaritmo decimal del número de ufc por superficie de ensayo del ensayo de neutralización.

**Nts** son las ufc que quedan sobre la superficie del disco.

La actividad fungicida de los desinfectantes se calculó:  $Nc - Nd$ , siendo  $Nd$  logaritmo decimal del número de ufc por superficie de ensayo para el ensayo del desinfectante.

### **1.8. Análisis estadístico**

Para la realización del estudio estadístico se utilizó el programa informático SPSS para Windows, versión 14.0. (SPSS Inc. 2005). Las diferencias estadísticas en la evaluación de la eficacia de los desinfectantes a diferentes concentraciones y tiempos, se determinó mediante la prueba T-student para muestras independientes. Se definieron las diferencias estadísticas cuando  $p < 0,05$ .

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1. Evaluación de la eficacia fungicida de los desinfectantes

#### 2.1.1. Amonio cuaternario

La efectividad como fungicida del amonio cuaternario cuyo principio activo fue el cloruro de didecildimetilamonio mostró una gran variabilidad en función de la concentración y de la cepa fúngica evaluada (**Tabla 30**).

En relación a la concentración, las variaciones en la eficacia posiblemente fueron debidas a que el desinfectante formaba una capa gelatinosa sobre la superficie, que si bien, disminuía su consistencia en proporción a la reducción del porcentaje, seguía manteniéndose incluso al 20%, lo que posiblemente dificultó su interacción con el microorganismo. Ello también puede explicar la gran variabilidad observada en los recuentos. La disminución de la eficacia asociada a la consistencia del producto se observó especialmente en las cepas del género *Aspergillus*. Así en el caso de *A. niger* y *A. flavus* a los 15 y 30 minutos, respectivamente, mostraron una mayor efectividad cuando la concentración fue del 20%. En general se observó, que el incremento en la concentración de principio activo no afectó a la eficacia del producto, especialmente cuando el tiempo de contacto fue de 30 minutos, a excepción de *A. flavus*.

Respecto a la sensibilidad de las diferentes cepas al desinfectante, *Cladosporium* fue el que presentó mayores reducciones en su recuento a las tres concentraciones y los dos tiempos de contacto. Contrariamente, *A. flavus* fue la que presentó una mayor resistencia, especialmente en los ensayos cuyo tiempo de contacto fue de 15 minutos. La diferencia en la eficacia de los amonios cuaternarios, entre géneros e incluso entre especies coincide con los resultados de Bundgaard-Nielsen y Nielsen (1996), quienes observaron variaciones en la efectividad de cuatro soluciones desinfectantes que contenían como principio activo, distintas mezclas de compuestos del amonio cuaternario en distintas especies del género *Penicillium*, siendo la especie más resistente *Penicillium roqueforti*.

Teniendo en cuenta estos resultados, podría decirse entonces que la concentración del 20% de cloruro de didecildimetilamonio con un tiempo de contacto de 30 minutos fue la más efectiva, es decir, y según lo establecido en la norma UNE-EN 13697 (Anónimo, 2002), produjo una reducción superior a 3 logaritmos decimales. Sin embargo, por la consistencia del producto que afecta al contacto del desinfectante con el microorganismo y por la elevada

concentración necesaria para que sea efectivo, no es recomendable en las formulaciones de productos desinfectantes, en los que habitualmente la concentración de este amonio cuaternario oscila entre un 1-10%.

El reducido efecto del amonio cuaternario sobre mohos y levaduras ha sido descrito por otros autores. Brake y Sheldon (1990), señalaron que concentraciones de 1,5 y 3% de amonio cuaternario, pulverizado sobre superficies de huevos, solamente ocasionaron reducciones de 0,41 y 0,56 log ufc/huevo, respectivamente. Igualmente, Gupta y col. (2002), demostraron que concentraciones del 0,5% de cloruro de benzalconio (amonio cuaternario), en ensayos de suspensión, no eran efectivas para inactivar el desarrollo de dos cepas clínicas de *A. ochraceus* en un período de 30 minutos, presentando una alta viabilidad incluso después de 24 h en contacto con el desinfectante. En el mismo estudio, los autores evaluaron el efecto de tres formulaciones comerciales en aerosol, pulverizadas sobre placas de agar Sabouraud previamente inoculadas con el moho, observando que la inactivación de la cepa sólo se obtenía después de 3 días de contacto, calificando que su efecto es más fungistático que fungicida.

**Tabla 30.** Eficacia fungicida de las tres concentraciones del amonio cuaternario (cloruro de didecildimetilamonio) sobre las cinco cepas fúngicas, expresados como reducción del logaritmo decimal (media  $\pm$  desviación estándar).

CEPA	TIEMPO DE CONTACTO	PRINCIPIO ACTIVO		
		20%	35%	50%
<i>A. flavus</i>	15 min	2,04 $\pm$ 0,33 <sup>a A</sup>	1,40 $\pm$ 0,65 <sup>a A</sup>	1,42 $\pm$ 0,70 <sup>a A</sup>
	30 min	3,27 $\pm$ 0,05 <sup>a A</sup>	2,21 $\pm$ 0,10 <sup>b A</sup>	1,81 $\pm$ 0,12 <sup>c A</sup>
<i>A. niger</i>	15 min	4,24 $\pm$ 0,23 <sup>a B</sup>	2,91 $\pm$ 0,57 <sup>b B</sup>	2,83 $\pm$ 0,13 <sup>b B</sup>
	30 min	3,78 $\pm$ 1,09 <sup>a A</sup>	3,58 $\pm$ 0,81 <sup>a AB</sup>	3,01 $\pm$ 2,18 <sup>a AB</sup>
<i>Cladosporium</i>	15 min	4,84 $\pm$ 0,24 <sup>a B</sup>	5,21 $\pm$ 0,28 <sup>a C</sup>	5,21 $\pm$ 0,28 <sup>a C</sup>
	30 min	5,32 $\pm$ 0,02 <sup>a A</sup>	5,32 $\pm$ 0,02 <sup>a B</sup>	5,32 $\pm$ 0,02 <sup>a B</sup>
<i>Penicillium</i>	15 min	2,69 $\pm$ 0,35 <sup>a AB</sup>	1,94 $\pm$ 0,18 <sup>a AB</sup>	5,22 $\pm$ 0,42 <sup>b C</sup>
	30 min	3,83 $\pm$ 0,69 <sup>a A</sup>	4,63 $\pm$ 1,74 <sup>a B</sup>	5,11 $\pm$ 0,70 <sup>a B</sup>
<i>Rhizopus</i>	15 min	3,14 $\pm$ 1,71 <sup>a AB</sup>	1,48 $\pm$ 0,30 <sup>a A</sup>	3,22 $\pm$ 0,43 <sup>a B</sup>
	30 min	3,55 $\pm$ 2,30 <sup>a A</sup>	1,54 $\pm$ 0,12 <sup>a A</sup>	3,51 $\pm$ 0,16 <sup>a AB</sup>

<sup>a-c</sup>: Letras diferentes en la misma fila corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

<sup>A-C</sup>: Letras diferentes en la misma columna (mayúscula), corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), para cada tiempo de contacto.

### 2.1.2. Desinfectante utilizado en la industria

Los resultados mostraron que la concentración del 1% a los dos tiempos de contacto fue efectiva para reducir en más de 3 unidades logarítmicas, los recuentos fúngicos de todas las cepas bajo las condiciones evaluadas, excepto para *A. flavus*, que resistió la acción fungicida en un tiempo de contacto de 15 minutos. Cuando la concentración de desinfectante se redujo a la mitad (0,5%), este perdió efectividad sobre las dos cepas de *Aspergillus* y la de *Penicillium*. En la cepa de *Cladosporium*, se observó acción fungicida cuando el tiempo de contacto fue de 30 minutos. El género *Rhizopus* fue el que demostró mayor sensibilidad al efecto de este desinfectante en los dos tiempos de contacto (**Tabla 31**).

Se puede decir entonces que *A. flavus*, igual que en el caso del amonio cuaternario, fue el moho más resistente a la acción de este desinfectante, bajo las condiciones ensayadas. Mientras que la mayor sensibilidad la presentó la cepa de *Rhizopus*.

En general, este desinfectante mostró una buena efectividad fungicida sobre los cinco aislamientos evaluados en este experimento, que a su vez, se corresponden con los cuatro géneros fúngicos aislados mayoritariamente en las superficies de la misma industria. Teniendo en cuenta la composición de este desinfectante (glutaraldehído 2%, formol 1,52% y cloruro de didecildimetilamonio 5%) efectivo en solución al 1%, y los resultados obtenidos para este mismo amonio cuaternario, como único principio activo, podría decirse que el efecto fungicida de este producto se debe a la fuerte acción antifúngica de los aldehídos, los cuales actúan desnaturalizando proteínas y enzimas y, dañando la membrana celular (Cloete, 2003; Pap y col., 2006). Esta actividad fungicida derivada posiblemente del glutaraldehído, coincide con lo señalado por Tortorano y col. (2005), quienes obtuvieron reducciones de  $10^4$  logaritmos decimales en la viabilidad de *A. fumigatus*, como consecuencia de su exposición al 1,6% de glutaraldehído, en un tiempo inferior a 5 minutos, en ensayos de suspensión. Igualmente, Pap y col. (2006), obtuvieron un buen efecto desinfectante sobre *A. niger* ATCC 16404, en una superficie de acero inoxidable, con una solución basada en aldehídos (1%), y el mejor con una solución cuyo agente activo fue glutaraldehído al 1%.



**Tabla 31.** Eficacia fungicida de las tres concentraciones del desinfectante industrial (5% cloruro de didecildimetilamonio, 2% glutaraldehído y 1,52% formol) sobre las cinco cepas fúngicas, expresados como reducción del logaritmo decimal (media  $\pm$  desviación estándar).

CEPA	TIEMPO DE CONTACTO	CONCENTRACIONES DE DESINFECTANTE		
		0,1%	0,5%	1%
<i>A. flavus</i>	15 min	1,00 $\pm$ 0,29 <sup>a AB</sup>	1,77 $\pm$ 0,46 <sup>ab A</sup>	2,55 $\pm$ 0,31 <sup>b A</sup>
	30 min	1,20 $\pm$ 0,05 <sup>a BC</sup>	2,19 $\pm$ 0,21 <sup>b AB</sup>	3,92 $\pm$ 0,14 <sup>c A</sup>
<i>A. niger</i>	15 min	0,64 $\pm$ 0,13 <sup>a A</sup>	1,67 $\pm$ 0,19 <sup>a A</sup>	3,35 $\pm$ 1,49 <sup>a A</sup>
	30 min	0,35 $\pm$ 0,50 <sup>a A</sup>	1,86 $\pm$ 0,89 <sup>ab A</sup>	3,78 $\pm$ 1,09 <sup>b A</sup>
<i>Cladosporium</i>	15 min	1,12 $\pm$ 0,71 <sup>a AB</sup>	2,20 $\pm$ 0,74 <sup>ab A</sup>	4,10 $\pm$ 0,29 <sup>b A</sup>
	30 min	0,69 $\pm$ 0,03 <sup>b AB</sup>	3,35 $\pm$ 0,74 <sup>a BC</sup>	4,91 $\pm$ 0,59 <sup>a A</sup>
<i>Penicillium</i>	15 min	1,70 $\pm$ 0,20 <sup>a B</sup>	1,76 $\pm$ 0,13 <sup>b A</sup>	3,11 $\pm$ 0,06 <sup>b A</sup>
	30 min	1,79 $\pm$ 0,18 <sup>a C</sup>	1,87 $\pm$ 0,09 <sup>b A</sup>	4,98 $\pm$ 1,25 <sup>b A</sup>
<i>Rhizopus</i>	15 min	1,41 $\pm$ 0,26 <sup>a AB</sup>	3,68 $\pm$ 0,24 <sup>a B</sup>	4,43 $\pm$ 0,25 <sup>b A</sup>
	30 min	1,06 $\pm$ 0,14 <sup>a B</sup>	3,82 $\pm$ 0,26 <sup>a C</sup>	3,89 $\pm$ 0,16 <sup>b A</sup>

a-c: Letras diferentes en la misma fila corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A-C: Letras diferentes en la misma columna (mayúscula), corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), para cada tiempo de contacto.

### 2.1.3. Hipoclorito sódico

En la evaluación de la actividad del hipoclorito sódico en las 5 cepas fúngicas se observó que la concentración de 0,1% de hipoclorito sódico (1000 mg/l de cloro libre), fue la que mostró mayor actividad fungicida en los dos tiempos de contacto (**Tabla 32**). La concentración de 0,05% también fue efectiva sobre las cepas de *A. niger*, *Cladosporium* y *Rhizopus* en los dos tiempos de contacto, mientras que sobre la cepa de *A. flavus* sólo presentó efectividad en el mayor tiempo de acción. Por el contrario, la cepa de *Penicillium* fue resistente a esta concentración, incluso a los 30 minutos. La resistencia de *A. flavus* a los desinfectantes ya ha sido descrita por Andrews y col. (1997), siendo según ellos, uno de los hongos conidiogénicos más resistentes al cloro en tratamientos de desinfección superficial.

**Tabla 32.** Eficacia fungicida de las tres concentraciones de hipoclorito sódico sobre las cinco cepas fúngicas, expresados como reducción del logaritmo decimal (media  $\pm$  desviación estándar).

CEPA	TIEMPO DE CONTACTO	PRINCIPIO ACTIVO		
		0,01% (100 mg/l)	0,05% (500 mg/l)	0,1% (1000 mg/l)
<i>A. flavus</i>	15 min	1,00 $\pm$ 0,31 <sup>a AB</sup>	2,14 $\pm$ 0,87 <sup>ab AB</sup>	3,25 $\pm$ 0,14 <sup>b A</sup>
	30 min	1,19 $\pm$ 0,03 <sup>a AB</sup>	3,45 $\pm$ 0,53 <sup>b AB</sup>	5,05 $\pm$ 0,03 <sup>c B</sup>
<i>A. niger</i>	15 min	1,02 $\pm$ 0,32 <sup>a AB</sup>	3,68 $\pm$ 1,24 <sup>b ABC</sup>	3,83 $\pm$ 0,13 <sup>b A</sup>
	30 min	0,57 $\pm$ 0,81 <sup>a A</sup>	3,78 $\pm$ 1,09 <sup>b B</sup>	3,41 $\pm$ 0,56 <sup>b A</sup>
<i>Cladosporium</i>	15 min	0,66 $\pm$ 0,22 <sup>a A</sup>	3,93 $\pm$ 0,39 <sup>b BC</sup>	4,22 $\pm$ 1,01 <sup>b A</sup>
	30 min	1,00 $\pm$ 0,09 <sup>a AB</sup>	4,51 $\pm$ 0,02 <sup>b B</sup>	4,52 $\pm$ 0,16 <sup>b B</sup>
<i>Penicillium</i>	15 min	1,72 $\pm$ 0,21 <sup>a C</sup>	1,85 $\pm$ 0,20 <sup>b A</sup>	3,72 $\pm$ 0,28 <sup>b A</sup>
	30 min	1,80 $\pm$ 0,19 <sup>a B</sup>	2,02 $\pm$ 0,14 <sup>a A</sup>	4,68 $\pm$ 0,38 <sup>b B</sup>
<i>Rhizopus</i>	15 min	1,56 $\pm$ 0,05 <sup>a BC</sup>	4,27 $\pm$ 0,04 <sup>b C</sup>	3,52 $\pm$ 0,26 <sup>c A</sup>
	30 min	1,74 $\pm$ 0,18 <sup>a B</sup>	3,82 $\pm$ 0,51 <sup>b B</sup>	4,55 $\pm$ 0,35 <sup>b B</sup>

a-c: Letras diferentes en la misma fila corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A-C: Letras diferentes en la misma columna (mayúscula), corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), para cada tiempo de contacto.

El efecto fungicida del hipoclorito sódico con una concentración de 1000 mg/l de cloro libre observado en este experimento, coincide con los resultados de Reynolds y col. (2004), para concentraciones de 960 mg/l de este mismo principio activo con aislamientos de *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria* y *Aspergillus*, recuperados del interior de algunas viviendas. Estos autores obtuvieron reducciones de más de 5 logaritmos para todas las cepas, después de 5 minutos de exposición sobre superficies de cerámica no porosas, y tras 10 minutos, sobre superficies porosas del mismo material. Gupta y col. (2002), con concentraciones de principio activo mucho más elevadas (10000 mg/l de cloro libre) consiguieron la misma eficacia por ensayos de suspensión, sobre dos cepas de *A. ochraceus* en diferentes tiempos de exposición (15 y 30 minutos, 1 y 24 horas), siendo el único

desinfectante basado en hipoclorito de sodio que inhibió completamente el desarrollo de *Aspergillus* a partir de los 15 minutos de contacto.

Martyny y col. (2005), evaluaron el efecto inhibitorio de dos soluciones comerciales de hipoclorito de sodio sobre el desarrollo de *A. fumigatus* mediante ensayos en suspensión y en superficie, sobre tres materiales utilizados comúnmente en la construcción (tablas de madera, muros de yeso y enchape de madera); realizando recuentos de conidias visibles, estimaciones de viabilidad (siembras en placas de PDA) y visualización de cambios morfológicos en las conidias. Los resultados de las pruebas de suspensión por determinación ELISA, mostraron que los dos desinfectantes redujeron significativamente los niveles de antígeno producidos por el moho, con valores por debajo del límite de detección del equipo. Los recuentos de conidias visibles sobre las tres superficies fueron similares al control positivo, sin embargo, su viabilidad se redujo significativamente con los dos desinfectantes, así 9 de cada 10 conidias fueron estériles, indicando que las conidias estaban presentes pero no eran viables. Además de la pérdida de viabilidad, las conidias que fueron tratadas con los desinfectantes presentaron cambios morfológicos, con una disminución de su tamaño y pérdida de algunas estructuras superficiales, apareciendo no sólo más lisas sino también con pequeños agujeros en su superficie, en comparación con las conidias del control.

En general, las soluciones de hipoclorito de sodio son ampliamente utilizadas para desinfección de superficies duras (McDonnell y Russell, 1999). De igual manera, su eficacia como desinfectante superficial de granos de cereales y otros productos alimenticios, también ha sido ampliamente estudiada, sobre diversos géneros fúngicos. Sin embargo, la eficacia de este principio activo sólo se consiguió a concentraciones muy superiores ( $> 10000$  mg/l) a las obtenidas en nuestro estudio (1000 mg/l) (Ramakrishna y col., 1991; Abdel-Mallek y col., 1995; Andrews, 1996; Andrews y col., 1997; Koseki y col., 2004), posiblemente debido a su neutralización en presencia de materia orgánica (Criquelion y col., 2002).

#### 2.1.4. *Ácido peracético*

En la evaluación de la actividad del ácido peracético en las 5 cepas fúngicas, se observó que ninguna de las tres concentraciones de principio activo ensayadas en este experimento fue efectiva contra los cinco aislamientos evaluados (**Tabla 33**). Los resultados mostraron resistencia por parte de las dos cepas de *Aspergillus*, a las tres concentraciones de principio activo, en los dos tiempos de contacto. Por el contrario las cepas de *Cladosporium*,

*Penicillium* y *Rhizopus*, fueron sensibles a concentraciones de 0,1% de principio activo, desde los 15 minutos. Un comportamiento similar se presentó con estas tres cepas, a la concentración de 0,05% de ácido peracético, excepto para la cepa de *Penicillium* que sólo fue sensible cuando el fungicida actuó durante 30 minutos. Concentraciones de 0,01% de ácido peracético, no fueron efectivas para ninguna de las cinco cepas evaluadas. Sin embargo, podría decirse que la cepa más sensible a la actividad fungicida del ácido peracético fue *Rhizopus*, puesto que con esta concentración se presentaron reducciones entorno a las 2 unidades logarítmicas.

**Tabla 33.** Eficacia fungicida de las tres concentraciones de ácido peracético sobre las cinco cepas fúngicas, expresados como reducción del logaritmo decimal (media  $\pm$  desviación estándar).

CEPA	TIEMPO DE CONTACTO	PRINCIPIO ACTIVO		
		0,01%	0,05%	0,1%
<i>A. flavus</i>	15 min	0,93 $\pm$ 0,20 <sup>a A</sup>	0,96 $\pm$ 0,29 <sup>a A</sup>	1,09 $\pm$ 0,31 <sup>a A</sup>
	30 min	1,15 $\pm$ 0,09 <sup>aB</sup>	1,25 $\pm$ 0,02 <sup>a A</sup>	1,48 $\pm$ 0,18 <sup>a A</sup>
<i>A. niger</i>	15 min	0,66 $\pm$ 0,10 <sup>a A</sup>	0,72 $\pm$ 0,08 <sup>ab A</sup>	0,97 $\pm$ 0,09 <sup>b A</sup>
	30 min	0,38 $\pm$ 0,54 <sup>a A</sup>	0,66 $\pm$ 0,94 <sup>a A</sup>	0,87 $\pm$ 1,16 <sup>a A</sup>
<i>Cladosporium</i>	15 min	0,62 $\pm$ 0,29 <sup>a A</sup>	4,88 $\pm$ 0,74 <sup>b C</sup>	4,69 $\pm$ 0,59 <sup>b B</sup>
	30 min	0,72 $\pm$ 0,02 <sup>b A</sup>	4,77 $\pm$ 0,19 <sup>a B</sup>	5,12 $\pm$ 0,30 <sup>a B</sup>
<i>Penicillium</i>	15 min	1,71 $\pm$ 0,21 <sup>a B</sup>	2,31 $\pm$ 0,11 <sup>b B</sup>	5,05 $\pm$ 0,09 <sup>c B</sup>
	30 min	1,78 $\pm$ 0,18 <sup>a B</sup>	3,72 $\pm$ 0,29 <sup>b B</sup>	5,49 $\pm$ 0,16 <sup>c B</sup>
<i>Rhizopus</i>	15 min	2,21 $\pm$ 0,05 <sup>a C</sup>	4,43 $\pm$ 0,25 <sup>b C</sup>	4,15 $\pm$ 0,64 <sup>b B</sup>
	30 min	1,90 $\pm$ 0,31 <sup>a B</sup>	3,82 $\pm$ 0,51 <sup>b B</sup>	4,35 $\pm$ 0,63 <sup>b B</sup>

a-c: Letras diferentes en la misma fila corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A-C: Letras diferentes en la misma columna (mayúscula), corresponde a medias con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), para cada tiempo de contacto.

La elevada tolerancia del género *Aspergillus* al ácido peracético ya había sido descrita por Hilgren y Salverda (2000), quienes al evaluar la actividad fungicida de este principio activo (0,008%) en pruebas de suspensión, sobre tres géneros de mohos (*Aspergillus* ssp., *Penicillium* ssp. y *Cladosporium* ssp.), obtuvieron una alta resistencia por parte de

*Aspergillus*, con una reducción nula a los 10 minutos de contacto; mientras que la reducción que obtuvieron con *Cladosporium* fue de 4,18 a los 5 minutos de contacto. Sin embargo, existen diferencias entre los resultados obtenidos por estos autores para *Cladosporium*, puesto que, cuando nosotros utilizamos una concentración de 0,01% de este principio activo, obtuvimos sólo una reducción de 0,62 (log ufc), en un tiempo de contacto de 15 minutos. No obstante se debe tener en cuenta que en las superficies, los desinfectantes entran en contacto con los microorganismos sólo desde una dirección, mientras que en suspensión, los microorganismos están rodeados por el desinfectante y son más fácilmente destruidos (Grönholm y col., 1999). A pesar de que el método de ensayo fue diferente en los dos estudios, los valores de reducción para el género *Penicillium* fueron similares.

Los desinfectantes basados en ácido peracético han sido descritos como muy efectivos en bajas concentraciones por poseer un amplio espectro de actividad antimicrobiana y actuar sobre condiciones adversas tales como frío, presencia de proteínas y materiales orgánicos (Reuter, 1998). Además, es preferido sobre otros agentes antimicrobianos comúnmente utilizados, como el hipoclorito, debido a que es un producto biodegradable (Hilgren y Salverda, 2000). Sin embargo, nuestro estudio mostró que a concentraciones de 0,1% de principio activo, no tiene efecto fungicida sobre *Aspergillus*.

Podría decirse que de forma global, los resultados de este estudio coinciden con lo referido por Pasanen y col. (1997), quienes al evaluar la eficacia de diferentes soluciones desinfectantes (preparadas según recomendaciones de los fabricantes para limpieza de superficies en edificios no industriales), sobre el desarrollo fúngico de *P. verrucosum*, *A. versicolor*, *Cladosporium sphaerospermum* y *Aureobasidium pullulans*, inoculado sobre EMA y dos materiales utilizados en la construcción (papel pintado y hojas de metal), encontraron que el amonio cuaternario no inhibía el crecimiento de los hongos sobre papel pintado y además, su efecto biocida se reducía con el tiempo sobre las hojas de metal y el agar; mientras que el hipoclorito de sodio fue uno de los dos desinfectantes que les permitió obtener los mejores resultados en las tres superficies bajo las condiciones de su estudio.

La eficacia de un desinfectante depende de su concentración, el tiempo de contacto, la temperatura y el pH en los que es utilizado, de su capacidad de combinarse con material orgánico y de la variedad de microorganismos presentes en la superficie (Pasanen y col., 1997). En general los resultados obtenidos en este estudio demostraron que tanto el hipoclorito sódico preparado al 0,1% (1000 mg/l de cloro libre) a 15 y 30 minutos de

contacto, como el desinfectante utilizado en la industria (basado en glutaraldehído, formol y amonio cuaternario) al 1% y a 30 minutos, cumplieron con los requisitos establecidos en la norma UNE-EN 13697 para ser considerado como efectivo sobre las cinco cepas evaluadas. Debido a las altas concentraciones en las que se utilizó el amonio cuaternario, podría decirse, que éste fue el principio activo que menor actividad fungicida presentó. Sin embargo, se debe tener en cuenta que con la menor concentración evaluada en este experimento (20%), se observó un incremento de su actividad para todas las cepas, aunque como se mencionó anteriormente, necesitó un tiempo de 30 minutos. Adicionalmente, Bundgaard-Nielsen y Nielsen (1996), señalaron que la resistencia de los mohos y las levaduras, depende en gran parte de la cepa y las especies del aislamiento, así como de los componentes activos del desinfectante, lo cual coincide con lo determinado en nuestro estudio, ya que el comportamiento de cada una de las cepas evaluadas, dependió tanto del desinfectante y su concentración, como del tiempo de contacto.

Los productos desinfectantes con actividad fungicida de aplicación en la industria alimentaria son registrados como plaguicidas en el Ministerio de Sanidad y Consumo y, deben cumplir los requisitos de la norma de ensayos en suspensión UNE-EN 1650 o la norma de ensayos en superficies no porosas UNE-EN 13697 (Anónimo, 2007). Según nuestros resultados, la cepa recomendada para dichos ensayos no sería la más adecuada teniendo en cuenta que mostró una mayor susceptibilidad que *A. flavus* para compuestos basados en hipoclorito de sodio, en amonio cuaternario y/o glutaraldehído y que *Penicillium* para el hipoclorito sódico. Además, en dichas normas la efectividad se valora únicamente con un replicado, lo cual puede considerarse insuficiente teniendo en cuenta la variabilidad observada en nuestro estudio. Las consecuencias de estas deficiencias implicarían la utilización de productos desinfectantes en concentraciones inferiores a las necesarias para la microbiota fúngica de una industria determinada.

Dentro del plan de limpieza y desinfección de una industria es necesario conocer la resistencia de la microbiota predominante en las superficies y el ambiente. Utilizar un único desinfectante puede no ser suficiente, por lo que se aconseja realizar un plan de desinfección en el que al menos se utilicen en rotación, dos desinfectantes con diferentes principios activos, con el fin de mantener un control sobre los mohos y las levaduras (Bundgaard-Nielsen y Nielsen, 1996). De acuerdo con esta recomendación y teniendo en cuenta que este estudio se realizó con los cuatro aislamientos fúngicos predominantes sobre las superficies de

la industria, sería necesario incluir en el plan de higienización, un desinfectante que contenga cloro como principio activo, en una concentración efectiva de 1000 mg/l aunque quizá su uso sea limitado por su poder corrosivo (Criquelion y col., 2002).

## **VI. CONCLUSIONES**

---



1. El medio de cultivo con peptona de soja y extracto de levadura al 0,5%, gelatina al 8%, cloranfenicol al 0,025%, ajustado a un pH de 5,5, permitió realizar mediante impedanciometría el recuento de esporas de los principales géneros fúngicos (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Rhizopus*) aislados en alimentos y superficies de una industria elaboradora de alimentos deshidratados a concentraciones entre  $10^2$  y  $10^6$  ufc/g. Sin embargo, cuando en la matriz están presentes diferentes géneros fúngicos el tiempo de detección depende de la microbiota predominante, por lo que es necesario realizar la calibración adaptada a esta microbiota, previo al establecimiento de los límites críticos en el tiempo de detección. A pesar de este inconveniente, tiene la ventaja de reducir el tiempo necesario para realizar el recuento a 26-70 horas, dependiendo del género fúngico predominante, especialmente cuando estos recuentos son bajos.
2. Para la evaluación y verificación del plan de limpieza y desinfección de la industria de alimentos deshidratados se han propuesto diferentes límites críticos (entre 8,5 y 40 ufc/100 cm<sup>2</sup>) en función de la técnica de muestreo y análisis utilizada. Sin embargo, su aplicación para la calificación de aceptabilidad varió en función de la técnica. La siembra directa del disco fue la más rigurosa mientras que las de hisopado fueron las más permisivas. La técnica impedanciométrica presentó una utilidad limitada como sistema de verificación, ya que su límite de detección fue superior a los límites críticos establecidos. Así mismo, la técnica de ATP no fue adecuada para determinar la contaminación fúngica, mostrando una reducida correlación con los recuentos.
3. En la industria de alimentos deshidratados la zona que presentó un mayor riesgo de contaminación cruzada fue el área de post-tratamiento, en la que se determinaron los mayores recuentos fúngicos, así como el mayor porcentaje de superficies rechazables (50-100%).
4. En la comercialización de los alimentos, a pesar de que la contaminación fúngica generalizada en las superficies fue reducida, las secciones de frutas y verduras frescas y panadería fueron las que presentaron una mayor contaminación independientemente de la técnica de muestreo y análisis utilizada. Las levaduras fueron la microbiota predominante en las secciones donde se comercializan productos a temperatura de refrigeración, mientras que en los comercializados a temperatura ambiente fueron predominantes los mohos del género *Penicillium* y *Cladosporium*.

5. Entre las técnicas de impronta, el sistema Petrifilm™ mostró numerosos inconvenientes, que no lo hacen recomendable para la evaluación de la contaminación fúngica de las superficies.
6. La actividad fungicida de los desinfectantes depende del género y la especie fúngica, así como de su principio activo. El género *Aspergillus* fue el que presentó una mayor tolerancia a los desinfectantes basados en amonio cuaternario, glutaraldehído y ácido peracético, mientras que *Penicillium* presentó la mayor resistencia al hipoclorito sódico. Por lo que se debe conocer la resistencia de la microbiota predominante en las superficies y el ambiente para aplicar adecuadamente el plan de limpieza y desinfección.
7. En la valoración de la actividad fungicida las normas recomiendan una cepa de *Aspergillus niger*. Sin embargo, en este estudio mostró una mayor susceptibilidad en comparación con otras aisladas de la industria como *A. flavus* o *Penicillium*.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

---

- 
- Abdel-Mallek, A.Y., Hemida, S.K., Bagy, M.M. 1995. Studies on fungi associated with tomato fruits and effectiveness of some commercial fungicides against three pathogens. *Mycopathologia*, 130: 109-116.
- Andrews, S. 1996. Evaluation of surface disinfection procedures for enumerating fungi in foods: a collaborative study. *International Journal of Food Microbiology*, 29: 177-184.
- Andrews, S., Pardoel, D., Harun, A., Treloar, T. 1997. Chlorine inactivation of fungal spores on cereal grains. *International Journal of Food Microbiology*, 35: 153-162.
- Anónimo. 1976. Real Decreto 2685/1976, de 16 octubre. Reglamentación Técnico-Sanitaria para elaboración, circulación y comercio de preparados para regímenes dietéticos y/o especiales. *Boletín Oficial del Estado*, 284: 23543.
- Anónimo. 1982. Real Decreto 1124/1982, de 30 abril. Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, fabricación, circulación y comercio. *Boletín Oficial del Estado*, 133: 15069.
- Anónimo. 1987. Real Decreto 1094/1987, de 26 junio. Reglamentación Técnico-Sanitaria para elaboración, circulación y comercio de cereales en copos o expandidos. *Boletín Oficial del Estado*, 215: 27338.
- Anónimo. 1993. Biological particles in indoor environments. Report No. 12. Commission of the European Communities. Directorate general for science, research and development. Joint Research Centre – Environment Institute, Luxembourg.
- Anónimo. 1997. UNE-EN 1275. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad fúngica básica. Método de ensayo y requisitos (Fase 1). AENOR.
- Anónimo. 1998. UNE-EN 1650. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en la colectividad. Métodos de ensayo y requisitos (Fase 2, etapa 1). AENOR.
- Anónimo. 2000. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). Microorganismos de los alimentos. 1, Su significado y métodos de enumeración. 2ª ed. Acribia, Zaragoza.
- Anónimo. 2001. Guía para la elaboración de un plan de limpieza y desinfección: de aplicación en empresas del sector alimentario. Acribia, Zaragoza.
- Anónimo. 2002. UNE-EN 13697. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de superficie no porosa para la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria, en el hogar y en colectividad. Método de ensayo sin acción mecánica y requisitos (Fase 2/etapa2). AENOR.
- Anónimo. 2003a. Code of Practice for the prevention and reduction of mycotoxin contamination in cereals, including annexes on ochratoxin A, zearalenone, fumonisins and trichothecenes. *Codex Alimentarius Commission*, (CAC/RCP 51-2003).

Anónimo. 2003b. Code of practice for the prevention of patulin contamination in apple juice and apple juice ingredients in other beverages. *Codex Alimentarius Commission*, CA/RCP 50-2003.

Anónimo. 2004. ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.

Anónimo. 2006. Reglamento (CE) No 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L364-5-L364/24.

Anónimo. 2007. Requisitos para la inscripción en el Registro. <http://www.msc.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/prodQuimicos/sustPreparatorias/biocidas/inscriRegistro.htm>.

Arx, J.A.v. 1981. The Genera of fungi sporulating in pure culture. 3rd. J. Cramer, Vaduz.

Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J.N., Johansen, C., Gram, L. 2003. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87: 239-250.

Baltes, W. 1990. Rapid methods for analysis of food and food raw material. Behr's Verlag, Hamburg.

Barnett, H.L.; Hunter; B.B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Pub., Minneapolis.

Berenguer-Soler, J. 2000. Hongos. En: *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2ª ed. Díaz de Santos, Madrid. pp: 141-148.

Beuchat, L.R. 1992. Media for detecting and enumerating yeasts and molds. *International Journal of Food Microbiology*, 17: 145-158.

Beuchat, L.R.; Cousin, M.A. 2002. Yeasts and molds. En: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Editores: Downes, F.P.; Keith, I. 4th. American Public Health Association, Washington. pp: 209-215.

Beuchat, L.R., Nail, B.V., Brackett, R.E., Fox, T.L. 1990. Evaluation of a culture film (PetrifilmReg. YM) method for enumerating yeasts and molds in selected dairy and high-acid foods. *Journal of Food Protection*, 53: 869-874.

Beuchat, L.R., Scouten, A.J., Jablonska, J. 2002. Influence of composition of diluent on populations of yeasts and moulds recovered from raw fruits. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 399-402.

Boisnault, A., Cassaing, S., Morelle, K., Dubarry, A., Berry, A., Linas, M.D., Rance, F. 2005. Allergie alimentaire a une moisissure presente sur une croute de fromage : a propos d'une observation pediatrique. *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 45: 597-600.

- 
- Bondy, G.S., Pestka, J.J. 2000. Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*, 3: 109-143.
- Bornehag, C.G., Blomquist, G., Gyntelberg, F., Jarvholm, B., Malmberg, P., Nordvall, L., Nielsen, A., Pershagen, G., Sundell, J. 2001. Dampness in buildings and health. Nordic Interdisciplinary Review of the Scientific Evidence on Associations between Exposure to "Dampness" in Buildings and Health Effects (NORDDAMP). *Indoor Air*, 11: 72-86.
- Boschke, E., Steingroewer, J., Ripperger, S., Klingner, E., Bley, T. 2002. Biomonitoring by combination of immunomagnetic separation and direct epifluorescence filter technique. *European Cells and Materials*, 3: 146-147.
- Boulangé-Petermann, L. 1996. Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: A review with special reference to the food industry. *Biofouling*, 10: 275-300.
- Bousser, C. 2002. Combinación de la limpieza y la desinfección. En: *Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección*. Editores: Leveau, J.-Y.; Bouix, M. Mundi-Prensa, Madrid. pp: 303-320.
- Brake, J., Sheldon, B.W. 1990. Effect of a quaternary ammonium sanitizer for hatching eggs on their contamination, permeability, water loss, and hatchability. *Poultry science*, 69: 517-525.
- Bredholt, S., Maukonen, J., Kujanppää, K., Alanko, T., Olofson, U., Husmark, U., Sjöberg, A.M., Wirtanen, G. 1999. Microbial methods for assessment of cleaning and disinfection of food-processing surfaces cleaned in a low-pressure system. *European Food Research and Technology*, 209: 145-152.
- Brera, C., Caputi, R., Miraglia, M., Iavicoli, I., Salerno, A., Carelli, G. 2002. Exposure assessment to mycotoxins in workplaces: aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera. *Microchemical Journal*, 73: 167-173.
- Brul, S., Klis, F.M. 1999. Mechanistic and mathematical inactivation studies of food spoilage fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 27: 199-208.
- Bullerman, L.B. 2002. Processing effects on mycotoxins: Introduction. En: *Mycotoxins and Food Safety*. Editores: DeVries, J.W.; Trucksess, M.W.; Jackson, L.S. Kluwer Academic/Plenum, New York. pp: 155-156.
- Bullerman, L.B. 1999. Mycotoxins-Classification. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Editor: Richard, K.R. Elsevier, Oxford. pp: 1512-1520.
- Bundgaard-Nielsen, K., Nielsen, P.V. 1996. Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. *Journal of Food Protection*, 59: 268-275.
- Campbell, C.K.; Johnson, M. E.; Philpot, C. M.; Warnock, D. W. 1996. Identification of pathogenic fungi. Public Health Laboratory Service, London.
- Carpentier, B., Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food-industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 499-511.

Carreras, E. 2006. Preventing exposure to moulds. *Clinical Microbiology and Infection*, 12: 77-83.

Chetkowski, J. 1991. Cereal Grain: mycotoxins, fungi and quality in drying and storage. Elsevier, Amsterdam.

Cloete, T.E. 2003. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51: 277-282.

Comi, G., Orlic, S., Redzepovic, S., Urso, R., Iacumin, L. 2004. Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 29-34.

Cooley, J.D., Wong, W.C., Jumper, C.A., Straus, D.C. 1998. Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occupational and Environmental Medicine*, 55: 579.

Cousin, M.A. 1996. Chitin as a measure of mold contamination of agricultural commodities and foods. *Journal of Food Protection*, 59: 73-81.

Criquelion, J.; Durand, F.; Olivier, F.; Rauwel, G.; Sabat, F. 2002. Características generales de las funciones químicas desinfectantes. En: *Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección*. Editores: Leveau, J.-Y.; Bouix, M. Mundi-Prensa, Madrid. pp: 247-282.

Crozier, J., Thomas, S.E., Aime, M.C., Evans, H.C., Holmes, K.A. 2006. Molecular characterization of fungal endophytic morphospecies isolated from stems and pods of *Theobroma cacao*. *Plant Pathology*, 55: 783-791.

D'mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69: 155-166.

Davidson, C.A., Griffith, C.J., Peters, A.C., Fielding, L.M. 1999. Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness DATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing. *Luminescence*, 14: 33-38.

de Boer, E., Beumer, R.R. 1999. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 119-130.

De Ruiter, G.A., Notermans, S.H.W., Rombouts, F.M. 1993. New methods in food mycology. *Trends in Food Science & Technology*, 4: 91-97.

Deacon, J.W. 1997. Modern mycology. Blackwell science, Oxford.

Deak, T., Beuchat, L.R. 1993. Comparison of conductimetric and traditional plating techniques for detecting yeasts in fruit juices. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 546-550.

Deak, T. 1995. Methods for the rapid detection and identification of yeasts in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 6: 287-292.

- 
- Deibel, K.E.; Swanson, K.M.J. 2002. Cereal and cereal products. En: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Editor: Frances Pouch Downes, K.I. 4th ed. American Public Health Association, Washington. pp: 549-553.
- Delage, N., d'Harlingue, A., Colonna Ceccaldi, B., Bompeix, G. 2003. Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine. *Food Control*, 14: 225-227.
- Dewey, F.M., Macdonald, M.M., Phillips, S.I. 1989. Development of monoclonal-antibody-ELISA, monoclonal-antibody-DOT-BLOT and monoclonal-antibody-DIP-STICK immunoassays for *Humicola lanuginosa* in rice. *Journal of General Microbiology*, 135: 361-374.
- Dewey, F.M., Macdonald, M.M., Phillips, S.I., Priestley, R.A. 1990. Development of monoclonal-antibody-ELISA and monoclonal-antibody-DIP-STICK immunoassays for *Penicillium islandicum* in rice grains. *Journal of General Microbiology*, 136: 753-760.
- Duran, G.M., Marshall, D.L. 2002. Rapid determination of sanitizer concentration using impedance-based methods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 65: 1422-1427.
- Edwards, S.G. 2004. Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. *Toxicology Letters*, 153: 29-35.
- Ellerbroek, L. 1997. Airborne microflora in poultry slaughtering establishments. *Food Microbiology*, 14: 527-531.
- Entis, P.; Fung, D.Y.C.; Griffiths, M.W.; McIntyre, L.; Russell, S.; Sharpe, A.N.; Tortorello, M.L. 2001. Rapid methods for detection, identification, and enumeration. En: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Editores: Downes, F.P.; Ito, K. Fourth Edition. American Public Health Association, Washington, D.C. pp: 105-111.
- FAO 1998. Animal feeding and food safety. En: *Report of an FAO Expert Consultation Rome, 10-14 March 1997*. FAO Food and nutrition paper: 69, Rome.
- FAO 2004. Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. En: *Estudio FAO Alimentación y Nutrición 81*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Thrane, U. 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 85-102.
- Firstenberg-Eden, R. 1985. Electrical impedance method for determining microbial quality of foods. En: *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology*. Editor: Habermehl, K.O. Springer, Berlin. pp: 679-687.
- Fischer, G., Dott, W. 2003. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Archives of Microbiology*, 179: 75-82.



Foschino, R., Picozzi, C., Civardi, A., Bandini, M., Faroldi, P. 2003a. Comparison of surface sampling methods and cleanability assessment of stainless steel surfaces subjected or not to shot peening. *Journal of Food Engineering*, 60: 375-381.

Foschino, R., Picozzi, C., Giorgi, E., Bontempi, A. 2003b. Cleanability of floor surface materials in terms of removal of microorganisms at a low contamination level. *Annals of Microbiology*, 53: 253-265.

Francis, G.A., Thomas, C., O'Beirne, D. 1999. The microbiological safety of minimally processed vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 34: 1-22.

Frank, J.F., Chmielewski, R. 2001. Influence of surface finish on the cleanability of stainless steel. *Journal of Food Protection*, 64: 1178-1182.

Frazier, W.C.; Westhoff, D. C. 1985. Microbiología de los alimentos. 3ª ed. Acribia, Zaragoza.

Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. 1993. Saprophytic spoilage association in food mycology with emphasis on *Penicillium* species. En: *Occurrence and Significance of Mycotoxins*. Editor: K.A.Scudamore. Central Science Laboratory, Slough. pp: 146-171.

Frisvad, J.C., Filtenborg, O. 1988. Specific mycotoxin producing *Penicillium* and *Aspergillus* mycoflora of different foods. *Proceedings of the Japanese Association of Mycotoxicology*, Suppl. 1: 163-166.

Fujikawa, H., Wauke, T., Kusunoki, J., Noguchi, Y., Takahashi, Y., Ohta, K., Itoh, T. 1997. Contamination of microbial foreign bodies in bottled mineral water in Tokyo, Japan. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 287-291.

Fung, D.Y.C. 2002. Rapid methods and automation in microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1: 3-22.

Fuster-Valls, N., Hernandez-Herrero, M., Marin-de-Mateo, M., Rodriguez-Jerez, J.J. 2007. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*, En prensa.

Galvano, F., Piva, A., Ritieni, A., Galvano, G. 2001. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. *Journal of Food Protection*, 64: 120-131.

García-Ramírez, A. 1989. Programa de limpieza e higiene. *Alimentaria*, Marzo: 29-50.

Gent, J.F., Ren, P., Belanger, K., Triche, E., Bracken, M.B., Holford, T.R., Leaderer, B.P. 2002. Levels of household mold associated with respiratory symptoms in the first year of life in a cohort at risk for asthma. *Environmental Health Perspectives*, 110: A781-A786.

Geornaras, I., de Jesus, A.E., van Zyl, E., von Holy, A. 1996. Bacterial populations associated with poultry processing in a South African abattoir. *Food Microbiology*, 13: 457-465.

- 
- Ghannoum, M.A., Rice, L.B. 1999. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 501-517.
- Gibson, H., Elton, R., Peters, W., Holah, J.T. 1995. Surface and suspension testing: Conflict or complementary. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 36: 375-384.
- Gillet, A. 2002. Mecanismos de acción de los desinfectantes y sus formulaciones. En: *Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección*. Editores: Leveau, J.Y.; Bouix, M. Mundi-Prensa, Madrid. pp: 283-302.
- Girardin, H. 1997. Detection of filamentous fungi in foods. *Sciences des Aliments*, 17: 3-19.
- Gonçalves, A.B., Paterson, R.R., Lima, N. 2006. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209: 257-264.
- Gots, R.E., Layton, N.J., Pirages, S.W. 2003. Indoor health: Background levels of fungi. *AIHA Journal*, 64: 427-438.
- Gotsch, N. 1997. Cocoa crop protection: an expert forecast on future progress, research priorities and policy with the help of the Delphi survey. *Crop Protection*, 16: 227-233.
- Gourama, H., Bullerman, L.B. 1995. Detection of molds in foods and feeds: Potential rapid and selective methods. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 58: 1389-1394.
- Griffit, C.J., Davidson, C.A., Peters, A.C., Fielding, L.M. 1997. Towards a strategic cleaning assessment programme: hygiene monitoring and ATP luminometry, and options appraisal. *Food Science Technology Today*, 11: 15-24.
- Grönholm, L., Wirtanen, G., Ahlgren, K., Nordström, K., Sjöberg, A.-M. 1999. Screening of antimicrobial activities of disinfectants and cleaning agents against foodborne spoilage microbes. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, 208: 289-298.
- Gupta, A.K., Ahmad, I., Summerbell, R.C. 2002. Fungicidal activities of commonly used disinfectants and antifungal pharmaceutical spray preparations against clinical strains of *Aspergillus* and *Candida* species. *Medical Mycology*, 40: 201-208.
- Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K., Seydim, A.C. 2004. Use of ozone in the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37: 453-460.
- Hartman, P.A.; Swaminathan, B.; Curiale, M.S.; Firstenberg-Eden, R.; Sharpe, A.N.; Cox, N.A.; Fung, D.Y.C.; Goldschmidt, M.C. 1992. Rapid methods and automation. En: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Editores: Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. 3<sup>th</sup> ed. American Public Health Association (APHA), Washington. pp: 665-746.
- Heaton, P.E., Butler, G.M., Callow, M.E. 1990. The floristic composition of moulds growing on walls of food and drink processing factories. *International Biodeterioration*, 26: 1-9.

- Hilgren, J.D., Salverda, J.A. 2000. Antimicrobial efficacy of a peroxyacetic/octanoic acid mixture in fresh-cut-vegetable process waters. *Journal of Food Science*, 65: 1376-1379.
- Hirai, Y. 1991. Survival of bacteria under dry conditions - from a viewpoint of nosocomial infection. *Journal of Hospital Infection*, 19: 191-200.
- Hobson, N.S., Tothill, I., Turner, A.P.F. 1996. Microbial detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 11: 455-477.
- Hocking, A.D. 1997. Understanding and controlling mould spoilage in cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 52: 123-124.
- Hocking, A.D., Pitt, J.I. 1980. Dichloran-Glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 39: 488-492.
- Holah, J.T. 1995a. Disinfection of food production areas. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 14: 343-363.
- Holah, J.T. 1995b. Special Needs for Disinfectants in Food-Handling Establishments. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties*, 14: 95-104.
- Holah, J.T., Betts, R.P., Thorpe, R.H. 1989. The use of epifluorescence microscopy to determine surface hygiene. *International Biodeterioration*, 25: 147-153.
- Holah, J.T., Lavaud, A., Peters, W., Dye, K.A. 1998. Future techniques for disinfectant efficacy testing. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41: 273-279.
- Houhala, K.; Rahkio, M.; Levo, S.; Sauna-Aho, R.; Valikyla, T. 1996. A guide book to monitoring surface hygiene. Vammalan Kirjapaino Oy, Vammala.
- Hunter, C.A., Grant, C., Flannigan, B., Bravery, A.F. 1988. Mould in buildings: the air spora of domestic dwellings. *International Biodeterioration*, 24: 81-101.
- Jarvis, B. 1973. Comparison of an improved rose bengal chlortetracycline agar with other media for selective isolation and enumeration of molds and yeasts in foods. *Journal of Applied Bacteriology*, 36: 723-727.
- Jarvis, B., Seiler, D.A.L., Ould, A.J.L., Williams, A.P. 1983. Observations on the enumeration of moulds in food and feedingstuffs. *Journal of Applied Bacteriology*, 55: 325-336.
- Jarvis, B.B. 2002. Chemistry and toxicology of molds isolated from water-damaged buildings. En: *Mycotoxins and Food Safety*. Editores: DeVries, J.W.; Trucksess, M.W.; Jackson, L.S. Kluwer Academic/Plenum, New York. pp: 43-52.
- Jarvis, B.B., Miller, J.D. 2005. Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66: 367-372.
- Jay, J. 2002. Microbiología moderna de los alimentos. 4ª ed. Acribia, Zaragoza.

- Jessen, B., Lammert, L. 2003. Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51: 265-269.
- Ji-Cheng, H., Ji-Wen, Y., Wei-Dong, L., Man-Dang, S., Feng, D., Jin-Yan, L. 2003. Impedance method for rapid detection of total counts of bacteria and fungi in bottled purified water. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 86: 719-721.
- Jones, M.V. 1998. Application of HACCP to identify hygiene risks in the home. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41: 191-199.
- Kabak, B., Dobson, A.D.W., Var, I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 46: 593-619.
- Kelley, J., Yaghmaie, P.A. 2001. Screening of fungal strains employed in the testing of plastics materials (Reprinted). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 48: 84-93.
- Kiermeier, F.; Mrozek, H. 2000. Introducción. En: *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*. Editor: Wildbrett, G. Acribia, Zaragoza. pp: 1-20.
- Kiermeier, F.; Wildbrett, G.; Mrozek, H. 2000. Productos químicos auxiliares para la limpieza y desinfección. En: *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*. Editor: Wildbrett, G. Acribia, Zaragoza. pp: 21-66.
- Kim, J.G., Yousef, A.E., Dave, S. 1999. Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *Journal of Food Protection*, 62: 1071-1087.
- Klich, M.A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.
- Koneman, E.W.; Allen, S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P. C.; Winn, W. C. 1999. Diagnóstico microbiológico : texto y atlas color. 5ª ed. Médica Panamericana, Buenos Aires.
- Koseki, S., Yoshida, K., Isobe, S., Itoh, K. 2004. Efficacy of acidic electrolyzed water for microbial decontamination of cucumbers and strawberries. *Journal of Food Protection*, 67: 1247-1251.
- Kumar, C.G., Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42: 9-27.
- Kure, C.F., Skaar, I., Brendehaug, J. 2004. Mould contamination in production of semi-hard cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 93: 41-49.
- Langsrud, S., Sidhu, M.S., Heir, E., Holck, A.L. 2003. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51: 283-290.
- Larrañaga, I.J.; Carballo, J. M.; Rodriguez, M. d. M.; Fernández, J. A. 1999. Control e higiene de los alimentos. McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid.

- Latge, J.P. 1-4-1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 310-350.
- Legan, J.D. 1993. Mold spoilage of bread - the problem and some solutions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 32: 33-53.
- Little, B., Ray, R. 2002. A perspective on corrosion inhibition by biofilms. *Corrosion*, 58: 424-428.
- Logrieco, A., Bottalico, A., Mule, G., Moretti, A., Perrone, G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 645-667.
- Macrae, R.; Robinson, R. K.; Sadler, M. J. 1993. Encyclopaedia of food science, food technology, and nutrition. Academic Press, London.
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V., Aldred, D. 2003. Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 723-730.
- Marin, S., Ramos, A.J., Sanchis, V. 2005. Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 329-341.
- Maris, P. 1998. Regulatory procedures for disinfectants in Europe. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41: 297-301.
- Martyny, J.W., Harbeck, R.J., Barker, E.A., Sills, M., Silveira, L., Arbuckle, S., Newman, L. 2005. Aerosolized sodium hypochlorite inhibits viability and allergenicity of mold on building materials. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 116: 630-635.
- Mattilasandholm, T., Wirtanen, G. 1992. Biofilm formation in the industry - A review. *Food Reviews International*, 8: 573-603.
- Maukonen, J., Matto, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., Salo, S., Saarela, M. 2003. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30: 327-356.
- McDonnell, G., Russell, A.D. 1999. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 147-179.
- Mceldowney, S., Fletcher, M. 1988. The effect of temperature and relative-humidity on the survival of bacteria attached to dry solid-surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 7: 83-86.
- McKevith, B. 2004. Nutritional aspects of cereals. *Nutrition Bulletin*, 29: 111-142.
- Meletiadiis, J., Meis, J.F.G.M., Mouton, J.W., Verweij, P.E. 2001. Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. *J Clin Microbiol*, 39: 478-484.

- 
- Miettinen, H., Aarnisalo, K., Salo, S., Sjoberg, A.M. 2001. Evaluation of surface contamination and the presence of *Listeria monocytogenes* in fish processing factories. *Journal of Food Protection*, 64: 635-639.
- Millard, P.J., Roth, B.L., Thi, H.P.T., Yue, S.T., Haugland, R.P. 1997. Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 2897-2905.
- Mishra, A.K., Dubey, N.K. 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1101-1105.
- Moore, G., Griffit, C., Fielding, L. 2001. A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: A laboratory study. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 21: 478-488.
- Moore, G., Griffith, C. 2002b. Factors influencing recovery of microorganisms from surfaces by use of traditional hygiene swabbing. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 22: 410-421.
- Moore, G., Griffith, C. 2002a. A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: an industry trial. *International Journal of Environmental Health Research*, 12: 317-329.
- Morisset, M., Parisot, L., Kanny, G., Moneret-Vautrin, D.A. 2003. Food allergy to moulds: two cases observed after dry fermented sausage ingestion. *Allergy*, 58: 1203-1204.
- Moss, M.O. 1992. Secondary metabolism and food intoxication-moulds. *Journal of Applied Bacteriology, Symposium Supplement*, 21: 80S-88S.
- Moss, M.O. 1999. Spoilage problems - Problems Caused by Fungi. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Editor: Richard, K.R. Elsevier, Oxford. pp: 2056-2062.
- Müller, G. 1981. Microbiología de los alimentos vegetales. Acribia, Zaragoza.
- Orth, R. 1998. The importance of disinfection for the hygiene in the dairy and beverage production. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41: 201-208.
- Overy, D.P., Seifert, K.A., Savard, M.E., Frisvad, J.C. 2003. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 69-77.
- Padliya, N.D., Cooper, B. 2006. Mass spectrometry-based proteomics for the detection of plant pathogens. *Proteomics*, 6: 4069-4075.
- Palmas, F., Meloni, V. 1997. Fungi as an occupational health hazard in seasoned-food-industry workers. *Environmental Monitoring and Assessment*, 48: 273-284.
- Pap, K., Szilli, M., Kisko, G. 2006. Testing antimicrobial efficiency of seven disinfectants against bacteria and fungi with surface test. *Acta Alimentaria*, 35: 163-170.

- Parenicova, L., Skouboe, P., Frisvad, J., Samson, R.A., Rossen, L., ten Hoor-Suykerbuyk, M., Visser, J. 2001. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 521-527.
- Pasanen, P., Kalliokoski, P., Pasanen, A.L. 1997. The effectiveness of some disinfectants and detergents against microbial activity. *Building and Environment*, 32: 281-287.
- Pascual, A., Llorca, I., Canut, A. 2007. Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities. *Trends in Food Science & Technology*, 18: S29-S35.
- Pascual-Anderson, M.d.R.; Calderón y Pascual, V. 2000. Microbiología alimentaria : metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª ed. Diaz de Santos, Madrid.
- Paterson, R.R., Venancio, A., Lima, N. 2004. Solutions to *Penicillium* taxonomy crucial to mycotoxin research and health. *Research in Microbiology*, 155: 507-513.
- Patiño, B., Gonzalez-Salgado, A., Gonzalez-Jaen, M.T., Vazquez, C. 2005. PCR detection assays for the ochratoxin-producing *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 104: 207-214.
- Pitt, J.I.; Hocking, A. D. 1997. Fungi and food spoilage. Academic Press, Sydney.
- Rabie, C.J., Lubben, A., Marais, G.J., Jansen, v., V 1-4-1997. Enumeration of fungi in barley. *International Journal of Food Microbiology*, 35: 117-127.
- Rakotonirainy, M.S., Heraud, C., Lavedrine, B. 2003. Detection of viable fungal spores contaminant on documents and rapid control of the effectiveness of an ethylene oxide disinfection using ATP assay. *Luminescence*, 18: 113-121.
- Ramakrishna, N., Lacey, J., Smith, J.E. 1991. Effect of surface sterilization, fumigation and gamma irradiation on the microflora and germination of barley seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 13: 47-54.
- Rath, P.M., Ansorg, R. 2000. Identification of medically important *Aspergillus* species by single strand conformational polymorphism (SSCP) of the PCR-amplified intergenic spacer region. *Mycoses*, 43: 381-386.
- Ray, B. 2004. Fundamental Food Microbiology. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton.
- Reij, M.W., Den Aantrekker, E.D. 2004. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91: 1-11.
- Reuter, G. 1998. Disinfection and hygiene in the field of food of animal origin. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41 (1998): 209-215.
- Reynolds, K.A., Boone, S., Bright, K., Gerbal, C.P. 2004. Efficacy of sodium hypochlorite disinfectant on the viability and allergenic properties of household mold. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 113: S 180.

- 
- Richter, R.L.; Vedamuthu, E.R. 2002. Milk and milk products. En: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Editor: Frances Pouch Downes, K.I.4th ed. American Public Health Association, Washington. pp: 483-495.
- Samson, R.A.; Hoekstra, E. S.; Frisvad, J. C.; Filtenborg, O. 2000. Introduction to food and airborne fungi. 6th. Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Sawai, J., Yoshikawa, T. 2003. Measurement of fungi by an indirect conductimetric assay. *Letters in Applied Microbiology*, 37: 40-44.
- Schading, R.L., Carruthers, R.I., Mullinschading, B.A. 1995. Rapid-determination of conidial viability for Entomopathogenic Hyphomycetes using fluorescence microscopy techniques. *Biocontrol Science and Technology*, 5: 201-208.
- Schaertel, B.J., Tsang, N., Firstenberg-Eden, R. 1987. Impedimetric detection of yeast and mold. *Food Microbiology*, 4: 155-163.
- Schmidt, H., Ehrmann, M., Vogel, R.E., Taniwaki, M.H., Niessen, L. 2003. Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP. *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 138-146.
- Schnurer, J., Magnusson, J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 70-78.
- Schutz, M., Gafner, J. 1993. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 551-558.
- Scott, P.M. 1991. Possibilities of reduction or elimination of mycotoxins in cereal grains. En: *Cereal Grain : mycotoxins, fungi and quality in drying and storage*. Editor: J.Chetkowski. Elsevier, Amsterdam. pp: 529-572.
- Silley, P., Forsythe, S. 1996. Impedance microbiology - A rapid change for microbiologists. *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 233-243.
- Silva-Chitarra, G. 2003. Germination inhibitors of fungal spores: identification and mode of action. Wageningen University. Wageningen, The Netherlands.
- Singh, J. 2005. Toxic moulds and indoor air quality. *Indoor and Built Environment*, 14: 229-234.
- Sweeney, M.J., Dobson, A.D.W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43: 141-158.
- Sweeney, M.J., Dobson, A.D.W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 175: 149-163.
- Thiboldeaux, R. 2004. Indoor fungal infestations and mycotoxicity: guidance for public health professionals and industrial hygienists. Wisconsin Division of Public Health, Department of Health and Family Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Public Health Service, USDHHS, Wisconsin. <http://dhfs.wisconsin.gov/eh/HlthHaz/pdf/mycotoxin.pdf>.



Torres, M., Sala, N., Allaert, C. 1997. Problemática del recuento de hongos en alimentos. *Alimentaria*, 4: 43-46.

Tortorano, A.M., Viviani, M.A., Biraghi, E., Rigoni, A.L., Prigitano, A., Grillot, R., and the EBG Network 1-10-2005. In vitro testing of fungicidal activity of biocides against *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical Microbiology*, 54: 955-957.

Tournas, V.H. 2004. Moulds and yeasts in fresh and minimally processed vegetables, and sprouts. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 71-77.

Tournas, V.H., Katsoudas, E. 2005. Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology*, 105: 11-17.

Tripathi, P., Dubey, N.K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32: 235-245.

Troller, J.A. 1992. Sanitation in food processing. 2<sup>a</sup> ed. Academic Press, San Diego.

Twomey, D.G., Mackie, D.L. 1985. A medium for the rapid growth and detection of molds. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 105-107.

Vanne, L., Karwoski, M., Karppinen, S., Sjoberg, A.-M. 1996. HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control*, 7: 263-276.

Vasconcellos, J.A. 2004. Quality assurance for the food industry: a practical approach. CRC Press, Boca Raton.

Venkateswaran, K., Hattori, N., La Duc, M.T., Kern, R. 2003. ATP as a biomarker of viable microorganisms in clean-room facilities. *Journal of Microbiological Methods*, 52: 367-377.

Vincent, J. 2002. La química de la limpieza. En: *Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección*. Editores: Leveau, J.-Y.; Bouix, M. Mundi-Prensa, Madrid. pp: 205-246.

Wald, A., Leisenring, W., vanBurik, J.A., Bowden, R.A. 1997. Epidemiology of *Aspergillus* infections in a large cohort of patients undergoing bone marrow transplantation. *Journal of Infectious Diseases*, 175: 1459-1466.

Wallstrom, S., Dowling, K., Karlsson, S. 2002. Development and comparison of test methods for evaluating formation of biofilms on silicones. *Polymer Degradation and Stability*, 78: 257-262.

Watson-Craik, I.A., Aidoo, K.E., Anderson, J.G. 1989. Induction of conductance and capacitance changes by food-borne fungi. *Food Microbiology*, 6: 231-244.

Whitney, P.J. 1996. A comparison of two methods for testing defined formulations of PVC for resistance to fungal colonisation with two methods for the assessment of their biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 37: 205-213.

Whyte, P., Collins, J.D., McGill, K., Monahan, C., Mahony, H. 2001. Distribution and prevalence of airborne microorganisms in three commercial poultry processing plants. *Journal of Food Protection*, 64: 388-391.

Wirtanen, G.; Salo, S. 2005. Biofilm risks. En: *Handbook of hygiene control in the food industry*. Editores: Lelieveld, H.L.M.; Mostert, M.A.; Holah, J. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge: Woodhead. pp: 46-68.

Wirtanen, G., Salo, S., Helander, I.M., Mattila-Sandholm, T. 2001. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20: 37-50.

Wu, J.N., Doan, H., Cuenca, M.A. 2006. Investigation of gaseous ozone as an anti-fungal fumigant for stored wheat. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81: 1288-1293.

Zottola, E.A., Sasahara, K.C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry. Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, 23: 125-148.