

# 6. Microbios del aire, el agua y los alimentos

## 6.1. Microorganismos del aire

Un bioaerosol es un conjunto de unidades biológicas suspendidas en el aire como microgotas o polvo, de 0,5 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro, y el viento sirve de transporte para la dispersión. La composición y concentración de los microorganismos en los bioaerosoles varía con las fuentes. En aquéllos generados en el agua por lo común los organismos están rodeados de una capa fina de humedad y suelen consistir en agregados de varios microbios. Los provenientes del suelo son con frecuencia unidades aisladas o asociadas con partículas de polvo.

**Cuadro 6.1.** Concentración de microorganismos en el aire (1)

Actividad	Microorganismos	Concentración ufc/m <sup>3</sup>
Crianza de animales	bacterias	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>5</sup>
	hongos	10 <sup>3</sup> 10 <sup>6</sup> – 10 <sup>7</sup>
Cultivos	hongos	150 – 69.000
Cosecha y almacenamiento de granos	bacterias	50 – 6.500 240 – 19.000
	hongos	10 <sup>3</sup> – 10 <sup>5</sup> 10 <sup>6</sup> – 10 <sup>9</sup>
Manufactura de algodón y tabaco	bacterias totales	10 – 7.500
	bacterias Gram-negativas	3.200 – 3.500
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	20 – 400
	hongos	10 <sup>5</sup> 600 – 10.600 esporas/m <sup>3</sup>
Comunidades rurales	algas	100 – 800 unidades/m <sup>3</sup>

El transporte y asentamiento final de un bioaerosol depende de las propiedades físicas de las partículas y los parámetros ambientales que encuentra mientras está suspendido, como la magnitud de las corrientes de aire, la humedad relativa y la temperatura. Una humedad relativa baja y temperatura alta contribuyen a la afluencia de microbios en el aire, es el caso de algunas bacterias de la filósfera y esporas fúngicas, tal como *Cladosporium*. Estos parámetros también influyen en la supervivencia de los microbios en el aire y afectan su capacidad para colonizar las superficies sobre las que se depositan. En general las esporas fúngicas, los virus entéricos y los quistes de protozoos son más resistentes al estrés ambiental que las bacterias y algas durante el transporte a través del aire, aunque los endosporos bacterianos no son afectados.

La inhalación, ingestión y contacto superficial son las vías de exposición de los animales a los organismos del aire. El ser humano en promedio inhala unos 10 m<sup>3</sup> de aire por día. Las grandes partículas son retenidas en el tracto respiratorio superior (nariz y rinofaringe). Generalmente las partículas menores que 6 µm de diámetro son transportadas hasta los pulmones, pero en los alveolos son retenidas las de 1 a 2 µm. El asma, la pneumonitis por hipersensibilidad y otras enfermedades respiratorias están asociadas con la exposición a los bioaerosoles, como los generados durante el proceso de compostaje (1). Entre las bacterias termofilicas que proliferan en los 'composts' y las estufas de tabaco se encuentran *Thermoactinomyces* y *Laceyella*, cuyos endosporos contienen alergenicos (2, 3).

Los patógenos vegetales que son dispersados pasivamente a través del viento a veces a grandes distancias, suelen producir enormes cantidades de propágulos. En cambio los mecanismos de descarga activa propulsan a las esporas al aire independientemente del viento y requieren una alta humedad, por lo que las mayores concentraciones se alcanzan durante la noche o las primeras horas de la mañana (1).

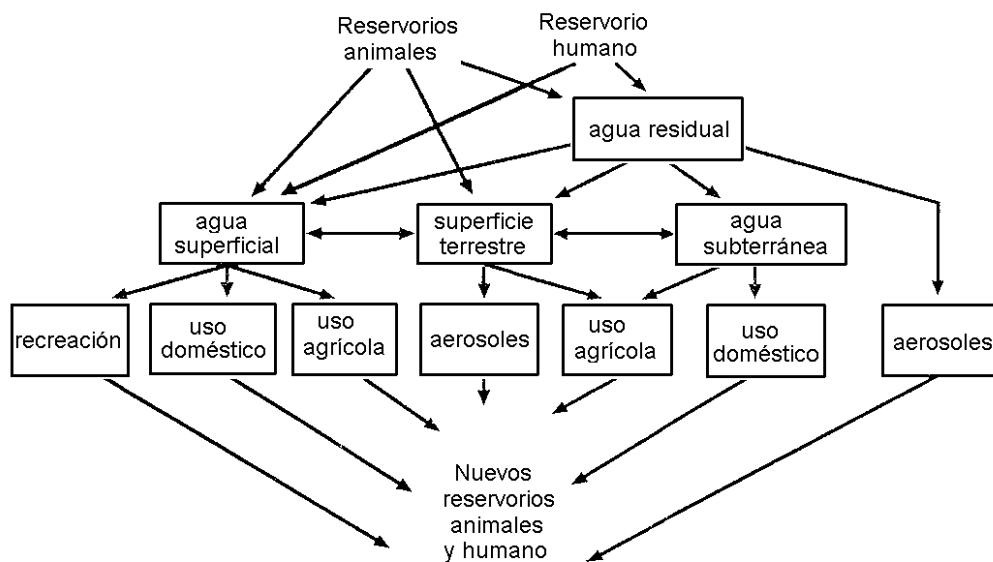
Se pueden recolectar las esporas diseminadas por el aire dejando que sedimenten naturalmente sobre portaobjetos o placas de medios de cultivo apropiados, pero es preferible recogerlas en aparatos como el muestreador de Andersen. Éste consta de un cilindro con placas metálicas perforadas y cajas de Petri intercaladas, donde el aire entra por arriba y es succionado por debajo. El tamaño de las perforaciones se hace progresivamente más pequeño hacia la base y la velocidad del aire aumenta, por lo tanto las esporas grandes impactan contra la caja superior y las más pequeñas chocan contra las cajas que se encuentran más abajo (4).

## 6.2. Microorganismos del agua

El método corriente para la cuantificación de las bacterias del agua dulce es el recuento de colonias sobre placas de agar nutritivo, sin embargo solamente detecta el 1% o menos de los microorganismos presentes en ese ambiente debido a que el medio de cultivo o las condiciones de incubación no son apropiados (5).

La microbiota autóctona de la película superficial de un espejo de agua comprende algas, bacterias, hongos y protozoos. Entre los géneros bacterianos se encuentran Gram-positivos y Gram-negativos, pigmentados y sin pigmentos, móviles e inmóviles, bacilos y cocos, formas pedunculadas y sin pedúnculo. También se hallarse mohos y levaduras.

La disponibilidad de agua con las garantías higiénicas necesarias para el consumo humano, depende principalmente de los sistemas de eliminación de residuos. La contaminación a través de las aguas residuales sin depurar o tratadas de forma inadecuada que entra en lagos, ríos o napas freáticas, crea condiciones para la diseminación rápida de los microbios patógenos.



**Figura 6.1.** Rutas ambientales de los patógenos, relacionadas al agua (1)

Los organismos infecciosos, como *Vibrio cholerae* (cólera), *Salmonella typhi* (fiebre tifoidea), otras especies de *Salmonella* y *Shigella* (infecciones gastrointestinales de gravedad variable), *Entamoeba histolytica* (disentería amebiana) y otros protozoos, se liberan en las heces o el estiércol. La ruta primaria de infección es el agua de bebida, pero otros portadores son los utensilios, frutas y verduras lavados con agua contaminada (6).

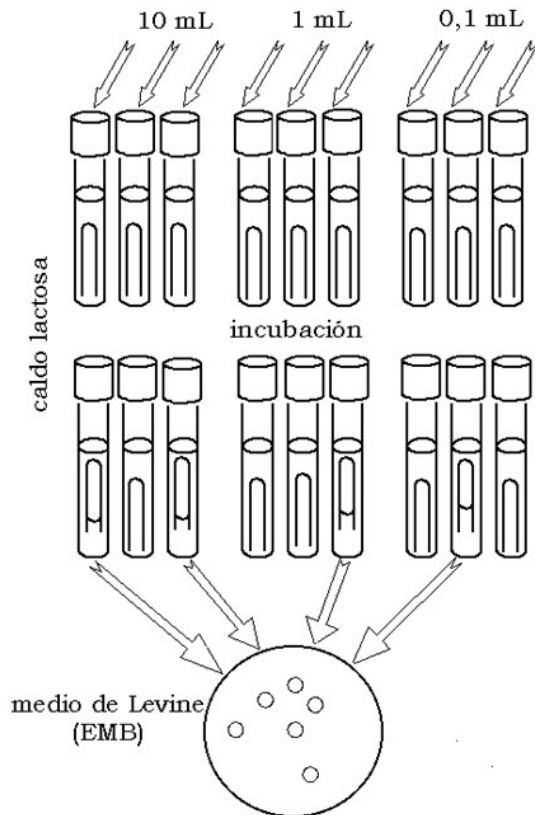
La detección de los enteropatógenos como *Salmonella* o *Shigella* es una tarea difícil e incierta para un control de rutina. En cambio es factible el análisis de los organismos índices de la presencia y el grado de la contaminación con heces o estiércol (1).

Los requisitos que un organismo índice debe cumplir son:

- estar presente siempre que los patógenos estén presentes,
- encontrarse en mayor cantidad que los patógenos para proporcionar un margen de seguridad,
- sobrevivir en el ambiente durante un tiempo similar o mayor al de persistencia de los posibles patógenos,
- ser fácil de detectar, con una alta confiabilidad en la identificación independientemente de otros organismos que se encuentran en la muestra.

La bacteria índice que se analiza con más frecuencia es *Escherichia coli* no patógeno pues cumple muchos de estos criterios. Las pruebas positivas no demuestran la presencia de enteropatógenos, pero sí la posibilidad de su presencia. Los enterococos también han sido usados como índices la calidad del agua debido a que son habitantes comunes del tracto intestinal.

Los clostridios sulfitorreductores (*C. perfringens*, *C. welchii*) están en las deyecciones de los animales de sangre caliente y se han considerado índices de polución fecal remota, pero son ubicuos en los sistemas acuáticos. Se suele investigar *Pseudomonas aeruginosa* en las aguas que reciben desinfección química.



### Número más probable de coliformes

(Si el agua puede contener cloro residual, agregar en condiciones de asepsia 2 mL de una solución estéril al 1% de tiosulfato de sodio, a cada litro de muestra.)

Sembrar tres tubos de caldo lactosa (Mc Conkey) doble concentración con 10 mL de muestra, tres tubos de medio simple con 1 mL y los tres restantes con 0,1 mL cada uno. Incubar a 35°C durante 24-48 hs.

Observar los tubos que presentan gas en cada una de las series. Obtener el número característico donde la primera cifra corresponde a los tubos de positivos sembrados con 10 mL de muestra, la segunda a los positivos que recibieron 1 mL y la tercera a los positivos con 0, 1 mL de agua. Consultar la tabla (cuadro 6.2) para obtener el número más probable de coliformes en 100 mL de la muestra.

### Investigación de *Escherichia coli*

Sembrar 1 asa de cada uno de los tubos positivos para coliformes fecales en sectores de las placas del medio de Levine. Incubar a 35°C durante 48 horas. Las colonias de *E. coli* tienen color negro-azulado con brillo metálico.

Caldo lactosa de Mac Conkey: extracto de carne 3 g, peptona 5 g, lactosa 5 g, sales biliares 1,5 g, púrpura de bromocresol (al 0,5%) 4 mL, agua 1 L, pH 7,2. Repartir en tubos con campanita. El medio doble concentración contiene los mismos ingredientes en 500 mL de agua (7).

Medio de Levine (= EMB): peptona 10 g, lactosa 5 g, sacarosa 5 g, fosfato dipotásio 2 g, agar 15 g, eosina 0,4 g, azul de metileno 0,065 g, agua 1 L, pH 7,2. (8).

Se denominan coliformes a un grupo de bacterias fermentadoras de lactosa como *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. (*agglomerans*, *aerogenes*, *cloacae*), *Klebsiella pneumoniae* e inclusive *Aeromonas* spp., pero solamente la primera es de origen exclusivamente intestinal. Hay varias técnicas para la detección de coliformes en el agua, las más comunes son la del número más probable y la filtración por membrana.

Estos procedimientos tardan varios días en completarse, por lo que se tiende a determinar solamente la presencia o ausencia de *E. coli*, debido a que el nivel del mismo no está relacionado cuantitativamente con la posibilidad de un brote de una enfermedad transmitida por el agua y el ensayo proporciona suficiente información sobre la calidad de la misma. Sin embargo, en situaciones oligotróficas, una proporción de la población total puede ser irrecuperable en los cultivos corrientes y se las conoce como bacterias viables pero no cultivables (1).

Los cultivos sobre agar Levine (EMB) tienen el carácter de presuntivos porque, si bien las colonias oscuras de *E. coli* típico adquieren un brillo metálico característico y las de los organismos que no fermentan lactosa

tienen colonias incoloras, entre estos últimos se encuentran algunas variedades patógenas de *E. coli* (9). La tolerancia en las aguas de consumo suele ser de 100 bacterias aerobias banales y 2 coliformes totales en 100 mL de agua, mientras debe estar ausente *E. coli*.

Número más probable por mL de muestra utilizando series de tres tubos inoculados con 10 mL, 1 mL y 0,1 mL (72)			
Número característico	Índice NMP	Número característico	Índice NMP
0 0 1	3	2 0 0	9
0 0 2	6	2 0 1	14
0 0 3	9	2 0 2	20
0 1 0	3	2 0 3	26
0 1 1	6,1	2 1 0	15
0 1 2	3,2	2 1 1	20
0 1 3	12	2 1 2	27
0 2 0	6,2	2 1 3	34
0 2 1	9,3	2 2 0	21
0 2 2	12	2 2 1	28
0 2 3	16	2 2 2	35
0 3 0	9,4	2 2 3	42
0 3 1	13	2 3 0	29
0 3 2	16	2 3 1	36
0 3 3	19	2 3 2	44
1 0 0	3,6	2 3 3	53
1 0 1	7,2	3 0 0	23
1 0 2	11	3 0 1	39
1 0 3	15	3 0 2	64
1 1 0	7,3	3 0 3	95
1 1 1	11	3 1 0	43
1 1 2	15	3 1 1	75
1 1 3	19	3 1 2	120
1 2 0	11	3 1 3	160
1 2 1	15	3 2 0	93
1 2 2	20	3 2 1	150
1 2 3	24	3 2 2	210
1 3 0	16	3 2 3	290
1 3 1	20	3 3 0	240
1 3 2	24	3 3 1	460
1 3 3	29	3 3 2	1100

**Cuadro 6.2.** Tabla para el cálculo del número más probable (8)

Otra técnica es la filtración de volúmenes conocidos de muestra de agua diluida o sin diluir a través de membranas con rejilla hidrofóbica y poros de 0,45 µm seguida de la incubación del filtro, depositado directamente sobre el medio de cultivo gelificado o un disco de papel grueso impregnado con el medio líquido, para contar luego las colonias desarrolladas (8).

Las pruebas basadas en la determinación de la presencia o ausencia, son procedimientos que proporcionan la información necesaria en 24 horas o menos. Para detectar β-galactosidasa que indica la presencia de bacterias coliformes, se emplea un medio que contiene isopropil β-D-tio-galactopiranosido (IPTG), y para observar β-glucuronidasa que es una enzima diagnóstica de *E. coli*, se utiliza un medio que contiene o-nitrofenol-β-D-galactopiranosido o bien el compuesto fluorogénico 4-metil-umbeliferil-β-D-glucurónido (MUG) (1), pero solamente el 95% de las cepas de *E. coli* tienen la enzima glucuronidasa (10). Si esta última prueba se realiza a 44,5°C se elimina cualquier resultado falsamente positivo (9).

También se utilizan sondas génicas y otros métodos moleculares para detectar bacterias coliformes y *E. coli*. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se emplea para detectar en el agua los genes que codifican las enzimas indicadoras de la presencia de bacterias coliformes y *E. coli*.

*E. coli* es un competidor débil en las bajas concentraciones de sustrato que predominan en las aguas naturales y suele ser eliminado por competencia y depredación. Los criterios que determinan la potabilidad del agua no excluyen totalmente la posibilidad de ingerir enteropatógenos pero el riesgo es mínimo porque, en general, se necesita una dosis infectiva de varios cientos a miles de bacterias para producir la enfermedad.

Los enterovirus y los quistes de algunos protozoos patógenos son algo más resistentes a la desinfección por cloro u ozono que las bacterias y ocasionalmente se recuperan partículas de virus activas o quistes vivos en aguas tratadas de acuerdo a las normas sanitarias. Para detectar los virus se deben multiplicar en cultivos de tejidos adecuados y/o revelar por procedimientos inmunológicos. Generalmente, las concentraciones de virus son tan bajas que el primer problema es concentrarlos.

El agua procede de subsuelo a través de pozos, o de aguas superficiales (arroyos, ríos, lagos, embalses). En el caso del agua subterránea, a menudo todo lo que se requiere es una desinfección. Las aguas de superficie tienen que tratarse por sedimentación y filtración. Tradicionalmente la desinfección del agua se realiza por cloración. Este tratamiento es relativamente económico y el contenido en cloro libre residual del agua tratada (0,2 - 1 mg/L) es un factor de seguridad intrínseco contra la recontaminación. El inconveniente está en las trazas de compuestos de halogenados que se generan, por tal motivo se tienen que separar los compuestos orgánicos del agua.

La capacidad del hipoclorito para destruir microorganismos se debe a que oxida proteínas y otras moléculas, pero la actividad se reduce a pH alcalino. Los quistes de protozoos por su cubierta gruesa son más resistentes, así se necesita 2,8 mg de cloro/L para inactivar el 99% de *Giardia* y 80 mg/L durante más de 90 minutos para inactivar los ooquistes de *Cryptosporidium*. Algunos rotavirus requieren 5 mg de cloro/L para la inactivación y un virus coxsackie, 18 mg/L durante 5 minutos (1).

### 6.3. Microorganismos de los alimentos

Los productos alimenticios constituyen un buen sustrato para el crecimiento de diversas clases de organismos, aunque muchos no son dañinos, algunos los estropean y otros causan enfermedades y producen toxinas, pero también los hay benéficos. Bajo condiciones físicas favorables y temperaturas entre 0 y 60°C, los microbios crecen produciendo cambios en las características organolépticas y otras cualidades de los alimentos (11).

#### 6.3.1. Origen e incidencia

El origen de los contaminantes es:

- endógeno
  - en alimentos de origen animal
    - *Salmonella* spp. en la yema de huevo
    - *Trichinella spiralis* en la carne de cerdo o jabalí
    - varios helmintos parásitos en el pescado
    - otras bacterias, protozoos y helmintos
  - en frutas, hortalizas y cereales
    - los organismos fitopatógenos
    - una amplia variedad de saprobios endófitos
- exógeno
  - el contenido intestinal, patas y piel, plumas, de los animales de abasto

- el suelo, las aguas superficiales, el polvo ambiental
- los tractos intestinal y respiratorio humanos
- en las plantas elaboradoras de alimentos:
  - las materias primas
  - los envases
  - las aguas residuales
  - los roedores, insectos, aves y mascotas (12).

Los factores que influyen en las poblaciones microbianas existentes en los alimentos son:

- ✓ los intrínsecos, es decir relativos a las propiedades físicas, químicas y biológicas del alimento: nutrientes, pH y capacidad reguladora, potencial redox, actividad del agua, antimicrobianos;
- ✓ los extrínsecos que resultan de las propiedades físicas y químicas del ambiente en el que es mantenido el alimento: humedad relativa, temperatura, atmósfera;
- ✓ los efectos del tratamiento o procesado en la elaboración: cortado, lavado, envasado, calor, conservantes;
- ✓ los implícitos, que comprenden las interacciones en la comunidad microbiana primaria: velocidad de crecimiento específico, sinergismo, antagonismo, comensalismo (11).

Los microorganismos que se encuentran en la leche se originan en el interior de la ubre, el exterior de los pezones y el equipo de ordeño. Las bacterias que están fuera del pezón pueden invadir el orificio y desde allí el interior de la ubre. La leche extraída de un animal sano contiene pocos microorganismos, menos de  $10^2 - 10^3$  ufc/mL. A partir del momento en que se saca la leche de la vaca y hasta que se reparte en los envases, todo lo que se pone en contacto con ella es una fuente potencial de contaminación. Los microbios más comunes son *Micrococcus*, *Streptococcus* y *Corynebacterium*. Si el animal tiene mastitis los valores de bacterias pueden llegar a  $10^8$  ufc/mL de leche, acompañadas de un alto número de leucocitos.

La superficie de las plantas sanas está siempre contaminada pero generalmente los tejidos internos están libres de microorganismos. La magnitud y el tipo de contaminación están determinados por las características del vegetal, el ambiente donde se ha cosechado, el método de manipulación y el tiempo y las condiciones de almacenamiento. Las frutas y hortalizas son susceptibles a la infección por bacterias, hongos y virus, la invasión puede tener lugar durante el desarrollo de la planta y esto aumenta la posibilidad de su deterioro post-cosecha. La manipulación durante y después de la cosecha puede producir lesiones en los tejidos que facilitan el ingreso de los microorganismos. El pH de las frutas es relativamente ácido, oscilando entre 2,3 en los limones a 5,0 en las bananas. Esto restringe el crecimiento bacteriano pero no afecta a los hongos. La escala de pH de las verduras es ligeramente superior y por ello son más susceptibles al ataque por bacterias.

Las aves recién muertas, desplumadas y evisceradas tienen en la superficie bacterias que están normalmente presentes sobre las aves vivas. Bajo

buenas condiciones de procesamiento el recuento oscila entre  $10^2$  y  $10^3$  bacterias/cm<sup>2</sup> de piel. Los principales contaminantes provienen del contenido intestinal y el ambiente, entre ellos *Salmonella*, *Campylobacter* y *Pseudomonas*.

El interior de un huevo recién puesto por aves sanas está libre de microbios y la contaminación posterior está determinada por las condiciones de manipulación, y la temperatura y la humedad de almacenamiento. Los microorganismos pueden penetrar en el huevo a través de grietas o cuando se ha deteriorado la fina capa de proteína que recubre la cáscara.

La microbiota del pescado y mariscos recién recogidos son el reflejo de la calidad microbiológica de las aguas donde provienen. Las bacterias de la piel y las agallas del pescado pertenecen principalmente a los géneros *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Vibrio* y *Flavobacterium*. Los mariscos que crecen en aguas contaminadas suelen concentrar virus y causar, entre otras afecciones, hepatitis.

La carcasa del animal muerto para obtener la carne tiene una contaminación superficial debida a muchas clases de organismos procedentes de varias fuentes tales como el cuero, los pelos o la lana, el contenido intestinal, el personal y el equipo. Los tejidos internos de un animal sano están relativamente exentos de microbios.

La carne recién cortada de una carcasa tiene su nueva superficie contaminada con los organismos característicos del ambiente y los instrumentos usados (sierras, cuchillos). La mayor contaminación por formación de nuevas superficies se produce durante la preparación de hamburguesas. El número de bacterias sobre una carcasa apenas obtenida suele estar entre  $10^2$  y  $10^4$  ufc/cm<sup>2</sup> de superficie expuesta. Los organismos más comunes sobre las carnes frescas son *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* y enterobacterias, aunque también se encuentran levaduras y mohos (9, 12).

### 6.3.2. Patógenos

Las enfermedades transmitidas a través de los alimentos se adquieren por:

- ingestión de la toxina preformada por bacterias, como en el caso de la intoxicación por *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* o *Bacillus cereus*;
- infección no invasora, las bacterias colonizan la luz intestinal y una vez instalado el patógeno suele producir una toxina (*Vibrio cholerae*, *Clostridium perfringens*); o
- infección invasora, las células penetran en las células del epitelio intestinal (*Shigella*, *Salmonella*) o atraviesan la pared intestinal y se diseminan por vía hemática (*Salmonella typhi*, *Brucella*) (11).



**Cuadro 6.3.** Bacterias patógenas más frecuentes (10,11)

Bacterias		Reservorio / portador	Alimentos
<i>Aeromonas</i>		Agua	Agua
<i>Bacillus cereus</i>		Suelo	Arroz cocido, carnes cocidas, hortalizas, budines amiláceos
<i>Brucella</i>		Bovinos, caprinos, ovinos	Leche fresca, productos lácteos
<i>Campylobacter jejuni</i>		Pollos, perros, gatos, bovinos, cerdos, aves salvajes	Leche fresca, aves de corral, agua
<i>Clostridium botulinum</i>		Suelo, mamíferos, aves, peces	Pescado, carne, hortalizas, conservas caseras
<i>Clostridium perfringens</i>		Suelo, animales, hombre	Carnes y aves de corral cocinadas, jugo de carne, porotos
<i>Escherichia coli</i>	enterotoxinógeno	Hombre, bovinos, aves de corral, ovinos	Ensaladas, hortalizas crudas, agua
	enteropatógeno		Leche, agua
	enteroinvasor		Queso, agua
	enterohemorrágico		Carne poco cocida, leche fresca, queso, agua
<i>Listeria monocytogenes</i>		Suelo, hortalizas, bovinos, aves de corral	Quesos blandos, leche, ensalada
<i>Mycobacterium bovis</i>		Bovinos	Leche fresca
<i>Salmonella typhi</i>		Hombre	Agua, hortalizas crudas
<i>Salmonella spp.</i>		Hombre y mamíferos	Carnes, aves de corral, agua, huevos, productos lácteos
<i>Shigella</i>		Hombre	Agua, ensaladas, agua
<i>Staphylococcus aureus</i>		Hombre	Jamón, ensaladas, productos de panadería rellenos de crema, helados, quesos
<i>Vibrio cholerae</i>		Hombre, vida marina	Mariscos, ensaladas, pescado crudo, agua
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		Agua de mar, vida marina	Pescado crudo, cangrejos, mariscos
<i>Yersinia enterocolitica</i>		Agua, animales salvajes, cerdos, perros, aves de corral	Leche, carne de cerdo y aves de corral, agua

**Cuadro 6.4.** Virus, protozoos y helmintos más frecuentes (10, 11)

<b>Virus</b>	<b>Reservorio / portador</b>	<b>Alimentos</b>
Hepatitis A	Hombre	Agua, mariscos, frutas, hortalizas crudas
Rotavirus	Hombre	Agua
<b>Protozoos</b>	<b>Reservorio / portador</b>	<b>Alimentos</b>
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Hombre, animales	Agua, leche fresca, embutido crudo no fermentado
<i>Entamoeba histolytica</i>	Hombre	Hortalizas, frutas frescas
<i>Giardia lamblia</i>	Hombre, animales	Agua
<i>Sarcocystis</i>	Bovinos, ovinos	Carnes
<i>Cyclospora</i>	Animales	Agua
<i>Toxoplasma</i>	Gato	Cerdos, ovinos, aves de corral
<b>Helmintos</b>	<b>Reservorio / portador</b>	<b>Alimentos</b>
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Hombre	Alimentos contaminados con suelo
<i>Taenia saginata</i>	Bovinos	Carne poco cocida
<i>Taenia solium</i>	Cerdos	Carne de cerdo poco cocida
<i>Trichinella spiralis</i>	Cerdos, carnívoros	Carne de cerdo poco cocida
<i>Trichuris trichiura</i>	Hombre	Alimentos contaminados con suelo

### 6.3.3. Alteración

Los cambios debidos a la alteración de alimentos frescos y elaborados causados por los microorganismos pueden ser:

- formación de viscosidad o limo extracelular, como el generado en la carne refrigerada por el crecimiento de organismos psicrófilos o psicrótrofos;
- despolimerización o hidrólisis de carbohidratos, proteínas y grasas, ocasionando la pérdida de la organización biológica del alimento, tal como la maceración de las zanahorias por *Rhizopus*;
- destrucción de un emulsionante, como la lecitina en los ovoproductos causada por *Bacillus cereus*;
- fermentación de un azúcar acumulando ácidos orgánicos o produciendo cambios molestos en el aroma, como la acidificación de la leche por *Streptococcus* o la formación de diacetilo por *Pediococcus* en la cerveza;
- oxidación de un producto que determina variación en el aroma y la apariencia, como el agriado del vino por *Acetobacter*;

- reducción de un compuesto que produce un olor extraño o un cambio de color, como el ennegrecimiento de hortalizas encurtidas por *Desulfotomaculum* al reducir sulfatos;
- producción de un pigmento, como las manchas rojas del queso debidas a *Lactobacillus plantarum*;
- formación de un olor o aroma desagradable, tal como la trimetilamina en los pescados descompuestos (13).

Los microorganismos más importantes que deterioran los alimentos enlatados con defectos de elaboración, son los formadores de endosporos y el mayor riesgo es la producción de toxinas por *Clostridium botulinum* (9).

#### 6.3.4. Conservación

Todos los métodos de conservación de alimentos están basados en uno de los siguientes principios:

- prevención de la contaminación,
- inhibición del crecimiento y metabolismo microbiano,
- matar los microorganismos.

Por otra parte, las buenas prácticas de manufactura incluyen procedimientos que permiten obtener productos de calidad microbiológica conveniente, mediante el control en la cadena de elaboración (11).

Los métodos de conservación deben tener en cuenta la extraordinaria resistencia de las esporas bacterianas frente a agentes tales como el calor, los productos químicos y la deshidratación. Las cubiertas protectoras (cáscara de huevos, piel de frutas y verduras, cascarilla de cereales) son barreras naturales para los organismos dañinos, mientras que los envases protegen a los alimentos elaborados.

El calor es ampliamente utilizado para destruir los organismos que hay en los productos alimenticios en latas y frascos. En los productos muy ácidos la temperatura no sobrepasa la de ebullición pues los endosporos sobrevivientes de *C. botulinum* no germinan a pH por debajo de 4,5, mientras que los alimentos poco ácidos y neutros se aplica la esterilización en autoclave para matar los endosporos.

La pasteurización que se utiliza para la leche y algunos otros productos consiste en un tratamiento a una temperatura de 63°C durante 30 minutos, o de 72°C durante 15 segundos. Deben tomarse las necesarias precauciones para evitar la contaminación después de la pasteurización y el producto acabado debe almacenarse a baja temperatura para retrasar el crecimiento de los microorganismos que han sobrevivido. El tratamiento de ultra alta temperatura (UAT) consiste en calentar la leche a 135 - 150°C durante 4 segundos (13).

Las temperaturas de congelación retrasan el crecimiento y frenan las actividades metabólicas de los microorganismos durante largos periodos de tiempo. Antes de ser congelados, la mayoría de los vegetales son sometidos a la acción del vapor de agua para inactivar las enzimas que podrían alterar al producto aún a bajas temperaturas. Los métodos de congelación rápida usan temperaturas de -25°C o menores para formar cristales de hielo pequeños que no rompen las estructuras celulares del alimento. El

número y los tipos de microorganismos viables presentes en los alimentos congelados reflejan el grado de contaminación del producto bruto, las condiciones sanitarias de la planta de elaboración y, la velocidad y el cuidado con que se elaboró el producto.

El recuento microbiano de la mayoría de los alimentos congelados disminuye durante el almacenamiento pero algunas especies de *Salmonella*, y pocos otros microbios, sobreviven durante largos períodos de tiempo entre  $-9$  y  $-17^{\circ}\text{C}$ . El crecimiento de bacterias toxigénicas como *C. botulinum* tipos A y B proteolítico, y *S. aureus* puede evitarse a temperaturas de  $5^{\circ}\text{C}$ , pero *C. botulinum* tipo E crece a  $3,3^{\circ}\text{C}$ .

Cuando los microorganismos se colocan en soluciones con grandes cantidades de azúcar (jaleas y mermeladas) o sal (carnes curadas) las células se deshidratan y el metabolismo se detiene, retrasando o evitando el crecimiento. Los procesos de conservación basados en este principio afectan sobre todo a las bacterias, mientras que las levaduras y mohos son relativamente resistentes. La elevada presión osmótica puede inhibir el crecimiento microbiano, pero no elimina a todos los organismos.

Los ácidos orgánicos son utilizados como conservadores de alimentos, entre los más efectivos están los ácidos sórbico, acético, láctico y propiónico. Los ácidos sórbico y propiónico se usan para inhibir el crecimiento de los mohos en el pan. Los alimentos preparados por procesos de fermentación (encurtidos, yogur, quesos) están conservados por los ácidos acético, láctico o propiónico producidos durante la fermentación. Los nitratos y nitritos son aditivos usados en el curado de carnes pues inhiben algunas bacterias anaeróbicas especialmente *C. botulinum* (9).

### 6.3.5. Trazabilidad

Es un conjunto de medidas, acciones y procedimientos que permiten registrar el origen y calidad de los componentes de un alimento, los procesos aplicados y la distribución del mismo.

Comenzó como un sistema para identificar el momento en que un organismo genéticamente modificado se introducía en la cadena de producción y distribución, y se ha generalizado para otros alimentos, como carnes y miel (9).

## 6.4. Deterioro fúngico

### 6.4.1. Levaduras

Están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se hallan sobre hojas, flores, frutos, piel, cuero, plumas y tracto digestivo de animales herbívoros y omnívoros. Algunas están asociadas con insectos pero el suelo es el mayor reservorio. Son organismos aerobios, y aunque los géneros *Saccharomyces* y unos pocos más son fermentadores enérgicos de los azúcares otros no lo son, tal el caso de *Cryptococcus* y *Rhodotorula*. Algunas levaduras tienen la particularidad de fermentar glucosa más rápido bajo condiciones aeróbicas, tal como *Zygosaccharomyces*, *Dekkera* y su anamorfo *Brettanomyces*.

Las levaduras constituyen la causa más común de alteración de frutas y jugos, pues tienen azúcares fermentables y elevada acidez. Comúnmente asociadas con el deterioro de las frutas secas están *Zygosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Debaryomyces* y *Pichia*. También forman parte de la microbiota de productos lácteos y cárnicos.

Las levaduras de las pasturas y suelo de los corrales pueden ser transportadas a los mataderos y de allí a las carcasas. *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Debaryomyces* suelen hallarse en carcasas de cordero y cerdo (15).

Los principales géneros presentes en los productos lácteos son *Kluyveromyces* y *Debaryomyces*, pero también se encuentran *Rhodotorula*, *Yarrowia* y *Candida* (14).

Las levaduras fermentan unos pocos glúcidos, principalmente hexosas y oligosacáridos. Muy pocas (*Schwanniomyces*, *Lipomyces*) pueden hidrolizar almidón. Otras poseen actividad pectinolítica. Muchas especies sintetizan todas las vitaminas necesarias, pero algunas requieren biotina y otras (15).

Las levaduras oxidativas producen niveles inaceptables de acetaldehído, ésteres y ácido acético en vinos y algunas especies fermentativas causan una carbonatación excesiva, sedimento, turbiedad, ácidos y ésteres desagradables en los mismos. Las levaduras ‘asesinas’ secretan polipéptidos tóxicos para otras especies de levaduras y además suelen inhibir a otros organismos. Pueden ser contaminantes en la fermentación de vinos y cervezas, dominando a la cepa industrial para dar un producto espúreo. Por otra parte, una levadura ‘asesina’ seleccionada puede suprimir levaduras salvajes indeseables (14).

#### 6.4.2. Mohos

Los mohos saprobios y patógenos colonizan las partes aéreas de los vegetales y su crecimiento se acentúa cuando la planta envejece y las semillas maduran. En el campo suelen quedar abandonados los esclerocios, como en el caso de *Aspergillus flavus* en cultivos de maíz, que son la fuente de contaminación en la temporada siguiente. La cosecha perturba el ecosistema y las condiciones de almacenamiento producen un profundo cambio en la composición de la microbiota (16).

Los hongos adquiridos en el campo que deterioran los productos vegetales, difieren según la planta, el clima y la región geográfica. Suelen encontrarse las especies de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium* entre otros. El crecimiento fúngico continua en los productos frescos después de la cosecha y causa lesiones que desfiguran el aspecto de las frutas y hortalizas. Los endófitos que invadieron las flores están incorporados a los granos (17).

Los granos almacenados suelen presentar generalmente especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y algunos otros xerófilos, los que requieren una humedad relativa ambiente entre 70 y 90%, un contenido de agua del producto de 15 a 20% y un rango de temperatura entre 0 y 45°C, además pueden crecer a una concentración de oxígeno algo menor que la normal (18).

### 6.4.3. Micotoxinas

Estos son metabolitos secundarios tóxicos para los animales. Una micotoxicosis primaria se produce al consumir vegetales contaminados y una secundaria al comer carne o leche de animales que ingirieron forrajes contaminados, tal el caso de la presencia de aflatoxina M<sub>1</sub> en la leche como consecuencia de la ingesta de aflatoxina B<sub>1</sub> por la vaca (19). En 1912 fueron descritos los primeros casos de micotoxicosis en la Argentina (20).

La presencia de las micotoxinas en los vegetales puede deberse a la infección de la planta en el campo por un hongo patógeno, la colonización de la filósfera por uno saprobio, el crecimiento post-cosecha sobre frutos y granos almacenados, o el desarrollo fúngico durante el depósito de los materiales ya procesados. Se conocen unas 300 toxinas fúngicas.

Las micotoxinas son específicas. La aflatoxina B<sub>1</sub> es formada por tres especies estrechamente relacionadas: *Aspergillus parasiticus*, *A. nomius* y *A. flavus* (14). Las esporidesminas son producidas solamente por *Pithomyces chartarum*. La patulina es generada por unas once especies de *Penicillium*, tres de *Aspergillus* y dos de *Byssoschlamys*.

Es grande la variabilidad en la formación de toxinas por una especie dada. *Penicillium roqueforti* produce algunas en las condiciones de laboratorio pero no en los quesos madurados. Los rendimientos de toxina T-2 por cepas de *Fusarium sporotrichioides* varían considerablemente y no todas las cepas de *A. flavus* son aflatoxigénicas.

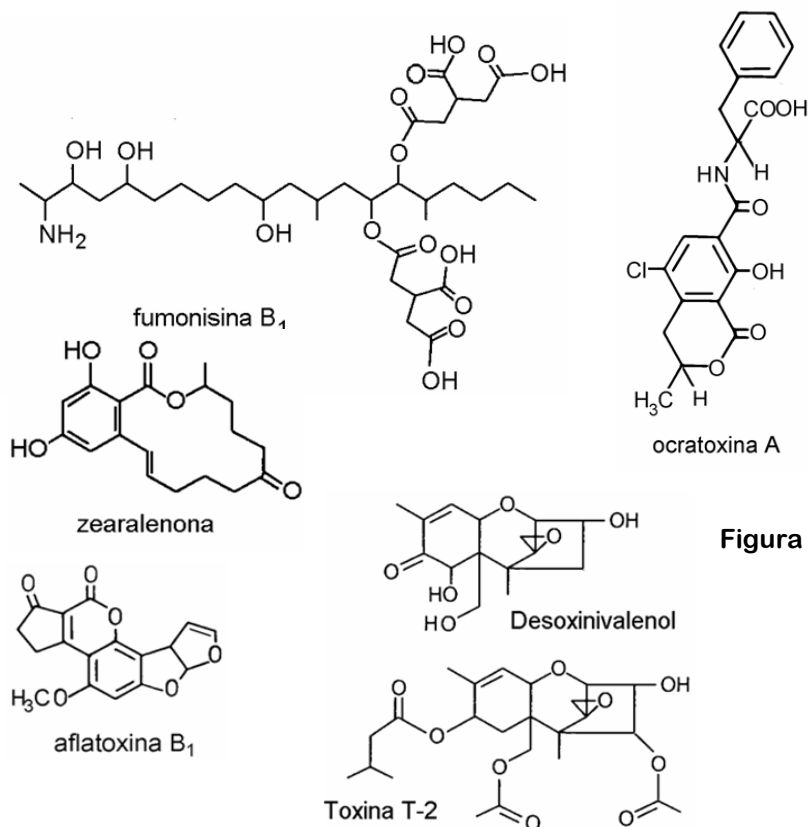


Figura 6.2. Micotoxinas más comunes (19)

Por otra parte, la temperatura tiene una gran influencia sobre la actividad de los mohos. Un estrés por sequía, durante el periodo del crecimiento del maní puede conducir a la presencia de aflatoxinas, si la temperatura de la geocarpósfera se mantuvo entre 20 y 32°C durante las seis semanas anteriores a la cosecha (19).

Aunque el crecimiento de *P. verrucosum* ocurre entre 0 y 31°C a una  $a_w = 0,95$ , sólo hay producción de ocratoxina si el rango de temperatura fue de 12 a 24°C, siendo máxima a 20°C y  $a_w = 0,85$  (14). *Alternaria alternata* produce la máxima concentración de alternariol sobre granos de trigo a 25° C con una  $a_w = 0,98$ , pero la producción óptima de ácido tenuazoico por *Alternaria tenuissima* ocurre a 20°C con un contenido de humedad más elevado. Por otra parte, *Fusarium graminearum* produce la mayor cantidad de zearalenona a 25°C y de desoxinivalenol a 28°C a una  $a_w = 0,98$ .

También influye el pH del substrato, así la producción de patulina en manzanas debida a *Penicillium expansum* ocurre en un rango de pH 3,2 a 3,8, mucho más estrecho que el de crecimiento activo.

Los tricotecenos están asociados a cereales de zonas templadas, mientras que las aflatoxinas se encuentran con más frecuencia en oleaginosas y cereales de zonas cálidas. También influyen las prácticas agrícolas.

La planta sana tiene muchas barreras a la infección, pero éstas suelen ser sobrepasadas por los microorganismos simbióticos como el endófito *Neotyphodium coenophialum* en *Festuca arundinacea*, causante de la afección llamada pie de festuca, o *Neotyphodium lolii* en *Lolium perenne*. Por otra parte, la eslaframina producida por *Macrophomina phaseolina* (= *Rhizoctonia leguminicola*) está asociada al trébol rojo y otras forrajeras (19).

La presencia de una micotoxina y el peligro asociado solamente pueden ser determinados con certeza después de la extracción e identificación de la toxina, porque: a) la presencia del hongo no asegura que exista una micotoxina, b) ésta continúa en el producto aunque el moho haya desaparecido, c) un hongo dado puede producir más de una toxina, y d) una determinada micotoxina puede ser formada por más de una especie de mohos. Las concentraciones se expresan en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , o sea una relación de  $1/10^9$ , y la acción de estas pequeñas cantidades es acumulativa (14).

El nivel de aflatoxinas en los vegetales es muy variable, oscilando los valores en choclo y maíz entre 0,1 y 2.000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Estas toxinas producen daño hepático agudo, cirrosis, inducción de tumores y teratogénesis. Se excretan por leche (aflatoxinas M) y se acumulan en los tejidos (19).

La contaminación de productos agrícolas con fumonisinas puede alcanzar valores de hasta 330 mg/kg, principalmente en los destinados al consumo animal. Estas micotoxinas producen leucoencefalomalacia equina, edema pulmonar porcino y cancer hepático en ratas. Se excretan por la leche (21). La ocratoxina A produce nefropatía en cerdos y aves, y se acumula en riñón, hígado y músculo. Los valores presentes en granos han llegado hasta 5 mg/kg.

Los tricotecenos (diacetoxiscirpenol, desoxinivalenol, toxina T-2 y otros) causan diarrea, hematuria, vómitos, anorexia, leucopenia, necrosis y en

algunos casos letales hemorragias múltiples. Por otra parte, la zearalenona es hiperestrogénica, los psoralenos originan fotodermatitis y los tremógenos (penitrem A y otros) afectan al sistema nervioso provocando temblores y convulsiones en los animales.

El manejo correcto de los cultivos y cosechas de granos y hortalizas, y el control de la calidad de los alimentos para los animales de la granja constituyen los únicos medios de prevención. La presencia de cualquier alteración organoléptica de frutas u hortalizas es causa suficiente para rechazar el producto, por la potencial formación de toxinas debida al deterioro fúngico.

Una vez formadas las micotoxinas no se pueden eliminar durante el procesamiento culinario o industrial, aunque en unos pocos casos se reduce su contenido. La mayor cantidad de toxina suele estar concentrada en unos pocos granos y si se logra separarlos, se disminuye la proporción en los subproductos. Las técnicas de clasificación visuales se han usado en maníes y la selección neumática con las nueces de Pará. El mondado de las manzanas para remover las zonas alteradas reduce entre 93 y 99% el contenido de patulina en la sidra preparada con las mismas.

Las micotoxinas son moderadamente estables a los procedimientos de tostado, así los maníes pierden alrededor del 40% de aflatoxina B<sub>1</sub> y los granos de café verde cerca del 80% de ocratoxina A. El proceso de panificación reduce en un 16 a 69% el desoxinivalenol presente en la harina de trigo. El tratamiento de maíz quebrado con NaOH disminuye significativamente el contenido de aflatoxina, pero la preparación del grano entero con Ca(OH)<sub>2</sub> reduce sólo un 40% de la misma (19). La bentonita y otros sílicoaluminatos adsorben las aflatoxinas de los substratos pero no otras micotoxinas, y suelen ser mezclados con los alimentos para aves (22).

## 6.5. Análisis de peligros y control de puntos críticos

La protección adecuada del consumidor solo se puede conseguir mediante la intervención oficial y particular, durante la producción y el procesamiento de los alimentos.

Las 'buenas prácticas' de producción, manufactura y distribución comprenden los procedimientos con los cuales se obtienen alimentos de calidad microbiológica aceptable, convenientemente controlados mediante pruebas en la cadena de producción y elaboración.

Un código de 'buenas prácticas' debe definir los pormenores del proceso que son necesarios para alcanzar su objetivo, como: características de las materias primas (cultivo, crianza, etc.), equipamiento, procedimientos, tiempos, temperaturas, métodos de higiene y desinfección, pruebas de laboratorio.

La intervención requiere primero la identificación de las prácticas críticas en la totalidad de las líneas de producción, elaboración y distribución de los alimentos. Las prácticas críticas se definen como aquéllas que presentan riesgos de contaminación y/o multiplicación microbiana (12).



*Peligro:* es el agente biológico, químico o físico presente en el alimento, o bien la condición en que éste se halla, que puede causar un efecto adverso para la salud.

*Punto crítico:* es la fase o práctica en la que puede aplicarse un control y que es esencial para prevenir o eliminar un peligro relacionado con la inocuidad de los alimentos, o para reducirlo a un nivel aceptable.

*Riesgo:* es la probabilidad de un efecto adverso para la salud y de la gravedad de este efecto, como consecuencia de un peligro presente en el alimento.

La Comisión del Codex Alimentarius define el sistema de análisis de peligros y control de las prácticas o puntos críticos (HACCP) y establece directrices para su aplicación.

Los principios del sistema son:

- realizar un análisis de los peligros,
- determinar las prácticas críticas a controlar,
- establecer un límite o límites críticos,
- establecer un sistema de vigilancia del control de las prácticas críticas,
- establecer las medidas correctivas que han de adoptarse cuando la vigilancia indica que una práctica crítica no está controlada,
- establecer procedimientos de comprobación para confirmar que el sistema funciona eficazmente,
- establecer pautas de documentación de todos los procedimientos, así como los registros apropiados para estos principios y su aplicación.

La finalidad del sistema HACCP es lograr que el control se centre en los puntos críticos, aplicándolo a cada operación concreta por separado y teniendo en cuenta las repercusiones de las materias primas y otros ingredientes, los procedimientos de elaboración de los alimentos, la función del control de los peligros en los procesos de fabricación, el probable uso final del producto, las categorías de los consumidores y las pruebas epidemiológicas relativas a la inocuidad de los alimentos.

La aplicación de los principios del sistema HACCP consta de las siguientes etapas:

1. formación de un equipo multidisciplinario de acuerdo al segmento de la línea de producción involucrado y las categorías generales de peligros que han de abordarse;
2. descripción completa del producto, que incluye composición, estructura física y química, tratamientos para la destrucción o inhibición de microbios, envasado, durabilidad, condiciones de almacenamiento y sistemas de distribución;
3. determinación del uso al que se destina;
4. elaboración de un diagrama de flujo que cubre todas las fases de la operación implicada;
5. confirmación *in situ* del diagrama de flujo;
6. ejecución de todas las etapas del análisis de peligros, enumerando todos los posibles riesgos relacionados con cada fase y estableciendo las medidas para controlar los peligros identificados, de acuerdo a los principios enumerados antes (24).

## 6.6. Análisis del riesgo

### 6.6.1. Evaluación del riesgo.

Esta etapa comprende:

*Identificación del peligro.* Consiste en la determinación de los agentes biológicos, químicos o físicos, capaces de causar efectos adversos en la salud y pueden estar presentes en un alimento o grupo de alimentos en particular. En el caso de los agentes microbianos, se identifican los organismos patógenos y/o sus toxinas.

*Caracterización del peligro.* Es la evaluación cuali o cuantitativa de la naturaleza de los efectos adversos para la salud (gravedad y duración) asociados con el mismo. Cuando se evalúan los riesgos microbiológicos, el interés está centrado en los microbios y sus toxinas. En este caso los factores a tener en cuenta son la fisiología y la virulencia del organismo, la evolución de la infección y la susceptibilidad del individuo, y cuando es posible se realiza una evaluación ‘dosis-respuesta’.

*Evaluación de la exposición.* Es la apreciación cuali o cuantitativa de la posibilidad de ingestión con los alimentos, de agentes biológicos, químicos o físicos adversos para la salud. Hay que tener en cuenta la frecuencia o probabilidad de contaminación por los organismos patógenos y su prevalencia hasta el consumo, además de la cantidad de alimento ingerida diariamente.

*Caracterización del riesgo.* Es una estimación cuali y/o cuantitativa de la posibilidad de la ocurrencia del peligro y de la gravedad de los efectos adversos para la salud, conocidos o potenciales, en una determinada población, basada en la identificación del peligro, la caracterización del mismo y la evaluación de la exposición (12).

### 6.6.2. Gestión del riesgo

Es el proceso de ponderar, a la luz de los resultados de la evaluación del riesgo, los criterios, alternativas u opciones posibles y, si corresponde, de elegir y poner en funcionamiento las opciones de control apropiadas, incluyendo medidas reglamentarias y normas legales (9). Comprende:

*Comunicación de la seguridad.* Es el intercambio entre las partes implicadas (evaluadores y gestores del riesgo, consumidores y otros interesados) de la información y las opiniones sobre la inocuidad de los alimentos. Como ninguna actividad humana, incluyendo el comer y el beber, está libre de peligros, el riesgo ‘cero’ es una utopía.

*Estimación de los riesgos para la salud.* Es con frecuencia poco exacta, sin embargo, pueden utilizarse datos de precisión limitada si se manejan convenientemente, para apoyar o refutar los temores tanto de los consumidores como de los responsables de la salud pública.

*Evaluación holística cuantitativa del riesgo.* Se basa en pronósticos del caso peor e incluyen todas las situaciones potencialmente peligrosas a lo largo del proceso. Cuando muestra un peligro inaceptable, es imperativa una recomendación para la gestión del riesgo y, después de puesta en práctica

esta recomendación, su eficacia debe ser validada para asegurar que se logró el nivel de riesgo fijado tan bajo como sea necesario y razonablemente alcanzable (12).

*Medidas de gestión del riesgo.* Son necesarias después del análisis del mismo y pueden suponer a menudo gastos considerables, pero éstos deben ser sopesados frente a los beneficios asociados, como el evitar las enfermedades y la mortalidad, y la prevención de la ansiedad injustificada del público (23).

### 6.6.3. Objetivos de seguridad alimentaria

El análisis del riesgo es la metodología que siguen los gobiernos y la Comisión del Códex Alimentarius para la fijación del nivel, deseable y alcanzable, de protección de los consumidores. En la práctica, este nivel de protección se traduce como objetivos de seguridad alimentaria (OSA) que a su vez, las empresas de alimentos deben esforzarse en conseguir, empleando los procedimientos y medios más apropiados (9).

Los objetivos se concretan en la fijación del nivel máximo de un peligro microbiológico, químico o físico, que se considera como aceptable en un alimento para que éste pueda ser consumido. Este nivel máximo de un peligro potencial, aceptable como requisito de seguridad, debe ser la exigencia mínima que los productores e industrias de alimentos se deben proponer y lograr, si bien pueden aspirar a fijarse otras metas más exigentes.

Los OSA no son aplicados a los lotes individuales ni especifican planes de muestreo, número de unidades analizadas, etc., tal el caso de un objetivo de seguridad alimentaria para alimentos enlatados con baja acidez que se establece así: 'la probabilidad de la presencia de un endosporo viable de *Clostridium botulinum* será tan baja como  $10^{-12}$  por lata', y esto es alcanzable por la medición del tiempo y la temperatura del tratamiento térmico aplicado.

Los OSA definen el nivel de control que se espera para una operación y puede ser satisfecho mediante la implementación de las 'buenas prácticas' de producción, manufactura y distribución, y el sistema de 'análisis de peligros y control de puntos críticos'. Además traducen la meta de salud pública en un nivel de control medible, de acuerdo al cual son diseñados los procesos para que el alimento resultante sea aceptable.

También permiten a las autoridades de control comunicar a la industria qué se espera de los alimentos elaborados en operaciones conducidas adecuadamente y establecen la rigurosidad bajo la cual el sistema de control puede operar, por especificación de un peligro microbiológico cuya concentración no podrá ser excedida en el momento del consumo u otro parámetro (23).

---

## Referencias

1. Hurst J, ed. Manual of Environmental Microbiology. ASM Press, Washington, 1997.
2. Carrillo L, Ubeid C. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 30 : 117, 1996.

3. Carrillo L y otros. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 21 : 321, 1987.
4. Mehta SK *et al.* *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1835, 1996.
5. Ivanov V. *Environmental Microbiology for Engineers*. CRC Press, Boca Raton, FL, 2011.
6. Atlas RM, Bartha R. *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. 4° ed. Addison Wesley, Madrid, 2002.
7. Eaton AD *et al.* *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19° ed. APHA, Washington, 1995, parte 9000.
8. Guinea J *et al.* *Análisis Microbiológico de Aguas : Aspectos Aplicados*. Omega, Barcelona, 1979.
9. Downes FP, Ito K, eds. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 4ª ed. APHA, Washington, 2001.
10. Mahon CR, Manuselis G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Saunders, Philadelphia, 1995.
11. Adams MR, Moss MO. *Microbiología de los Alimentos*. Acribia, Zaragoza, 1997.
12. Mossel DAA *et al.* *Microbiología de los Alimentos*. 2° ed. Acribia, Zaragoza, 2003.
13. Board RG. *Introducción a la Microbiología de los Alimentos*. Acribia, Zaragoza, 1988.
14. Doyle MP *et al.*, editores. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington, 1997.
15. Déak T, Beuchat LR. *Handbook of Food Spoilage Yeasts*. CRC Press, Boca Ratón, 1996.
16. Lacey J. *Journal of Applied Bacteriology*, Symposium Supplement, 1989, p. 11S.
17. Carlile MJ *et al.* *The Fungi*. 2° ed. Academic Press, San Diego, 2001.
18. Beuchat LR, ed. *Food and Beverage Mycology*. Van Nostrand Reinhold, New York, 1987.
19. Smith JE, Henderson RS, editores. *Mycotoxins and Animal Foods*. CRC Press, Boca Ratón, 1991.
20. Quevedo JM. *Agronomía* 3 (8-9): 3, 1912.
21. Summerell BA *et al.*, editores. *Fusarium*. APS Press, St. Paul, 2001.
22. Krska R *et al.* *Mycotoxin Research* 13(1): 11, 1997.
23. ICMSF. *Microorganisms in Foods*. Vol. 7. Kluwer Academic/ Plenum, New York, 2002.
24. Codex Alimentarius. *Higiene de los Alimentos*. Textos Básicos. FAO, Roma, 1999, p 45.