

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología III



TESIS DOCTORAL

Estudio de la microflora fúngica, cepas toxigenicas y presencia de aflatoxinas en las principales especies comerciales españolas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Joaquín Antonio Berenguer Soler

DIRECTOR:


Carlos Ramírez Gómez

Madrid, 2015

" ESTUDIO DE LA MICROFLORA FUNGICA, CEPAS
TOXIGENICAS Y PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN
LAS PRINCIPALES ESPECIAS COMERCIALES
ESPAÑOLAS "

por

Joaquín Antonio Berenguer Soler.



Memoria presentada en la
Facultad de Ciencias Biológicas
de la Universidad Complutense de
Madrid para optar al grado de
Doctor.

Madrid, 1.986.



R. 23.018

A mis padres.



Deseo dar las más expresivas gracias:

Al Profesor D. Carlos Ramírez, sin cuya di
rección no hubiera sido posible la realización de
este trabajo.

Al Profesor D. Dimas Fernández Galiano por
aceptar ser ponente de esta tesis.

Al Dr. Angel Martínez por sus consejos y
orientaciones.

A D. Gabriel Jiménez, Dña. Carmen Sánchez,
D. Luis González y D. Juan Olmedo, por su estímulo
constante y desinteresada ayuda.



1.- INTRODUCCION	1
1.1.- Especia: Definición y concepto. Legisla- ción vigente	1
2.- OBJETO E INTERES DEL TRABAJO	9
2.1.- Características de los productos objeto de estudio	9
2.2.- Contaminación. Esterilización. Toxicidad Criterios microbiológicos	12
2.3.- Objetivos e interés	36
3.- MATERIAL Y METODOS	39
3.1.- Muestreo	39
3.2.- Recuento en placa	41
3.2.1.- A partir de una sola dilución ..	44
3.2.2.- Mediante la recta de regresión .	45
3.3.- Estudio de la micoflora: Aislamiento de colonias	45
3.3.1.- Identificación de mohos	47
3.3.2.- Identificación de levaduras	57
3.4.- Soluciones y colorantes	68
3.5.- Investigación de aflatoxinas: Selección de técnicas	71
3.5.1.- En especias	71
3.5.2.- En cultivos de laboratorio: Estu dio de cepas aflatoxigénicas ...	91

4.- RESULTADOS	94
4.1.- Resultados cualitativos: Micoflora de <u>es</u> <u>pecies</u>	94
4.1.1.- Taxonomía aplicada. Relación de hongos encontrados. Descripción de especies. Micrografías	94
4.1.2.- Micoflora del pimentón	286
4.1.3.- Estadística	289
4.1.3.1.- Porcentajes de apari- ción	289
4.1.3.2.- Estudio de frecuencias de géneros dominantes.	290
4.1.3.3.- Recuentos en muestras de pimentón. Histogra- mas	291
4.2.- Resultados cuantitativos	296
4.2.1.- Recuento en placa	297
4.2.1.1.- Valores obtenidos a partir de una sola di- lución	297
4.2.1.2.- Valores obtenidos me- diante la recta de re- gresión	299
4.2.2.- Análisis de aflatoxinas en espe- cias	299
4.2.3.- Estudio de cepas aflatoxigénicas en cultivos de laboratorio	300
5.- DISCUSION	302
5.1.- Limitaciones inherentes al muestreo	302

5.2.- Micoflora de especias	304
5.2.1.- Examen de los datos referentes a especies aisladas	305
5.2.2.- Diferencias entre pimentones ...	312
5.3.- Resultados cuantitativos	316
5.3.1.- Recuento en placa (Análisis de las variaciones cuantitativas) .	316
5.3.2.- Aflatoxinas y cepas productoras.	329
5.3.3.- Contaminación. Toxicidad. Impor- tancia sanitaria. Legislación ..	340
6.- CONCLUSIONES	347
7.- TABLAS Y FIGURAS	354
8.- BIBLIOGRAFIA	384

1.1.- Especia: Definición y concepto. Legisla-
ción vigente.-

El Código Alimentario Español (1.967), en su capítulo XXIV, apartado 3.24.21, Sección 3ª, designa con el nombre de especias o condimentos aromáticos a "las / plantas, frescas o desecadas, enteras o molidas que, por tener sabores u olores característicos, se destinan a la condimentación o a la preparación de ciertas bebidas".

La legislación española vigente al respecto, elaborada a partir de las directrices recogidas en el Código Alimentario, se promulgó bajo la denominación de / "Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, / fabricación, circulación y comercio de condimentos y especias", mediante el Real Decreto 2242/1.984, de 26 de / septiembre, publicado en el Boletín Oficial del Estado / Nº 306 de 22 de diciembre de 1.984. En esta disposición se deroga la legislación preexistente (B.O.E. números / 293, de 7/XII/60, y 177, de 26/VII/61).

El esquema de la Reglamentación técnico-sanitaria propuesta para condimentos y especias puede resumirse como sigue:

TITULO PRIMERO: Definiciones y clasificacio--

nes.

- **Especia o condimento aromático.**
- **Condimentos preparados o sazonadores.**
- **Sucedáneos de especias.**
- **Clasificación y denominación de las espe--
cias.**
- **Clasificación de los condimentos preparados
o sazonadores.**

**TITULO SEGUNDO: Condiciones de las industrias,
de los materiales y del personal.**

- **Requisitos industriales.**
- **Requisitos higiénico-sanitarios.**
- **Condiciones generales de los materiales.**
- **Condiciones del personal.**
- **Manipulaciones permitidas y prohibidas.**

TITULO TERCERO: Registro sanitario.

- **Identificación de la industria.**

**TITULO CUARTO: Materias primas, otros ingre--
dientes y aditivos. Características de los productos ter
minados.**

- **Materia primas y otros ingredientes.**
- **Aditivos.**
- **Características de los productos terminados.**

— Especificaciones microbiológicas.

— Características específicas.

TITULO QUINTO: Envasado, rotulación, presentación y publicidad.

TITULO SEXTO: Almacenamiento, transporte, venta, exportación e importación.

TITULO SEPTIMO: Responsabilidades y competencias.

TITULO OCTAVO: Métodos de análisis.

—0—

En el TITULO PRIMERO se define, a efectos de / Reglamentación, a las especies o condimentos aromáticos como "plantas o partes de las mismas, frescas o desecadas, enteras, troceadas o molidas, que por su color, aroma o / sabor característicos, se destinan a la preparación de alimentos o bebidas, con el fin de incorporarles estas características, haciéndoles más apetecibles y sabrosos y, en consecuencia, consiguiendo un mejor aprovechamiento de los mismos".

A continuación, dentro del TITULO PRIMERO, se designa como condimento preparado o sazonador al "producto obtenido por la simple mezcla de varias especies o con

autorizadas específicamente", como sal, azúcares, harinas, féculas, almidones, vinagre, grasas y aceites comestibles. Los condimentos preparados a los que se incorporen aditivos cuya acción va a desarrollarse en la elaboración del preparado alimenticio al que van dirigidos y cuya presencia en el condimento preparado está explicada por su mayor facilidad de dosificación y homogeneización en las materias primas a las que se va a incorporar, no tendrán la consideración de "condimentos preparados", sino la de "aditivos" y, a tal efecto, así serán considerados administrativa y jurídicamente.

Por último, se consideran sucedáneos de especias a "los productos elaborados con ingredientes distintos de las especias que marcan su denominación, de propiedades parecidas, que adoptan la misma presentación, / aspecto físico y usos que la especia genuina, y están / destinados a reemplazarla".

Posteriormente, y siempre dentro del TITULO PRIMERO, se procede a la clasificación y denominación de las especias que, según la parte vegetal que les confiere su acción, resultan encuadradas (con carácter enunciativo, no limitativo) en:

1.- ARILOS.

1.1.- Macis (Myristica fragans Houttyl).

2.1.- Ajo (Allium sativum L.).

2.2.- Cebolla (Allium cepa L., y otras variedades comestibles).

3.- CORTEZAS.

3.1.- Canela (Cinnamomum ceylanicum Blume, C. cassia Blume, C. burmani Blume, y otras especies).

4.- FLORES Y PARTES FLORALES.

4.1.- Alcaparra (Capparis spinosa L., C. ovata Desp.).

4.2.- Azafrán (Crocus sativus L.).

4.3.- Clavo (Caryophyllus aromaticus L.).

5.- FRUTOS.

5.1.- Alcaravea = Comino alemán o de prado (Carum carvi

5.2.- Anís (Pimpinella anisum L.).

5.3.- Apio (Apium graveolens L.).

5.4.- Badiana = Anís estrellado (Illicium verum Hooker).

5.5.- Cardamomo (Elettaria cardamomum White y Maton, y especies afines).

5.6.- Cilantro (Coriandrum sativum L.).

5.7.- Comino (Cuminum cyminum L.).

5.8.- Enebro (Juniperus communis L.).

5.10.- Pimentón (Capsicum annuum L., C. longum D.C.).

5.11.- Pimienta blanca (Piper nigrum L.).

5.12.- Pimienta de Cayena (Capsicum frutescens L., C. baccatum L., C. fastigiatum B.L.).

5.13.- Pimienta de Jamaica = Pimienta inglesa (Pimenta officinalis Berg.).

5.14.- Pimienta negra (Piper nigrum L.).

5.15.- Vainilla (Vainilla planifolia Andrews, V. pompona Schiede).

6.- HOJAS Y SUMIDADES.

6.1.- Ajedrea (Satureja hortensis L.).

6.2.- Artemisa (Artemisia vulgaris L.).

6.3.- Espliego (Lavandula spica L.).

6.4.- Estragón (Artemisia dracunculus L.).

6.5.- Hierbabuena (Mentha arvensis L.).

6.6.- Laurel (Laurus nobilis L.).

6.7.- Mejorana (Thymus mastichina L. y Origanum mejorana L.).

6.8.- Menta (Mentha piperita L., M. viridis L., M. aquatica L., y otras).

6.9.- Orégano (Origanum vulgare L., O. virens Hoffgg.).

Hofpm.).

6.11.- Poleo (Mentha pulegium L.).

6.12.- Romero (Rosmarinus officinalis L.).

6.13.- Salvia (Salvia officinalis L., S. lavandulaefolia Walp.).

6.14.- Tomillo (Thymus vulgaris L. I. zygis L., I. piperella L.).

7.- RIZOMAS Y RAICES.

7.1.- Cálamo (Acorus calamus

7.2.- Cúrcuma = Cedoaria (Curcuma zedoaria Rose).

7.3.- Galanga (Alpinia officinarum Hance y otras especies del mismo género).

7.4.- Jengibre (Zingiber officinale Rose).

8.- SEMILLAS.

8.1.- Ajonjolí = Sésamo (Sesamum orientale, S. indicum

8.2.- Mostaza (Brassica juncea, B. nigra Koch, Sinapis alba L.).

8.3.- Nuez moscada (Myristica fragans / Houttyl.).

pulaciones permitidas y prohibidas, se autoriza la esterilización de las especias y condimentos por procedimientos físicos y químicos, con mención expresa del óxido de etileno como agente esterilizante (siempre que el residuo no exceda de 50 ppm.). Además, se autoriza la manipulación de las especias para la limpieza, selección, desecación, deshidratado, liofilizado, troceado y molido de la especia natural sin adición o mezcla de componente alguno.

Se prohíbe la venta a granel al consumidor final, entre otras prohibiciones generales y específicas.

En el TITULO CUARTO, dentro del Artículo 15, que contempla las características de los productos terminados, entre sus Condiciones Generales (15.1), se mencionan las Especificaciones Microbiológicas, señalándose / que "las especias y condimentos no contendrán microorganismos patógenos o sus toxinas, y se tolerarán los siguientes límites máximos:

Escherichia coli 1×10^1 col./gr.

Sulfito reductores
anaerobios esporulados ... 1×10^3 col./gr.

Salmonella Ausencia en 25 gr."

de Análisis, hasta tanto no existan los métodos oficiales que correspondan, la Comisión Interministerial para la Ordenación Alimentaria (C.I.O.A.), recomendará los métodos precisos, coordinando su actuación con el Centro / Nacional de Alimentación y Nutrición, con el Centro de / Investigación y Control de la Calidad y con el Laboratorio Agrario del Estado.

2.- OBJETO E INTERES DEL TRABAJO.-

2.1.- Características de los productos objeto de estudio.-

Las especias y condimentos se emplean principalmente en las prácticas culinarias de preparación y aderezo de numerosos alimentos, tanto a nivel particular o familiar como a nivel industrial (industrias cárnicas, fabricación de embutidos, chacinería, quesos, etc.), incorporándose por tanto a diversos aspectos de la alimentación humana.

Su consumo se realiza generalmente en su estado natural, secas, deshidratadas, enteras, molidas o liofilizadas, aunque en algunos casos se procede a la extracción del principio activo y su posterior comerciali-

tural.

Según Müller (1.981), sus efectos se deben / fundamentalmente a su contenido en aceites esenciales, / alcaloides y taninos, y en muchas ocasiones se incluye a las especias entre las denominadas plantas medicinales / como consecuencia de los efectos farmacológicos de las / sustancias que contienen.

Una de las características destacables de las especias, de interés para nuestro estudio, es la presencia en muchas de ellas de sustancias con acción antimicrobiana. Es un hecho, conocido desde la Antigüedad, la utilización de especias y aceites vegetales para embalsamar cadáveres, ya que los protegían frente a la putrefacción. Hoy se sabe que entre los componentes de las sustancias antimicrobianas de las especias se cuentan alcaloides (en la pimienta, por ejemplo), taninos y ácidos orgánicos (como por ejemplo el ác. benzoico del clavo y la canela); en numerosas especias los compuestos con tal acción son los propios aceites esenciales, mezclas de diferentes productos volátiles entre los que se incluyen / hidrocarburos, alcoholes, cetonas, fenoles, éteres fenólicos, ácidos y sus ésteres, derivados sulfurados, etc. Muchos de los hidrocarburos, alcoholes y cetonas son de naturaleza terpenoide. En algún caso, como ocurre con la

cias se incluyen entre los antibióticos elaborados por / los vegetales superiores (Tokin, 1.956).

Entre las sustancias con acción antimicrobiana contenidas en las especias, Müller (1.981) cita como las mejor conocidas a las reunidas en la TABLA I.

La concentración de los aceites esenciales va ría bastante entre los distintos condimentos y especias. Entre los más ricos, se encuentran el clavo (15-17 %) y la nuez moscada (alrededor del 16 %).

Su poder antimicrobiano se valora mediante el coeficiente fenólico, afectando a los diferentes microor ganismos con intensidad variable (Korzybski y Korylowicz, 1.961): se ha comprobado que los aceites esenciales de / clavo, canela y ajo tienen un efecto bactericida muy acu sado, mientras que los aceites esenciales de alcaravea, eneldo, comino, anís y canela inhiben especialmente el / crecimiento de los hongos.

Es destacable el efecto de la esencia de tom llo, con un coeficiente fenólico de 13,4 (Herrmann, 1.963).

CONTAMINACION.-

La mayoría de las especies presentan unos hábitats geográficos de cultivo cuyas condiciones climatológicas favorecen el desarrollo de una amplia variedad / de microorganismos, tanto bacterias como mohos y levaduras.

Las especias y condimentos, al igual que los productos agrícolas en general y algunos de ellos en particular (hierbas y plantas aromáticas), se contaminan microbiológicamente durante las distintas fases del cultivo, recolección, transporte, almacenamiento, elaboración procesado, envasado, distribución, etc., predominando generalmente las poblaciones de bacterias aerobias formadoras de esporas. Los mohos aparecen usualmente como esporas más que como micelios vegetativos, variando sus poblaciones entre límites muy amplios. Según Hesseltine / (1.965), tras la cosecha el crecimiento del moho depende del nivel de humedad del producto, temperatura y humedad del ambiente, rapidez del secado, aireación, aparición / de microclimas locales como consecuencia del desarrollo de diversos microorganismos sobre los productos agrícolas almacenados, insectos, suciedad, tratamiento químico,

etc.

Se sabe que la mayoría de las especias usadas en la alimentación humana están contaminadas en diverso grado con bacterias, hongos e incluso insectos. También se conoce desde hace mucho tiempo que los condimentos / dan origen a la alteración o destrucción ocasional de / los alimentos a los que han sido adicionados. Los estu—
dios conducidos por James (1.938) mostraban ya que la / mostaza molida contiene una microflora más abundante que las semillas enteras, compuesta además por mohos, levadu
ras y bacterias. Fabian et al. (1.939) observaron que la mezcla de especias usada en la preparación de escabeches provocaba la alteración del alimento por sí sola, al con
trolar el resto de posibles factores influyentes.

Desde entonces, numerosos autores han estudia
do la contaminación microbiológica de las distintas espe
cias, principalmente la contaminación bacteriana, así co
mo los diversos aspectos sobre la variabilidad y supervi
vencia de dicha microflora, adición a otros alimentos, /
etc.: Smith (1.940), Yesair y Williams (1.942), Castell
(1944), Lal y Sadasivan (1944), Proctor et al. (1.950),
Coretti (1.955), Pohja (1.957), Misra (1.962), Rao et al.
(1.962), Strong et al. (1.963), Silliker (1.963), Pruthi
(1.964), Warmbrod y Fry (1.966), Kinner et al. (1.968),

(1.969, 1.970), Vaughn (1.970), Clarck (1.970), Krishnaswamy (1.971, 1.973), Swarup y Mathur (1.972), Hadlok y / Taure (1.973), Julseth y Deibel (1.974), Gerhardt (1.974) Likewise et al. (1.974), Powers et al. (1.975), Zschaler (1.979), Müller (1.981), ...

Las conclusiones generales que pueden establecerse de sus estudios parten del hecho de que, aunque muchos condimentos contienen sustancias antimicrobianas, / como ya hemos indicado, las especias suelen presentar una elevada tasa de microorganismos como contaminantes / bióticos y es frecuente que la alteración de los alimentos a los que se adicionan estos productos se deba a los microorganismos aportados por ellos, especialmente cuando se trata de embutidos y otros productos cárnicos. Según Coretti (1.955), merece especial atención el elevado contenido en esporas bacterianas: las esporas de bacterias aerobias (Bacillus subtilis y especies afines) y anaerobias (Clostridium, ...) plantean dificultades en la fabricación de embutidos cocidos y otros productos cárnicos; así, por ejemplo, se han observado numerosos casos de abombamientos en conservas de jamón y de alteración / en embutidos crudos mal curados atribuibles a la pimienta (según Richmond y Fields, 1.966, en 28 muestras de pimienta negra detectaron entre 600 y 570.000 esporas/gr.,

Bodrossy señalaba que en casi la mitad de 345 muestras / estudiadas, procedentes de la industria cárnica, se pudo comprobar la presencia de Escherichia coli, y en 3 la de Salmonella. En algunos casos (Ormay et al., 1.968) se in forma incluso de envenenamientos aparecidos en Hungría, causados por Bacillus cereus, localizados en ámbitos ca- seros y como consecuencia de un sazonamiento muy abundan- te en pimentón.

En la TABLA II, reunida por MÜller (1.981), / se recogen algunos datos sobre contaminación microbiana de especias y condimentos.

—0—

Dejando a un lado los datos sobre la contami- nación bacteriana y centrándonos sobre nuestro objeto de estudio, la micoflora de las especias, Christensen et al. (1.967) señalan que las especias y condimentos contienen numerosas especies de Penicillium, Aspergillus, Cladospo- rium, Scopulariopsis y otros, sobre todo en forma de es- poras. De la pimienta negra, pimentón dulce y pimentón / picante aislan preferentemente Aspergillus glaucus y A. restrictus, aunque también encuentran con frecuencia A. flavus y A. ochraceus, algunas de cuyas cepas producen /

1.973) mencionan que mohos y levaduras se hallan presentes como flora infectante en las especias que estudiaban (pimienta negra, cilantro, mostaza, comino, hinojo, "curry" en polvo, ...). No citan, sin embargo, las especies aisladas y tan sólo indican que la pimienta negra es la que proporcionaba unos recuentos más elevados: 9.800 col./gr.

Jay (1.978) cita datos sobre cifras de microorganismos en condimentos y especias recogidos en sistemas comerciales de ventas al por menor. Las especias estudiadas y los recuentos de mohos y levaduras obtenidos se recogen en la TABLA III (datos publicados por Karlson y Gunderson, 1.965).

Más recientemente, Schwab et al. (1.982) aportan datos sobre los recuentos de mohos y levaduras realizados sobre cinco especias: canela, clavo, jengibre, nuez moscada y pimentón. Señalan que los valores medios fueron bajos por lo general, y que la media más alta se obtuvo para la canela: 290 col./gr. No citan identificación taxonómica de especies fúngicas.

En lo que se refiere al efecto de las sustancias antimicrobianas contenidas en las especias, y antes citadas, sobre la población fúngica de estos productos, Hitokoto et al. (1.980) estudiaron el efecto de treinta /

ción de toxinas de tres especies de Aspergillus toxigénicos: A. flavus, A. ochraceus y A. versicolor. De todas / las especias estudiadas, tan sólo clavo, canela, semi---llas de anís estrellado y pimienta inglesa inhibían completamente el crecimiento fúngico "in vitro", siendo el clavo molido la especia que mostró un mayor efecto inhibitor sobre el crecimiento de los hongos ensayados. Por el contrario, doce de las especias (entre las que se encuentra el pimentón) tenían un efecto relativamente menor (del 0 al 45 %) sobre el crecimiento y la producción de toxinas por parte de las tres especies de Aspergillus.

En apoyo de sus resultados, citan a Christensen (1.972), que no encontró una fuerte polución por hongos sobre pimientos de Capsicum.

En cambio, diversos autores como Mislivec et al. (1.972), Hadlok (1.970), Christensen et al. (1.967), Pal y Kundu (1.972), ..., comunican elevadas tasas de recuento de mohos en especias diversas, principalmente pimienta blanca, pimienta negra, pimienta de Cayena y pimentón.

Entre las soluciones viables para una comercialización sujeta a normas sanitarias estrictas de las especias y condimentos, se incluye la desinfección o esterilización de estos productos.

Los métodos utilizados para eliminar o disminuir notoriamente la carga microbiana de las especias / han ido variando a lo largo del tiempo, y los más eficaces podemos resumirlos brevemente como sigue:

* CALOR SECO.- Su eficacia depende de las temperaturas alcanzadas en el proceso. Su utilización hoy / día está descartada a causa de las pérdidas que origina en aroma y sabor, además de fuertes alteraciones del color. Así, Gerhardt (1974) opina que hay que obviar los / tratamientos por calor, incluida la radiación infrarroja ya que el empleo de temperaturas elevadas va coligado a la pérdida de aceites esenciales y otros componentes / principales.

* CALOR HUMEDO.- Su evaluación en la esterilización de las especias data de 1.942 (Yesair y Williams): una permanencia de 15 minutos en autoclave a 121° C elimina eficazmente la microflora contaminante, pero provoca el deterioro intenso del aroma de las especias por / pérdida de volátiles, además de otros daños.

* IRRADIACION.-

diado desde 1.955 (Coretti), es eficaz tan sólo sobre /
gérmenes superficiales a causa de su escaso poder de pe-
netración en el material irradiado. Afecta principalmen-
te a las formas vegetativas, disminuyendo su eficacia al
actuar sobre formas esporuladas.

— Rayos catódicos, Rayos X, ... : Método
analizado por Török y Farkas (1.961), se revela más efi-
caz que las radiaciones U.V. a causa de su mayor poder /
de penetración.

Lake y Farber (1.966) estudiaron el efecto de
la irradiación sobre el contenido en bacterias, levadu-
ras y mohos de 12 especies, encontrando que la población
microbiana podía ser eliminada por completo o reducida a
niveles insignificantes, si bien hallaron que se produ-
cían cambios considerables en los complejos olorosos y /
sustancias volátiles, sobre todo en pimienta negra, cla-
vo y canela.

Según Mayr y Suhr (1972), la irradiación de /
especies presenta una serie de limitaciones entre las /
que incluyen el alto costo de la tecnología necesaria, /
la mayor experiencia técnica requerida en la industria,
un efecto adverso sobre color y aroma, y posibles proble-
mas en los límites de seguridad, junto a aspectos nutri-
cionales y toxicológicos por posibles cambios químicos,

especias.

Gerhardt (1.974), que desecha la radiación / U.V. por su escasa eficiencia, indica que la radiación / con electrones acelerados consigue reducciones del orden de 10^3 en el número de gérmenes (eficiente, por tanto, / hasta cierto punto). La utilización de rayos gamma la / considera con escepticismo debido a las rigurosas medi— das de seguridad a tomar, si bien su eficacia es notable, y su nula rentabilidad salvo en ciclo continuo, usando / al 100 % la fuente radiactiva.

* FUMIGACION: OXIDO DE ETILENO.- El tratamien to de las especias con óxido de etileno ($500 \text{ cm}^3/\text{m}^3$, 6 a 7 horas, a temperatura ambiente, por ejemplo) destruye / la mayoría de microorganismos contaminantes, aunque no / logra una esterilidad total del producto. Los restos del gas pueden eliminarse con una ventilación y aireación a— decuadas (Nechotenova, 1.961. Nieman, 1.969).

Mayr y Suhr (1.972) han demostrado que mez— clas fumigantes tales como ETOX (90 % óxido de etileno + 10 % CO_2) y mezclas semejantes son más eficaces y con me nores riesgos en su uso que el óxido de etileno en soli— tario, al disminuir, por ejemplo, el riesgo de explosión.

La fumigación con óxido de etileno es, tal / vez, el método más utilizado en la actualidad para el /

lor y aroma de algunas de ellas.

En octubre de 1.982 se publicó un informe del Programa Mixto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias (Comité del Código sobre productos tratados a base de carnes), / en el que se evaluaban los tratamientos de esteriliza— ción de las especias utilizadas en los productos cárni— cos. En este informe se admite que la esterilización de las especias es una práctica extendida como respuesta a las elevadas tasas de contaminación de estos productos, que estima entre 10^4 y 10^7 /gr. para bacterias y rara / vez superior a 10^5 /gr. para mohos, aún admitiendo gran— des variaciones en el recuento microbiano de lotes dife— rentes de la misma especia.

Asimismo, el informe resume los métodos utili— zados actualmente para esterilizar especias, concluyendo que el más empleado es la fumigación, fundamentalmente / con óxido de etileno (otros fumigantes, tales como óxido de propileno y bromuro de metilo, son menos eficaces, / aunque tal vez con menos problemas colaterales.).

El Comité conceptúa que el tratamiento con ó— xido de etileno destruye el 99 % o más de las bacterias y el 99,9 % o más de los mohos, siendo sumamente eficaz en la destrucción de las formas esporuladas.

lógico: puede provocar efectos mutagénicos retardados o toxicidad crónica, a causa de sus residuos o de productos tóxicos que pueden aparecer eventualmente de la interacción del gas con el producto alimentario. La "Food / and Drug Administration" de Estados Unidos admite una tolerancia máxima de 50 ppm de residuo de óxido de etileno en o sobre especias enteras, cantidad residual análoga a la tolerada por la legislación española vigente para estos productos.

En cuanto a los métodos de esterilización preferibles para futuras legislaciones, el informe del Comité valora positivamente la irradiación, tanto por medio / de radiaciones ionizantes (rayos X, rayos gamma, ...), / más efectiva por poseer mayor poder de penetración, como por medio de radiaciones no ionizantes (microondas). Se acepta en este tratamiento un efecto bactericida elevado y un gran poder de neutralización de mohos micotoxigénicos, junto a una escasa pérdida de volátiles, mínimos / productos de reacción y prácticamente nula variación de color en las especias a las dosis de irradiación requeridas. En su contra se argumenta la posible aparición de / microorganismos seleccionados o mutantes patógenos resistentes a la irradiación, y también la necesidad de una evaluación toxicológica minuciosa de los productos alimenen

En el mismo informe, también se considera el incremento que toma la utilización de extractos de especias (oleoresinas y esencias naturales) como un eficaz / método indirecto de esterilización.

TOXICIDAD.-

Al considerar el aspecto particular de la contaminación fúngica de las especias, hay que hacer una referencia obligada a la posible existencia en estos productos de mohos micotoxigénicos y sus metabolitos tóxicos.

Aunque parece lógico denominar micotoxinas, / en principio, a todas las toxinas elaboradas por los hongos, el uso ha restringido este término a una categoría bien precisa: Toxinas zootóxicas extracelulares (exotoxinas) producidas por mohos sobre alimentos consumidos por el hombre y animales.

Según Mossel (1.975), ya en 1.974 se conocían no menos de 150 especies de mohos micotoxigénicos, de / los cuales 39 pertenecían al género Aspergillus, 37 al / género Penicillium y 15 al género Fusarium.

En la mayor parte de los casos, los hongos toxigénicos crecen y proliferan sobre los productos alimentarios; sus toxinas difunden en el alimento de manera /

del hongo responsable.

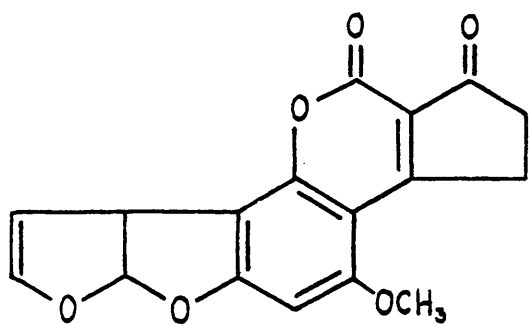
El número de micotoxinas conocidas en la actualidad es elevado y existen numerosos trabajos de investigación sobre otros metabolitos fúngicos con actividad tóxica para animales de experimentación. Por su interés, entre las micotoxinas conocidas ya investigadas en numerosos alimentos pueden destacarse las siguientes:

- Ac. penicílico (Penicillium chrysogenum, P. verrucosum var. cyclopium, ...).
- Aflatoxinas (Aspergillus flavus, A. parasiticus, ...).
- Citrinina (Penicillium citrinum, ...).
- Ocratoxinas (Aspergillus ochraceus, ...).
- Patulina (Penicillium expansum, ...).
- Toxina PR, roquefortina (Penicillium roqueforti, ...).
- Esterigmatocistina (Aspergillus versicolor, / ...).
- Tremórgenos: Penitrem (A, B, C), verruculógeno, fumitremorgina, triptoquivalina. (Penicillium spp, Aspergillus spp, Claviceps spp).
- Tricotecenos: Toxina T-2, diacetoxiescirpenol (Fusarium spp).
- Zearalenona (Fusarium spp).

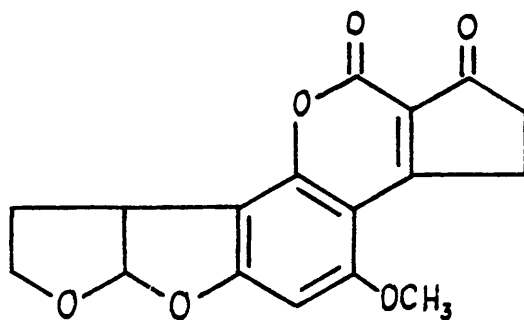
relacionadas con nuestro estudio, vamos a referirnos brevemente a las micotoxinas más estudiadas y analizadas en multitud de alimentos: las aflatoxinas.

Son metabolitos tóxicos producidos principalmente por cepas de Aspergillus flavus Link y A. parasiticus Speare. Químicamente derivados de las bisfurano-cumarinas, se producen entre 7,5 y 40° C, con un óptimo de / producción entre 24 y 28° C. Sobre la producción de aflatoxinas en cultivos "in vitro" (y, paralelamente, en condiciones naturales) influyen, además de la temperatura, diversos factores físicos y nutricionales, tales como el contenido en agua del sustrato (a_w), pH, fuentes de C y N, iones minerales, etc. (Moreau, 1.974).

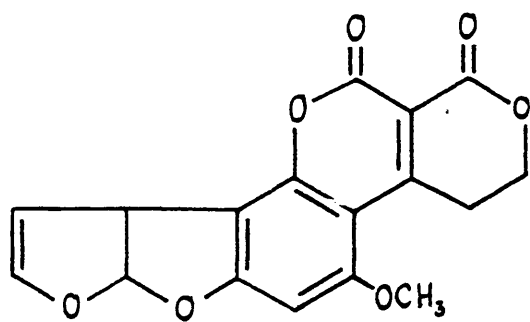
Actualmente se conocen numerosas aflatoxinas, aunque las inicialmente estudiadas y consideradas de mayor importancia desde el punto de vista de la contaminación de alimentos son las denominadas B₁, B₂, G₁, G₂, / B_{2a}, G_{2a}, M₁ y M₂. De ellas, B₁, B₂, G₁ y G₂ son las que aparecen más frecuentemente como contaminantes; B_{2a} y / G_{2a} son derivados, respectivamente, de B₁ y G₁, con gran valor diagnóstico; M₁ y M₂ son derivados metabólicos de B₁ y B₂, respectivamente, y aparecen en la leche de los mamíferos que han ingerido fuertes cantidades de B₁ y B₂.



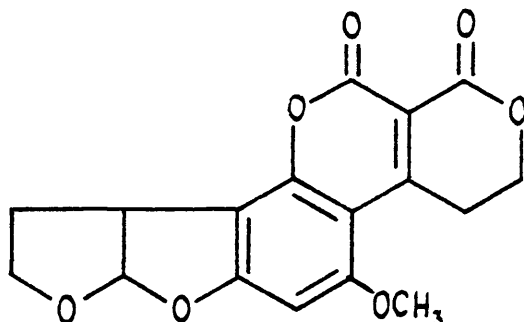
B₁



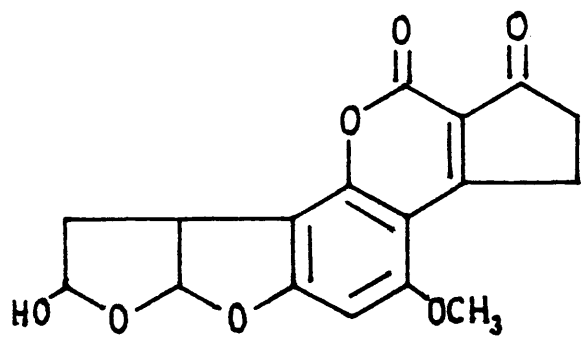
B₂



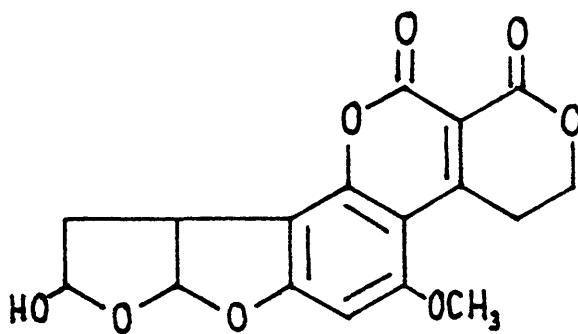
G₁



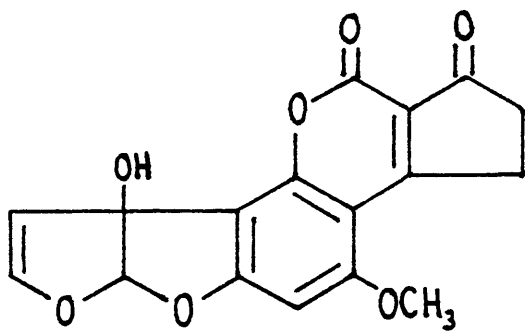
G₂



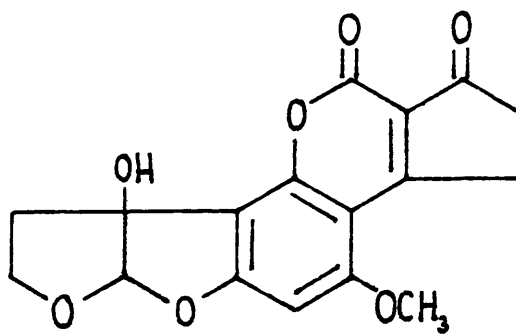
B_{2a}



G_{2a}



m₁



m₂

bles a los oxidantes enérgicos (Fisbach y Campbell, /
1.965) y pueden ser detectadas por diversos métodos de /
análisis: C.C.F., minicolumnas de florisil, H.P.L.C., /
R.I.A., E.L.I.S.A., etc. Se visualizan fácilmente bajo /
luz U.V. de 254 y 366 nm., mostrando fluorescencias ca--
racterísticas.

Su mayor interés sanitario estriba en su po--
tente acción carcinogénica (al igual que otras de las
micotoxinas antes mencionadas). De hecho, se considera a
las aflatoxinas entre los más potentes agentes hepatocar
cinogénicos activos por vía oral conocidos: la fase de
inducción de los procesos cancerosos es breve y la dosis
necesaria mínima.

La carcinogénesis se establece por vías no /
completamente dilucidadas aún, si bien se conocen sus /
acciones como:

- Supresores de la síntesis del ADN.
- Inhibidores de la ARN-polimerasa.

De los datos proporcionados por Hesseltine /
(1.967), la International Agency for Research on Cancer
(1.970), Wogan y Shank (1.971), Shank et al. (1.971), /
Peers y Linsell (1.973), Suárez y Escudero (1.973), /
Peers et al. (1.976), Stoloff y Friedman (1.976), etc.,
obtenidos por estudios sobre animales de experimentación

U.S.A., ..., podría inferirse que las aflatoxinas son agentes causales de cáncer hepático en los países citados, si bien en muchos casos factores tales como deficiencia proteica, alcohol, enfermedades infecciosas y parasitarias (hepatitis vírica, amebiasis, leptospirosis) y ciertos productos químicos, podrían sumarse a la acción de / las aflatoxinas como agentes desencadenantes de hepatomas.

De todo lo expuesto se deduce que el riesgo / potencial por su localización en alimentos es muy elevado, y ya en 1.975 la "F.D.A." estadounidense propuso una tolerancia máxima de 15 ugr./Kgr. de aflatoxinas totales en alimentos, incluyendo piensos compuestos.

Ya se ha mencionado el estudio de Hitakoto et al. (1.980) relacionando el efecto inhibitorio de 30 especies comerciales sobre el crecimiento y producción de toxinas por parte de Aspergillus flavus, A. ochraceus y A. versicolor. Asimismo, se han citado los resultados de Christensen (1.972) sobre recuentos fúngicos poco elevados en pimientos del género Capsicum.

En contraposición, también hemos citado diversos autores (Mislivec, 1.972; Hadlok, 1.970; Christensen 1.967; Pal y Kundu, 1.972; ...) que informan de elevados recuentos fúngicos en diversas especies, resaltando los encontrados en cuanto a especies fúngicas particularmen-

vus. Concretamente, Christensen et al. (1.967) hallaron /
recuentos superiores a 20.000 col./gr. de A. flavus en /
pimienta negra y alrededor de 200.000 col./gr. de A. fla
vus en muestras de pimienta roja de la India, demostrán-
dose la presencia de aflatoxinas en casos aislados. /
Frank (1.966) informó de una cepa de A. flavus que produ-
jo aflatoxina G₁ sobre "paprika", pero no sobre granos /
de pimienta. Hadlok (1.970) halló que cerca de la terce-
ra parte de las cepas de A. flavus aisladas a partir de
especies elaboran aflatoxinas. Pal y Kundu (1.972) aisla-
ron cepas productoras de aflatoxinas al analizar mues-
tras de Capsicum annum y Piper nigrum. Shank et al. /
(1.972) encontraron elevados niveles de aflatoxinas tota-
les en pimientos de Chile de Tailandia. Scott y Kennedy
(1.973) detectaron, con un método propio de análisis, u-
na elevada incidencia de muestras de pimienta de Cayena,
Chile de la India en polvo y pimienta negra contaminadas
con aflatoxinas, si bien en bajas concentraciones. Suzu-
ki et al. (1.973) hallaron aflatoxinas en muestras de pi-
mienta negra, nuez moscada y semilla de apio, siendo ne-
gativos sus análisis sobre otras 10 especies. Estos auto-
res desarrollaron un método propio para lograr la detec-
ción cromatográfica en capa fina de las aflatoxinas, al
conceptuar no idóneos los preexistentes por proporcionar

grama. Beljaars et al. (1.975) informan de una elevada / incidencia de contaminación por aflatoxinas en nuez moscada, aunque no detectaron esta contaminación sobre o--- tras 17 especias, y concluyen sus estudios recomendando un estudio internacional para determinar la incidencia y nivel de contaminación por aflatoxinas en los diversos / tipos de especias comercializadas en todo el mundo.

CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS.-

Ante todo lo expuesto sobre la contaminación microbiana de las especias y condimentos, parece evidente la necesidad de la formulación de estándares de calidad microbiológica para estos productos, necesidad que ha sido recalcada por diversos autores: Natarajan y Shan karacharya (1.972), Masson (1.978), Schwab et al. (1982), etc.

En la actualidad, están establecidos los denominados estándares de calidad para productos de las especias, reunidos por organismos diversos (ISO, EOA, MIL, / BSI, ISI, ...), con el grave problema de la enorme variabilidad de los resultados de los análisis de los distintos laboratorios sobre un mismo producto. Hasta el momento, los estándares microbiológicos establecidos por la / "International Organization for Standardization (ISO)" y

tándares para cada país deberían determinarse esencialmente en base a los datos actuales recogidos en el país en cuestión.

Los criterios o estándares microbiológicos / tradicionales se establecen sobre la consideración de / que un producto alimenticio está exento de peligrosidad microbiológica cuando la tasa de un determinado patógeno o indicador no excede de un cierto número por gramo o alicuota previamente establecido (Jay, 1.978). Debido al fenómeno constatado de que la población bacteriana puede variar considerablemente entre diferentes alícuotas, la "International Commission for Microbiological Specifications for Foods" (I.C.M.S.F., 1.974) ha recomendado programas de toma de muestras con el fin de compensar esta variabilidad y mejorar la fiabilidad de los resultados / de los análisis microbiológicos.

Un programa de toma de muestras consiste básicamente en el establecimiento de un criterio de aceptación para un lote determinado. Dicho criterio se fundamenta en una serie de análisis realizados, por métodos / específicos, sobre un número representativo de alícuotas. Un programa de muestreo consiste, por tanto, en un procedimiento de muestreo y en los criterios de decisión. Pueden ser programas de dos-clases o tres-clases. En un pro

m. En un programa de tres-clases se precisa conocer los valores de n, c, m y M, donde:

n: número de alícuotas procedentes de un lote que deben analizarse para satisfacer un determinado programa de muestreo.

c: número máximo aceptable (o permisible) de alícuotas que pueden exceder a un criterio microbiológico. Es una medida del número / de alícuotas en los que la tasa microbiana está comprendida entre m y M. Cuando el número sobrepasa el nivel que establece c, / el lote se rechaza.

m: número o nivel máximo de microorganismos/ gramo. Los valores superiores a este nivel se rechazan o se aceptan provisionalmente. m se utiliza, en el programa de dos-clases, para separar los alimentos aceptables de / los rechazables, mientras que en el de / tres-clases se usa para separar los alimentos de buena calidad microbiana de aquellos cuya calidad es aceptable sólo provisionalmente (calidad marginal). La tasa / del microorganismo en cuestión que es aceptable y a la que puede llegar en ese ali--

dos-clases, $m=0$. Para los programas de /
tres-clases, habitualmente $m \neq 0$.

M : valor que se usa para separar los alimen--
tos rechazables de los que tienen una cali--
dad aceptable provisionalmente. Sólo se u--
tiliza en los programas de tres-clases. En
cualquier muestra, valores iguales o supe--
riores a M son inaceptables ya que pueden
representar un peligro para la salud (si /
alcanza un nivel determinado de indicado--
res sanitarios) o constituir un peligro po--
tencial de alteración (calidad defectuosa).

La garantía que puede tener un alimento en re--
lación a las toxinas y microorganismos patógenos se pone
de manifiesto al investigar a los organismos indicadores.
Los recuentos totales tienen valor para investigar la ca--
lidad higiénica de los alimentos, mientras que la exis--
tencia de estándares microbiológicos se basa en la idea
de que un número bajo de microorganismos ofrece cierta /
garantía de no contener microorganismos patógenos, y per--
mite una vida comercial más larga de los productos alma--
cenados sobre los que estos microorganismos pueden desa--
rrollarse (Jay, 1.978).

La I.C.M.S.F. (1.974) recomendó los siguien--

un programa de tres-clases:

- Recuento en placa de aerobios.-

$$n=5. c=2. m=10^4/\text{gr. } M=10^6/\text{gr.}$$

- Recuento en placa de mohos y levaduras.-

$$n=5. c=2. m=10^2/\text{gr. } M=10^4/\text{gr.}$$

Schwab et al. (1.982) informan de un estudio microbiológico realizado sobre 10 especies. Como consecuencia de que el plan de muestreo no lo diseñaron sobre 5 unidades de muestra de un lote dado, no pudieron aplicar directamente los Criterios recomendados por la I.C.M. S.F. (1.974) para calcular la incidencia de lotes de productos no aptos a partir de sus resultados experimentales. Sin embargo, obtienen alguna indicación de las tasas de rechazo por comparación de los resultados de las unidades individuales de muestra con los referidos Criterios. Así, aplicando el criterio $M=10^6/\text{gr.}$ para los recuentos de aerobios en placas (A.P.C.), las tasas de rechazo que obtuvieron varían grandemente de producto a producto:

Semillas de apio	25	%
Canela	9	"
Clavo	0,1	"
Jengibre	50	"
Nuez moscada	0,2	"
Orégano	3	"

Pimienta	63	"
Romero	0,5	"
Tomillo	8	"

Los recuentos de mohos y levaduras se realizaron tan sólo sobre 5 de las 10 especias estudiadas. Los valores medios fueron generalmente bajos, obteniéndose / la media más alta para la canela: 290 col./gr.

Las tasas de rechazo para recuentos de mohos y levaduras en placas, con el criterio de $M=10^4$ /gr., fueron:

Canela	14	%
Clavo	0	"
Jengibre	0,5	"
Nuez moscada	0,3	"
Pimentón	0	"

Schwab et al. (1.982) sugieren que a la vista de resultados tan dispares, se precisan criterios específicos para cada producto o grupo de productos, más que / un solo criterio o grupo de criterios para todas las especias.

2.3.- Objetivos e interés.-

En el presente trabajo tratamos de analizar / la micoflora fúngica que aparece como contaminante en /

pais, y sus posibles implicaciones higiénico-sanitarias.

Las especias consumidas en España son importadas en su mayoría, y la producción nacional se circunscribe fundamentalmente a tan sólo dos: azafrán y pimentón. La situación actual de cultivo y producción nacional, sobre todo de pimiento para pimentón, es de minifundio (Laencina, 1.982), con predominio de las parcelas pequeñas y medianas sobre las grandes extensiones dedicadas a este cultivo. Datos de la campaña 1.980-1.981 demuestran que el 89 % de las parcelas tenían una superficie inferior a 5 Ha., y de ellas el 60 % no alcanzaba / las 2 Ha., aportando entre éstas más del 71 % de la producción de pimiento fresco para pimentón. Esta situación favorece en cierto modo el grado de contaminación que alcanzan las materias primas antes incluso de su llegada a la industria de transformación, que, fundamentalmente, / implica deshidratación y molienda, teniendo en cuenta / que el mismo agricultor realiza deshidrataciones naturales y almacenamiento de los frutos recolectados en muy / diversas condiciones de tratamiento y salubridad.

Por estas razones, nos parece de interés proceder al estudio más profundo de una especia en particular: el pimentón, una de las dos especias producidas con mayor entidad en nuestro suelo, y del que se exportan /

Para lograr nuestros propósitos, hemos basado nuestro estudio en los siguientes objetivos:

1) Averiguar el grado de contaminación fúngica de las especias más difundidas en nuestro país.

2) Conocer la micoflora contaminante en cada caso, y principalmente en las especias producidas en España, estudiando la composición en especies fúngicas y / sus abundancias respectivas.

3) Establecer para las especias nacionales / (pimentón), si es factible, comparaciones o relaciones / entre la micoflora aislada y la micoflora autóctona conocida de las zonas de producción.

4) Investigar la presencia de hongos toxigénicos entre la flora fúngica contaminante aislada.

5) Aplicar o desarrollar en su caso métodos analíticos específicos para especias concretas con el fin de proceder a la investigación de micotoxinas (aflatoxinas), y así obtener datos sobre su incidencia como contaminantes en los productos estudiados y, en todo caso, el grado de idoneidad de la metodología empleada.

Ante la existencia, reconocida por numerosos autores ya citados, de elevadas tasas de microorganismos en las especias, y ante la ausencia de reglamentaciones sanitarias específicas para estos productos, tanto a

a la micoflora contaminante, el interés de este estudio podríamos centrarlo en dos aspectos:

* Por un lado, en su contribución al conocimiento más exacto de la contaminación microbiológica de las especias, sobre todo al aspecto de contaminación fúngica del que apenas existen datos.

* Por otro lado, averiguar en lo posible el / grado de peligro potencial para el consumidor de la micoflora contaminante de las especias y, en su caso, de sus toxinas.

3.- MATERIAL Y METODOS.-

3.1.- Muestreo.-

Nuestro estudio lo hemos realizado sobre un / total de 220 muestras de especias y condimentos recogidas en establecimientos de venta al por menor (tiendas / de ultramarinos, supermercados, galerías comerciales, / herboristerías, etc.) y, en el caso del pimentón, procedentes además de almacenes localizados en las zonas productoras.

Los productos analizados pertenecen a marcas comerciales muy diversas, si bien hemos recogido un núme

tes a tres de las marcas comerciales que poseen actualmente una mayor penetración en el mercado nacional.

Generalmente, los productos los obtuvimos envasados (envases metálicos, de vidrio y plástico, de tamaños muy diversos), aunque también recogimos en envases estériles muestras procedentes de la venta a granel.

Las localidades donde hemos llevado a cabo el muestreo pertenecen a las provincias de Alicante (Alicante, Elche, Elda, Novelda), Badajoz (Badajoz), Cáceres / (Cáceres, Cuaco, Jaraiz, Jarandilla), Madrid (Madrid, Aranjuez) y Murcia (Murcia, Espinardo, Molina de Segura, Monteagudo). El motivo de elegir estas localidades ha sido el de disponer para nuestro estudio de muestras procedentes de las zonas geográficas españolas donde se produce mayoritariamente el pimentón: Murcia (zona de Espinardo) y Cáceres (comarca de La Vera), de muestras procedentes de zonas relativamente próximas (Alicante, Badajoz) y de muestras procedentes de una zona más alejada y equidistante de las productoras (Madrid).

La totalidad de las muestras la hemos dividido para su estudio en dos grupos específicos:

-- 120 muestras de pimentón, en sus tipos dulce, picante y ocal.

-- 100 muestras heterogéneas de un total de /

dos entre los 43 contemplados en el Código Alimentario / Español como los de uso más común en nuestro país, e incluyen: ajo, albahaca, anís, apio, canela, cebolla, clavo, comino, cúrcuma, "curry", chile, eneldo, estragón, / hierbabuena, laurel, mejorana, menta, nuez moscada, orégano, perejil, pimienta blanca, pimienta de Cayena, pimienta negra, romero, tomillo, vainilla y algunos sazonadores.

El motivo de establecer estos dos grupos de / muestreo es doble:

- Por una parte, incidir ampliamente en el estudio de la micoflora del pimentón, como adelantamos en / nuestros objetivos, y por los motivos allí citados.

- Por otro lado, obtener datos sobre la micoflora existente en un gran abanico de especias y condimentos con el fin de conocer sus posibles variaciones en / cuanto a recuento y diversidad de especies fúngicas.

3.2.- Recuento en placa.-

Para averiguar la carga micológica presente / en las especias estudiadas hemos recurrido a la técnica usual del recuento en placa de agar a partir de una serie previa de diluciones decimales del producto:

de Alimentos, cada muestra se suspende en la proporción 1/9 en Caldo de Triptona de Soja, medio líquido idóneo / para la revivificación de propágulos posiblemente estresados por las condiciones de los productos analizados. / Este paso de revivificación previo al recuento es necesario, según ha apuntado Mossel (1.982), para que todos / los propágulos existentes en el alimento se encuentren / en condiciones de originar una colonia de crecimiento, y así conseguir un recuento fiable.

La composición del MEDIO DE CULTIVO DE REVIVIFICACION es la siguiente:

Digerido pancreático de caseína	17.0 gr.
Digerido papaínico de haba de soja ..	3.0 "
Cloruro sódico	5.0 "
Fosfato potásico dibásico	2.5 "
Dextrosa	2.5 "
Agua destilada	1000 ml.

Se ajusta el pH del medio a 7 ± 0.1 y se esteriliza en autoclave durante 15 min. a 121° C.

Tras mantener la dilución inicial de la muestra en este medio líquido (dilución -1) durante 2 horas a temperatura ambiente ($20-25^{\circ}$ C), a partir de ella se / realizan diluciones decimales seriadas (-2, -3, -4, -5, ...) en AGUA ESTERIL CON TWEEN 80 AL 0.01 % como agente dispersante. Estas diluciones son las empleadas en la /

El medio de cultivo utilizado para el recuento en placa es el AGAR-GLUCOSA-OXITETRACICLINA, cuya composición se detalla a continuación:

Extracto de levadura	5.0 gr.
Dextrosa	20.0 "
Bilis de buey desecada	5.0 "
Agar	15.0 "
Oxitetraciclina	100 mg.
Agua destilada	1000 ml.

La totalidad del medio de cultivo, salvo la / oxitetraciclina, se esteriliza en autoclave durante 10 / min. a 115° C, tras haber ajustado el pH del medio a / 6.0 ± 0.1 . La oxitetraciclina se adiciona asépticamente, cuando el medio esterilizado se enfría hasta unos 40° C, en forma que se obtenga la concentración requerida.

Se trata de un medio recomendado para la se--lección y enumeración de mohos y levaduras en alimentos (Mossel et al., 1.970-1.973), en el que la oxitetracicli na actúa como agente selectivo impidiendo el crecimiento bacteriano (más rápido que el fúngico), y la bilis de / buey actúa como factor limitante del crecimiento en diámetro de las colonias de hongos invasores de crecimiento rápido (principalmente ficomicetos), que podrían recu---brir por completo la superficie del agar y dificultar o impedir incluso el recuento.

a cabo en masa, depositando 1 ml. de cada una de las diluciones decimales (-1, -2, -3, -4, -5, ...) en placas / de Petri estériles de 90 mm. de diámetro, y adicionando seguidamente el medio de recuento a unos 40° C, en una / cantidad aproximada de 20 ml. por placa. Es importante / dispersar homogéneamente la muestra en el medio de re-
cuento para conseguir valores correctos.

Tras la solidificación a temperatura ambiente de las placas de agar, se incuban en estufa de cultivos a 25° C durante 5 a 7 días. Pasado este tiempo se procede al recuento de las colonias aparecidas.

A este fin hemos aplicado en principio dos mé todos diferentes:

3.2.1.- A partir de una sola dilución.-

En este caso, el recuento se establece a partir de los recuentos de las colonias aparecidas en una / sola dilución (forma habitual en los recuentos microbia- nos), concretamente la dilución que proporcione un valor medio de colonias por placa entre 5 y 30.

En este método se ajusta la recta de regresión a los recuentos de colonias de todas las diluciones y a los correspondientes valores de éstas (utilizando a tal efecto transformaciones logarítmicas). Una vez ajustada la recta de regresión, se calcula a qué dilución se correspondería el crecimiento de una colonia única por / placa, y a partir de esta dilución se calcula el número de propágulos por gramo de especia.

El motivo de esta duplicidad de métodos estriba en el punto de controversia señalado por diversos autores al observar que, a diferencia de lo que ocurre con los recuentos bacterianos en placa, los recuentos fúngicos a partir de los valores de colonias de una sola dilución no varían con la misma razón que las diluciones correspondientes.

3.3.- Estudio de la micoflora: Aislamiento de colonias.-

Tras el recuento se procede al aislamiento de todos los tipos morfológicos diferentes de colonias fúngicas que aparezcan en la placa de recuento. Generalmente el aislamiento se lleva a cabo mediante la resiembra

morfológicos en tubos o placas de agar, aunque en algún caso hemos acudido a realizar cultivos de dilución previos al aislamiento final con el objeto de obtener colonias separadas que nos pudieran proporcionar subcultivos puros.

El medio de cultivo que hemos utilizado habitualmente para el aislamiento y la resiembra de las colonias hasta obtener cultivos puros ha sido el AGAR-EXTRACTO DE MALTA-GLUCOSA-PEPTONA, y en algunos casos el AGAR DE SABOURAUD-DEXTROSA 4 %. La composición de estos medios de cultivo es la siguiente:

AGAR-EXTRACTO DE MALTA-GLUCOSA-PEPTONA (Raper y Thom, 1.949).

Extracto de malta	20.0 gr.
Dextrosa	20.0 "
Peptona	1.0 "
Agar	20.0 "
Agua destilada	1000 ml.

No se ajusta el pH del medio, y se esteriliza en autoclave durante 15 min. a 121^o C.

AGAR DE SABOURAUD-DEXTROSA 4 %.

Peptona	10.0 gr.
Dextrosa	40.0 "
Agar	15.0 "
Agua destilada	1000 ml.

Se ajusta el pH del medio a 5.6 ± 0.1 y se es-

tener gran cuidado en evitar el sobrecalentamiento de este medio ya que se produce con cierta facilidad la caramelización de la glucosa.

Las placas o tubos de estos medios de aislamiento se resiembran en estría con todas las cepas morfológicamente diferentes y se incuban a 25° C durante 5 días.

Una vez conseguido el aislamiento de las cepas puras, hemos procedido a la identificación de cada cepa aislada con el fin de cumplir nuestro objetivo de establecer la micoflora contaminante de las especias estudiadas, y debido a que la sistemática utilizada en la clasificación de hongos microscópicos sigue caminos algo distintos para la identificación de mohos y de levaduras, pueden establecerse dos grandes grupos de sistemas de clasificación:

3.3.1.- Identificación de mohos.-

La sistemática de la clasificación de mohos atiende casi exclusivamente a su morfología, tanto macroscópica como microscópica.

La metodología que hemos seguido en general, a partir de los cultivos puros de las cepas aisladas /

tona, podemos esquematizarla como sigue:

* I) Resiembra en MEDIOS DE IDENTIFICACION, que varían según el moho a clasificar y según la monografía utilizada en su taxonomía. Los medios de identificación más habitualmente utilizados en nuestro estudio son:

MEDIO DE AGAR-SOLUCION DE CZAPEK (Raper y / Thom, 1.949):

NaNO ₃	3.0	gr.
K ₂ HPO ₄	1.0	"
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	"
KCl	0.5	"
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.01	"
Sacarosa	30.0	"
Agar	20.0	"
Agua destilada	1000	ml.

No se ajusta el pH del medio y se esteriliza en autoclave durante 15 min. a 121^o C.

Se trata de un medio sintético que permite la reproducción en subcultivos sucesivos de las características propias y diferenciales de gran número de mohos. / Es muy utilizado para la clasificación a nivel de género y, sobre todo, nosotros lo hemos empleado con asiduidad en la clasificación específica de mohos pertenecientes a los géneros Aspergillus y Penicillium.

MEDIO DE AGAR-SOLUCION DE CZAPEK-EXTRACTO DE LEVADURA: Su composición es idéntica a la del medio de /

levadura en la proporción de 5 gr./l. Se esteriliza en / autoclave durante 15 min. a 121^o C.

La utilización de este medio es paralela en / muchos casos a la del medio anterior, y la adición del / extracto de levadura proporciona una fuente de vitaminas, aminoácidos y oligoelementos que favorece el crecimiento y facilita la aparición de algunas características en / ciertas especies (por ejemplo, el grado de esporulación de las colonias) que presentan un desarrollo escaso o de ficiente sobre el agar-solución de Czapek.

AGAR-EXTRACTO DE MALTA-GLUCOSA-PEPTONA: Des-crita en el apartado 3.3. Se trata de un medio ampliamente utilizado por favorecer un desarrollo idóneo y una esporulación abundante en la mayoría de los mohos estudiados.

MEDIO DE AGAR-SOLUCION DE CZAPEK- 20 % SACARO SA: Su composición es idéntica a la del medio de agar-solución de Czapek, con la variación de la concentración / de sacarosa que en este medio es de 200 gr./l. Se esteriliza en autoclave durante 10 min. a 110^o C.

Es un medio utilizado para la inducción de la forma cleistotecial de ciertos mohos, sobre todo pertenecientes al género Aspergillus.

Extracto de patata	4.0	gr.
Dextrosa	25.0	"
Agar	15.0	"
Agua destilada	1000	ml.

Se ajusta el pH del medio a 5.6 ± 0.1 y se esteriliza en autoclave durante 15 min. a 121° C.

Es un medio de cultivo recomendado por la "American Public Health Association" (1.953, 1.966) en sus Métodos para el examen microbiológico de alimentos, que proporciona un crecimiento rápido y una esporulación intensa en especies que se desarrollan pobremente en otros medios.

AGAR-EXTRACTO DE MALTA 5 %-GLUCOSA-PEPTONA:

Extracto de malta	50.0	gr.
Glucosa	20.0	"
Peptona	1.0	"
Agar	25.0	"
Agua destilada	1000	ml.

Se ajusta el pH del medio a 4.6 ± 0.1 y se esteriliza en autoclave durante 15 min. a 121° C.

Medio descrito por Joly (1.964) en su monografía sobre el género Alternaria y que hemos empleado para la identificación de especies de este género.

KNO ₃	2.0	gr.
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	"
KH ₂ PO ₄	1.0	"
Glucosa	50.0	"
Agar	20.0	"
Agua destilada	1000	ml.

Se ajusta el pH del medio a 5.4 ± 0.1 y se esteriliza en autoclave durante 10 min. a 115° C.

Esta formulación se emplea, junto a otras, en la identificación de especies del género Cladosporium, / según la monografía de De Vries (1.967).

AGAR-EXTRACTO DE MALTA (Rifai, 1.969):

Extracto de malta ...	20.0	gr.
Agar	20.0	"
Agua destilada	1000	ml.

No se ajusta el pH del medio, y se esteriliza en autoclave durante 20 min. a 121° C.

Medio citado por Rifai en su monografía sobre el género Trichoderma y que hemos empleado para la clasificación de especies pertenecientes a dicho género.

* II) Observación macroscópica y microscópica / de la morfología de las colonias cultivadas en los medios de identificación. Los parámetros habitualmente observados son: grado de crecimiento y aspecto de las colonias (forma, textura superficial, color, ...), características de las hifas, formación y tipo de exudado, emi-

ción maduros (grado de desarrollo, características, tipos, tamaño y disposición), esporas (forma, color, tamaño, tabicación, marcas superficiales y formas de producción), etc.

La obtención de todos estos datos se basa en la observación macro y microscópica de los cultivos en vivo, y el examen microscópico de preparaciones en portaobjetos realizadas a partir de las colonias.

Para la observación en vivo partimos de los cultivos en placas de agar obtenidos por la siembra del moho a estudiar en tres puntos equidistantes en forma de triángulo equilátero, con el fin de asegurarnos de la pureza del cultivo. Estas placas así inoculadas se incuban a 25° C durante 3 a 7 días, incluso más, según el moho a estudiar.

Para el examen microscópico hemos utilizado sistemáticamente como líquido de montaje agua con tween 80 al 0.01 %, aunque en casos particulares acudimos al montaje en otros líquidos (lactofenol y etanol, fundamentalmente) y a su tinción (por ejemplo, con azul algodón) con el fin de observar ciertas estructuras.

También hemos utilizado la técnica del microcultivo sobre portaobjetos para lograr visualizar estructuras sumamente delicadas sin manipulación que las pudie

una fina capa del medio de agar idóneo sobre un portaobjetos estéril e inóculándolo, cuando el agar ha solidificado, en su punto central con una suspensión de esporas del hongo que se desea estudiar. El portaobjetos así inóculado se introduce en una placa de Petri estéril que contiene en su fondo una varilla de vidrio en forma de V y cuyo objeto es servir de soporte al portaobjetos. En el fondo de la placa, y con el fin de asegurar un grado de humedad óptimo para el cultivo, se coloca un papel de filtro estéril impregnado con una solución estéril de glicerol al 30 % o de SO_4Cu acuoso al 5 %. A continuación, se incuba la placa con el microcultivo en estufa de cultivos durante 3 días en condiciones de temperatura óptimas para cada moho y posteriormente se procede a la observación directa del microcultivo al microscopio, sin manipulación de la colonia crecida.

En todos los casos se dibujaron a escala las cepas estudiadas (con ayuda de una cámara clara Reichert acoplada al microscopio que hemos empleado: Mod. Biovar de Reichert) con el fin de precisar sus estructuras y obtener medidas exactas de aquellas con interés taxonómico, fundamentalmente las de reproducción asexual y sexual.

* III) Clasificación taxonómica del moho, a partir de los datos obtenidos, mediante el empleo de claves.

que hemos seguido en nuestro trabajo es el de von Arx / (1.981), con ayuda de diversos manuales generales: Ainsworth (1.983), Barnett (1.972), Barron (1.977), Domsch / et al. (1.980), Smith (1.963), ... Con el fin de proceder a la clasificación a nivel de especie hemos consultado / numerosas monografías, trabajos y publicaciones sobre / grupos, géneros y especies concretas: Ellis (1.971 y / 1.976), Gams (1.971), Hesseltine (1.955), Hesseltine y / Fennell (1.955), Joly (1.964), Pitt (1.979), Rifai / (1.969), Samson et al. (1.976), Samson (1.979), Simmons (1.967), de Vries (1.967), Stolk y Samson (1.983), etc.

Por la importancia que alcanzan en nuestro es tudio, hay que hacer mención especial de los sistemas se guidos para la clasificación específica de los géneros / Aspergillus y Penicillium.

En la clasificación de los hongos perteneciente tes al género Penicillium se ha seguido el criterio que basa esencialmente la sistemática del género en caracteri sticas morfológicas y de cultivo, recopiladas en el / "Manual and Atlas of the Penicillia" (Ramírez, 1.982):

Las colonias de la mayoría de las especies y cepas crecen bien sobre el agar-solución de Czapek (descri to en el apartado 3.3.1). Sin embargo, algunas especi es se caracterizan por presentar un pobre desarrollo /

a la incapacidad de estas cepas para utilizar el nitrato sódico como fuente de nitrógeno o sintetizar las vitaminas necesarias para su correcto desarrollo. Para soslayar en parte este problema se acude a su cultivo paralelo en agar-solución de Czapek-extracto de levadura (apartado 3.3.1). Además, empleamos simultáneamente un tercer medio de cultivo: agar-extracto de malta-glucosa-peptona (apartado 3.3), que generalmente proporciona un buen crecimiento fúngico, si bien las características diferenciales que las diversas especies del género presentan sobre este medio de cultivo son mucho menos notorias macroscópicamente que sobre los dos medios antes citados, en los que la composición tiene un marcado efecto sobre la textura y carácter superficial de las colonias en las distintas especies del género. Asimismo, el medio de cultivo afecta al color de las áreas conidiales, capacidad de esporulación del hongo, exudado, margen de la colonia, olor, etc., circunstancias todas ellas que unidas a la morfología de las estructuras conidiógenas (penicilos, estípites, ramas, mótulas y fiálides), conidios y estructuras relacionadas con la reproducción (esclerocios,...) se compendian para proceder a la determinación de la especie mediante el empleo de claves dicotómicas al efecto.

cas de agar, se utiliza la técnica de siembra en tres / puntos equidistantes, empleando suspensiones de esporas en solución acuosa de tween 80 al 0.01 %.

El tiempo de incubación elegido para estandarizar el examen morfológico de las colonias y los diversos parámetros a estudiar (tamaño, forma, color, exudado, olor, etc.) fué de 14 días a 25^o C.

Para estudios micromorfológicos se realizaron preparaciones en portaobjetos, usando como líquido de montaje la solución acuosa de tween 80 al 0.01 %, y suspendiendo en él fragmentos de las colonias crecidas a los 7 días de incubación a 25^o C, en lugar de a los 14 días con el fin de evitar el envejecimiento excesivo de las estructuras a observar. En casos especiales se procedió al microcultivo sobre portaobjetos, en la forma detallada anteriormente.

Para la clasificación de las especies pertenecientes al género Aspergillus hemos seguido los criterios enunciados por Raper y Fennell en su monografía / "The Genus Aspergillus" (1.977). La metodología es, en general, paralela a la ya descrita para la clasificación del género Penicillium.

das las cepas, hemos procedido a la preservación de los cultivos, para lo cual hemos utilizado dos métodos:

-- Resiembras sucesivas sobre agar-extracto / de malta en tubos inclinados. Sin embargo, como esta método puede favorecer la variación de las cepas (por mutación, por ejemplo) y con ello la alteración de las características típicas de los hongos aislados e identificados, paralelamente hemos utilizado un segundo método de conservación:

-- Dispersión de esporas en suelo (Bakerspiegel, 1.953, 1.954, citado por Ramírez, 1.982), método / que permite intervalos más largos, de incluso varios años en el caso de las especies bien esporuladas, entre / las sucesivas resiembras.

3.3.2.- Identificación de levaduras.-

La clasificación sistemática de levaduras se sustenta inicialmente en la observación de una serie de características morfológicas esenciales, pero la identificación específica de una cepa precisa del concurso de pruebas fisiológicas y bioquímicas, por lo que la metodología en este punto se aproxima en cierta medida a los / sistemas clásicos de identificación bacteriana.

drían resumirse en:

MORFOLOGIA.-

— Características de las células vegetativas, tanto en medio líquido como en medio sólido (forma, tamaño, ...).

— Características culturales: en medio líquido (formación de velo, anillo, isletas, sedimentc, etc.) y en medio sólido (textura, color, aspecto de la estría, etc.).

— Formación de pseudomicelio y/o micelio verdadero.

— Características de la multiplicación vegetativa (gemación uni, bi o multipolar, etc.).

— Características de la reproducción sexual.
Morfología de las ascosporas.

FISILOGIA.-

— Utilización de compuestos carbonados:

--- Utilización fermentativa de azúcares / (glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, rafinosa, melibiosa).

--- Utilización oxidativa de azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos.

— Utilización oxidativa de compuestos nitrogenados: nitratos, nitritos, aminoácidos.

60 %) o ClNa.

-- Crecimiento a elevadas temperaturas (25 a 28° C, 37° C, 45 a 48° C, ...).

-- Resistencia a antibióticos.

-- Reacciones de hidrólisis (urea, arbutina, grasas).

Los principales medios de cultivo utilizados y métodos empleados en nuestro estudio para la observación de dichas características, son los descritos seguidamente:

MEDIO Y.G.P. :

Extracto de levadura	5.0	gr.
Glucosa	20.0	"
Peptona	10.0	"
Agua destilada	1000	ml.

No se ajusta el pH del medio y se esteriliza en autoclave durante 10 min. a 115° C.

Se trata de un medio líquido formulado por / Van der Walt (1.970), citado en la monografía de Lodder (1.974), de gran utilidad para el estudio de las características de las células vegetativas y su reproducción / por multiplicación o gemación. Para ello, tubos con 5 ml. de medio Y.G.P. se inoculan con la levadura a estudiar y se incuban durante 48 h. a 25° C. Tras la incubación se

gota entre porta y cubreobjetos para su observación al /
microscopio, con el fin de distinguir forma y tamaño de
las células vegetativas, tipo de gemación, etc.

Este mismo medio de cultivo, adicionado de a-
gar en la proporción de 20 gr./l. (MEDIO Y.G.P.A.) lo he-
mos empleado para estudiar las características de culti-
vo en medio sólido. Para ello se siembra en estría una /
placa de Y.G.P.A. a partir de un cultivo de 48 h. a 25^o
C en Y.G.P. de la levadura en cuestión, y se incuba du--
rante 6 días a 25^o C, procediéndose luego a su observa--
ción.

MEDIO DE AGAR-HARINA DE MAIZ:

Infusión de harina de maiz .	50.0	gr.
Agar	15.0	"
Agua destilada	1000	ml.

Se ajusta el pH del medio a 5.0 ± 0.1 y se es-
teriliza en autoclave durante 15 min. a 121^o C.

Es un medio basado en una formulación de Bern-
hardt (1.946), citado por Lodder (1.974), que hemos em-
pleado para estudiar la capacidad de algunas especies de
levaduras para formar pseudomicelio o micelio verdadero.

Hemos utilizado la técnica del microcultivo /
sobre portaobjetos (apartado 3.3.1), sembrando la levadu-
ra en estría sobre el medio de cultivo y depositando so-

fin de estudiar la formación de pseudomicelio o micelio verdadero tanto en aerobiosis como en condiciones micro-aerófilas o anaeróbicas.

El microcultivo se incuba durante un tiempo / mínimo de 6 días a 25⁰ C, y luego se observa al microscopio.

MEDIO DE EXTRACTO DE MALTA:

Extracto de malta 20.0 gr.

Agua destilada 1000 ml.

Se ajusta el pH del medio a 5.4 ± 0.1 y se esteriliza en autoclave durante 15 min. a 121⁰ C.

Es el medio habitualmente empleado para la observación de diversas características culturales: formación de velo, anillo, isletas, sedimento, ..., para lo / cual se siembra un Erlenmeyer de 100 ml. con 30 ml. de / medio estéril, a partir de una suspensión de levadura rejuvenecida por cultivo sobre Y.G.P.A. durante 48 h. a / 25⁰ C. El cultivo en extracto de malta se incuba 48 h. a 25⁰ C y se observa la posible aparición de una capa de / crecimiento superficial, aerobio, en forma de velo contínuo, anillo adosado a las paredes, isletas o, en su ausencia, la aparición de sedimento. En caso negativo, se prolonga el cultivo a 25⁰ C durante 30 días, con el fin de observar las posibles formaciones tardías. En caso de

ceptúa a la cepa como incapaz de presentar tales caracte-
rísticas de cultivo.

MEDIOS DE ESPORULACION.-

Utilizados para el estudio de las caracterís-
ticas de la reproducción sexual: formación de ascosporas
y características de éstas (forma, tamaño, etc.).

Existen diversas formulaciones, y en nuestro
trabajo hemos utilizado fundamentalmente tres:

— MEDIO DE GORODKOWA:

Glucosa	1.0	gr.
Peptona	10.0	"
Cloruro sódico	5.0	"
Agar	20.0	"
Agua destilada	1000	ml.

No se ajusta el pH del medio y se esteriliza
en autoclave durante 15 min. a 121^o C.

— MEDIO DE ADAMS:

Glucosa	0.4	gr.
Acetato sódico anhidro .	1.4	"
Agar	20.0	"
Agua destilada	1000	ml.

No se ajusta el pH del medio, y se esteriliza
en autoclave durante 15 min. a 121^o C.

-- MEDIO DE STARKEY:

K ₂ HPO ₄	0.8	gr.
KH ₂ PO ₄	0.2	"

Fe ₂ (SO ₄) ₃ ·7H ₂ O	0.025	"
Lactosa	15.0	"
Agar	20.0	"
Agua destilada	1000	ml.

No se ajusta el pH del medio, y se esteriliza en autoclave durante 15 min. a 121^o C.

Los tres medios de esporulación descritos se distribuyen en tubos de agar inclinado, y su utilización es simultánea: Se siembra la levadura, para su rejuvenecimiento, en tres tubos de Y.G.P., incubando 48 h. a 25^o C; a continuación, cada tubo de cultivo en Y.G.P. (que / contiene 5 ml.) se vierte respectivamente en un tubo de cada uno de los tres medios de esporulación. Se inclinan los tres tubos y tras dejar sedimentar la levadura durante 2 h. sobre la superficie inclinada de los medios de / esporulación, se vierten los sobrantes con precaución para no arrastrar el sedimento. Se incuban a 25^o C los medios de Gorodkova, Adams y Starkey inoculados, y a partir de los 7 días de incubación se observa periódicamente la posible aparición de ascosporas. En el caso positivo, se registra forma, tamaño, etc., de las esporas producidas, datos de gran valor taxonómico. En caso negativo, si transcurrido un período mínimo de 30 días de incubación no se observa aparición de ascosporas, se conclu-

se sexualmente en cultivos de laboratorio.

MEDIO PARA FERMENTACION DE AZUCARES:

Extracto de levadura ...	5.0	gr.
Azúcar a ensayar	20.0	"
Agua destilada	1000	ml.

El medio se distribuye en tubos con tapón de rosca y provistos con campana Durham, a razón de 10 ml. por tubo, y se esteriliza en autoclave durante 15 min. a 115° C.

En cada tubo se siembra una gran cantidad de levadura y se incuba a 25° C. Cada día, durante un período máximo de 10 días, se observa la aparición de gas en la campana, indicador de la fermentación del azúcar ensayado. El tanto por ciento del volumen de la campana ocupado por el gas, en el período de incubación transcurrido, proporciona un índice de la velocidad de fermentación del azúcar. Si no se observa la aparición del gas / en la campana a los 10 días de incubación, la prueba de la fermentación del azúcar en cuestión se considera negativa.

Ensayos utilizados para averiguar la capacidad de utilización oxidativa de diversas fuentes de carbono por parte de una cepa de levadura determinada.

Se emplea un medio de cultivo exento de fuentes de carbono, de formulación debida a Wickerham (1951), citado por Lodder en su monografía "The Yeasts, a taxonomic study" (1.974) y comercializado por "Difco" con el nombre de "Yeast Nitrogen Base".

La preparación del medio de cultivo debe ajustarse a las normas recomendadas por la firma que lo comercializa: se disuelven 6.7 gr. de "Yeast Nitrogen Base" y 14 gr. de agar en 1000 ml. de agua destilada, se ajusta el pH a 5.6 ± 0.1 y se distribuye en tubos de ensayo / con 20 ml. de medio. Se esteriliza en autoclave durante 15 min. a 115° C.

Se mantienen los tubos a 45° C y se inoculan en masa con 1 ml. de una suspensión fuerte de la levadura a ensayar, agitando para conseguir una mezcla homogénea. La suspensión de la levadura se obtiene dispersando en agua destilada estéril una considerable cantidad de inóculo de levadura, previamente rejuvenecida por cultivo en Y.G.P.A. durante 48 h. a 25° C.

Los tubos del medio base inoculados con la / suspensión de levadura se vierten asépticamente en pla--

solidificar el medio de agar. A continuación se secan / las placas en estufa (1 h. a 37^o C) para evitar el agua de condensación que pudiera provocar errores en el ensayo, y posteriormente se deposita una pequeña cantidad de la fuente de carbono a ensayar (azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, etc.) en un punto de la superficie del agar próximo al borde de la placa. Diametralmente opuesto a él se deposita como patrón de crecimiento positivo una pequeña cantidad de glucosa, y se incuban las placas con las fuentes de carbono a ensayar durante 48 h. a 25^o C.

Se otorga un resultado positivo al ensayo si se observa un halo semicircular de crecimiento alrededor de la fuente de carbono depositada, utilizando como referencia el halo de crecimiento que se observa alrededor / de la glucosa. En caso negativo, se prolonga la incuba--ción hasta los 7 días, con el fin de detectar posibles utilizaciones lentas o tardías, y si persiste el resulta--do negativo se da como tal el ensayo.

ASIMILACION DE COMPUESTOS DEL NITROGENO.-

Ensayos utilizados para averiguar la capaci--dad de utilización oxidativa de diversas fuentes de ni--trógeno por parte de una cepa de levadura determinada.

La metodología empleada es paralela a la des-

carbono, si bien el medio de cultivo utilizado difiere, básicamente, en que es una formulación exenta de fuentes de nitrógeno. Este medio, debido también a Wickerham, se describe en la monografía antes mencionada de Lodder / (1.974). Comercializado por "Difco" con el nombre de / "Yeast Carbon Base", se prepara por disolución del medio basal (11.7 gr.) y 14 gr. de agar en 1000 ml. de agua / destilada. El pH del medio se ajusta a 5.6 ± 0.1 , se distribuye en tubos de ensayo con 20 ml. de medio y se este riliza en autoclave durante 15 min. a 115° C.

El resto del procedimiento es análogo al descrito para la asimilación de compuestos del carbono, con una salvedad importante: la suspensión de la levadura a ensayar con la que se inoculan los tubos con 20 ml. de / medio ha de ser necesariamente una suspensión sumamente diluida (suspensión invisible), ya que en otro caso se / producirían falsos resultados positivos debido a que las células de levadura son en sí mismas excelentes fuentes de nitrógeno, y los posibles autolisados de células de / la suspensión podrían servir como fuente de nitrógeno al resto del inóculo.

Las fuentes de nitrógeno a ensayar habitualmente son las sales potásicas de nitratos y nitritos, utilizando una peptona como patrón de crecimiento positi-

Con los datos aportados por las observaciones morfológicas y fisiológicas descritas, más otros datos / necesarios en casos particulares y referentes a características tales como la osmotolerancia en medios de glucosa y/o cloruro sódico de alta presión osmótica, crecimiento a diversas temperaturas, resistencia a antibióticos, reacciones de hidrólisis, etc., se procede finalmente al encuadre taxonómico de las levaduras aisladas.

Las obras de taxonomía que hemos seguido en / nuestro trabajo para la sistemática de levaduras son, esencialmente, la monografía editada por Lodder (1.974), junto a la de Barnett et al. (1.983) y "The Yeasts, a Taxonomic Study" editado por Kreger-van-Rij (1.984).

3.4.- Soluciones y colorantes.-

Con la mayoría de los mohos es difícil, cuando no imposible, fijar, teñir y montar preparaciones como se hace usualmente en Bacteriología, por ejemplo, y / preservar al mismo tiempo las estructuras. Sin embargo, la observación directa, sin manipulación, de todas las estructuras que contribuyen a la localización taxonómica / de un hongo microscópico es ciertamente imposible en la mayoría de los casos, y hemos optado por la realización

ción posible.

Entre los líquidos de montaje para mohos existentes, tal vez el de uso más extendido es el lactofenol cuya fórmula es:

Fenol	10	gr.
Ac. láctico	10	"
Glicerina	20	"
Agua destilada	10	"

Sin embargo, este líquido de montaje puede / presentar ciertos problemas en su utilización sistemática, como pueden ser la retracción o turgencia de las células y, además, su índice de refracción ($n=1.45$), semejante al de las hifas de los hongos, hace que en muchos casos las estructuras incoloras aparezcan muy tenues debido a la falta de contrastes con el fondo (Smith, 1.963).

Por estas razones hemos optado por el uso como líquido de montaje de agua con tween 80 al 0.01 % como agente dispersante. Se trata de un líquido de montaje de rápida evaporación y que puede provocar turgencia en las estructuras fúngicas, pero estos problemas se pueden mitigar con observaciones eminentemente rápidas. Además, en muchas claves sistemáticas es éste el medio de referencia en el que se han realizado las medidas de las estructuras de interés taxonómico, con el fin de unificar / las observaciones y evitar los errores cometidos por el

En cuanto a técnicas de tinción, en general / los mohos suelen tomar los colorantes de modo desigual, según la estructura, edad, etc., y el método más empleado es mezclar el colorante con el líquido de montaje, / principalmente en el caso del lactofenol. En nuestro trabajo hemos desechado su empleo sistemático, y sólo hemos acudido a su uso para lograr destacar alguna estructura en particular de ciertos mohos, con el fin de visualizar las correctamente. A este fin nos han resultado particularmente útiles ciertos colorantes no descritos en la literatura como utilizados en la tinción de microhongos: / Rojo Ponceau S y Negro Amido. Ambos son colorantes habituales en ciertas técnicas inmunológicas para resaltar / la seroprecipitación (inmunodifusión radial y electroforesis en contracorriente, sobre todo), y los hemos empleado para lograr la tinción diferencial de las estructuras de reproducción asexual de ciertos ficomicetos, principalmente de los mucorales: estos colorantes tiñen las hifas, artrosporas, clamidosporas e incluso los esporangióforos de las colonias jóvenes, hasta la columela, pero se revelan incapaces de penetrar la cubierta del esporangio intacto y de teñir las esporas de su interior, / con lo cual permiten una coloración diferencial de gran utilidad para la observación de estas especies.

de ambos colorantes, utilizando Rojo Ponceau S para lograr una tinción de fondo roja, o Negro Amido si se desea coloración azul, proporcionando este último colorante un mayor contraste:

Ac. acético	2	ml.
Glicerina	15	"
Rojo Ponceau S/Negro Amido .	0.1	gr.
Agua destilada hasta	100	ml.

3.5.- Investigación de aflatoxinas: Selección de técnicas.-

En nuestro estudio hay que diferenciar dos / grupos en los métodos analíticos seguidos para la investigación de aflatoxinas:

3.5.1.- Estudio de la presencia de aflatoxinas en las especias analizadas, esencialmente en el pimentón.

3.5.2.- Valoración de cepas aflatoxigénicas: Investigación de aflatoxinas en cultivos de laboratorio.

3.5.1.- En especias.-

Para el análisis de aflatoxinas en especias, y debido a lo variado de los productos agrícolas inclui-

ticos, en ocasiones independientemente y en ocasiones si multaneándolos en el análisis de un mismo producto (principalmente en el caso de las pimientos y pimentón, debido a las dificultades que presenta su análisis por la / gran cantidad de pigmentos ocluyentes, materia inerte y sustancias interferentes que existen en estas especias).

Estos tres métodos analíticos son:

I.- Método de Scott y Kennedy para pimientos de Capsicum molidas (1.973).

En síntesis, se trata de un método compuesto por una sistemática de extracción, limpieza y concentración del extracto según el método BF de la A.O.A.C. / (1.970, 1.980), y una resolución final de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ por cromatografía en capa fina bidimensional sobre gel de sílice.

II.- Método de Scott y Kennedy para pimienta blanca y pimienta negra molidas (1.973).

Este método consta de una extracción, purificación y concentración del extracto según el método CB / de la A.O.A.C. (1.970, 1.980), con resolución final de a flatoxinas por CCF bidimensional.

III.- Método de multidetección de micotoxinas según Gimeno (1.979, 1.980).

Derivado del método desarrollado por Stoloff

utilizado como método oficial español para la detección de aflatoxina B₁ en diversos productos agrícolas.

METODO I.-

* Principio:

- Muestra molida y homogeneizada.
- Extracción de las aflatoxinas con metanol/agua.
- Deslipidación con n-hexano.
- Transferencia de las aflatoxinas del extracto a una fase clorofórmica.
- Concentración del extracto clorofórmico en rotavapor.
- Resolución de aflatoxinas por cromatografía en capa fina bidimensional.
- Confirmación del análisis.
- Cuantificación.

* Material y aparatos.-

- Matraz Erlenmeyer de 500 ml., color topacio, tapón de vidrio esmerilado.
- Embudo de separación de 125 ml., color topacio.
- Matraz colector de filtrados, con forma de corazón, de 180 ml., y fondo en tubo gradu

rotavapor, con tapón de vidrio. Color topacio.

-- Agitador de vaivén o muñeca.

-- Rotavapor.

-- Bomba de vacío.

* Equipo para cromatografía en capa fina.-

-- Microjeringas de 10, 25 y 100 μ l.

-- Miniviales de 1 y 2 ml.

-- Tubos de 5 y 10 ml., con tapón de rosca, /
color topacio.

-- Pulverizador cromatográfico.

-- Bastidor/Divisor para cromatoplasmas.

-- Secador de cabello.

-- Cámaras de desarrollo.

-- Cromatoplasmas Sil G-60, tamaño de partícula 0.063-0.200 nm., de 0.25 mm. de espesor y 20 x 20 cm. de tamaño (Merck). Activar a 110^o C durante 30 min. En el momento de su uso deben estar a temperatura ambiente.

-- Lámpara ultravioleta de 254 y 366 nm.

* Reactivos.- Todos serán de grado analítico.

-- Metanol.

-- n-Hexano.

-- Cloroformo.

- Tolueno.
- Acetato de etilo.
- Acido fórmico 90 %.
- Acido sulfúrico.
- Acido trifluoroacético.

* Patrones de aflatoxinas:

Suministrados por "Sigma Chemical Co".

Inicialmente, preparamos una solución de cada una de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ con una concentración de 10 µg./ml. El solvente utilizado en todos los casos ha sido benceno/acetonitrilo (98:2).

A continuación, se prepara un patrón de trabajo, conjunto, combinando volúmenes de las soluciones iniciales, que contenga 0.5 µg./ml. de aflatoxinas B₁ y G₁, y 0.25 µg./ml. de aflatoxinas B₂ y G₂.

Guardar en tubos con tapón de rosca, color topacio, a 4° C.

* Extracción, purificación y concentración del extracto:

Se pesan 25 gr. de la muestra molida y homogeneizada en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. con tapón de vidrio esmerilado, color topacio. Añadir 125 ml. de metanol/agua (55:45) y 50 ml. de n-hexano. Agitar vigorosamente durante 30 min. en agitador de vaivén o muñeca.

41 o similar) y transferir 50 ml. de la fase acuoso-meta
nólica a un embudo de separación de 125 ml., color topa-
cio. Añadir 50 ml. de cloroformo, agitar durante 30-60 /
seg. y dejar separar capas. Drenar y recoger la capa in-
ferior de cloroformo en el matraz colector de filtrados
con forma de corazón y fondo en tubo graduado.

Evaporar el extracto clorofórmico hasta alcan-
zar un volumen de 2 ml., en rotavapor, sobre baño maría
a 50-55^o C, con vacío de 0.6-0.8 Kp./cm² y en atmósfera
de nitrógeno. Romper vacío y lavar las paredes del reci-
piente con tres porciones de 1 ml. de cloroformo. Agitar.
Evaporar a sequedad y redissolver el residuo en 500 μ l. /
de cloroformo/metanol (9:1), agitando vigorosamente.

* Cromatografía en capa fina bidimensional:

Proceder según se indica en la FIGURA 1:

Depositar con microjeringa 10 μ l. del extrac-
to de la muestra problema en un punto situado a 4 cm. /
del borde izquierdo de la cromatoplaca y sobre una línea
horizontal imaginaria situada a 4 cm. del borde inferior.
Depositar, respectivamente, 2 y 5 μ l. del patrón conjun-
to de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ en dos puntos situados
a 3 y 5 cm. del borde derecho de la cromatoplaca y sobre
la línea imaginaria situada a 4 cm. de su borde inferior.

Depositar, asimismo, 2 y 5 μ l. del patrón con

mente a 3 y 5 cm. del borde superior de la cromatoplaca, y sobre una línea vertical imaginaria situada a 4 cm. / del borde izquierdo de la placa.

Insertar el borde inferior de la cromatoplaca en el fondo-de la cámara de desarrollo cromatográfico y desarrollar en este primer sentido con acetona/ cloroformo (1:9), hasta que el frente de solvente alcance 13-14 cm. medidos desde el borde inferior de la cromatoplaca. Extraer la placa y permitir su secado a temperatura ambiente, en oscuridad. Girar ahora la cromatoplaca 90° en sentido contrario a las agujas del reloj e introducir en una segunda cámara de desarrollo vertical para proceder a un nuevo desarrollo con otro solvente: tolueno/acetato de etilo/ác. fórmico 90 % (5:4:1). Cuando el frente de / solvente alcance una altura de 13-14 cm., se extrae la / placa y se seca a temperatura ambiente o con una suave / corriente de aire caliente.

El desarrollo de ambos cromatogramas se realiza en la oscuridad.

Visualizar el cromatograma a la luz U.V. de / 254 y 366 nm. Las aflatoxinas aparecerán como manchas / con fluorescencias características y situadas en la bisectriz imaginaria de ambas direcciones de desarrollo / (ver FIGURA 1), comparándose los R_f de las manchas sospeg

tados en la cromatoplaca.

* Confirmación:

La primera confirmación de la identidad de / las manchas sospechosas, se lleva a cabo por pulveriza-- ción de la cromatoplaca con agua/ác. sulfúrico (3:1), lo que produce el cambio de fluorescencia azul o verdosa (B o G) a tonos amarillos, tanto a la luz U.V. de 254 como de 366 nm.

En caso positivo, se reconfirma la sospecha / de aflatoxina utilizando una nueva cromatoplaca en la / que se repite el proceso anteriormente reseñado, si bien en los puntos donde se han depositado muestra y patrones se superponen 2 a 5 μ l. de ác. trifluoroacético, según / el método confirmativo desarrollado por Przybylski / (1.975). La reacción del ác. trifluoroacético con las a- flatoxinas B₁ y G₁ da lugar, respectivamente, a sus deri- vados B_{2a} y G_{2a}, con un R_f aproximadamente 1/4 del R_f de B₁ y G₁, y fluorescencias análogas aunque más intensas.

Si la pulverización posterior con agua/ác. / sulfúrico (3:1) provoca, como anteriormente, el cambio / de fluorescencia a tonos amarillos, se concluye que las manchas sospechosas son aflatoxinas.

* Cuantificación:

Para la cuantificación se aplica la siguiente

$\mu\text{g. de aflatoxina } B_1/\text{Kg.} = V_p \times C_p \times D_m / V_m \times P_m$, donde:

-- $V_p = \mu\text{l. de solución patrón de aflatoxina } B_1$ que producen una fluorescencia igual a la emitida por la muestra.

-- $C_p =$ concentración de la aflatoxina B_1 en el patrón, expresada en $\mu\text{g./ml.}$

-- $D_m = \mu\text{l. de la dilución final del extracto de la muestra.}$

-- $V_m = \mu\text{l. del extracto de la muestra que producen una fluorescencia de intensidad igual a la del patrón de aflatoxina utilizado } (V_p).$

-- $P_m = \text{gr. de la muestra en el extracto que se cromatografía.}$

Para la cuantificación de las aflatoxinas B_2 , G_1 y G_2 , se procede de forma análoga.

* Principio:

- Muestra molida y homogeneizada.
- Extracción de las aflatoxinas con cloroformo.
- Columna de limpieza del extracto sobre silicagel:
 - Deslipidación con n-hexano.
 - Eliminación de pigmentos interferentes con éter etílico anhidro.
 - Recuperación de aflatoxinas con cloroformo/metanol.
- Concentración en rotavapor.
- Resolución de aflatoxinas por cromatografía en capa fina bidimensional.
- Confirmación del análisis.
- Cuantificación.

* Material y aparatos:

- Matraz Erlenmeyer de 500 ml., color topacio, tapón de vidrio esmerilado.
- Columna de vidrio, de 300 mm. de longitud por 22 mm. de diámetro, color topacio.
- Matraz colector de filtrados, forma de corazón, de 180 ml., con fondo en tubo graduado de 3 c.c. y boca esmerilada adaptable

pacio.

— Agitador de vaivén o muñeca.

— Rotavapor.

— Bomba de vacío.

* Material para cromatografía en columna:

— Lana de vidrio.

— Sulfato de sodio anhidro.

— Silicagel 60, de 0.063-0.2 nm. Activar a /
105^o C durante 1 h. Añadir 1 ml. de agua /
por cada 100 gr. Sellar y agitar para su /
mezcla homogénea. Dejar reposar 15 h. como
mínimo.

* Equipo para cromatografía en capa fina:

Ver METODO I.

* Reactivos: Todos serán de grado analítico.

— Cloroformo.

— n-Hexano.

— Eter etílico anhidro.

— Metanol.

— Acetona.

— Tolueno.

— Acetato de etilo.

— Ac. fórmico 90 %.

— Ac. sulfúrico.

* Patrones de aflatoxinas:

Ver METODO I.

* Extracción, purificación y concentración del extracto:

Se pesan 25 gr. de la muestra molida y homogeneizada en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. con tapón de vidrio esmerilado, color topacio. Añadir 12.5 ml. de agua destilada, 125 ml. de cloroformo y 12.5 gr. de tierra de diatomeas. Agitar vigorosamente durante 30 min. / en agitador de vaivén o muñeca.

Filtrar el extracto (papel de filtro Whatman 41 o similar) y recoger los primeros 50 ml. del filtrado clorofórmico.

Cromatografía en columna:

Colocar un tapón de lana de vidrio en el fondo de una columna cromatográfica de 300 x 22 mm. Añadir 5 gr. de sulfato de sodio anhidro para dar base al silicagel. A continuación, añadir cloroformo hasta que la columna esté medio llena y adicionar entonces 10 gr. de silicagel. Lavar las paredes de la columna con 20 ml. de / cloroformo y agitar para dispersar el silicagel. Cuando la tasa de sedimentación disminuya, drenar un poco de / cloroformo para ayudar a la sedimentación, dejando de 5 a 7 cm. por encima del silicagel. Añadir lentamente /

las paredes, si es necesario, con una pequeña porción de cloroformo. Drenar cloroformo hasta la parte superior de la última capa de sulfato de sodio anhidro añadida, evitando que parte alguna quede en seco.

Incorporar a la columna los 50 ml. del extracto clorofórmico de la muestra que habíamos obtenido por filtrado. Lavar a máxima tasa de flujo con 150 ml. de / n-hexano, seguidos por 150 ml. de éter etílico anhidro. Descartar los eluidos. Eluir ahora las aflatoxinas de la columna con 150 ml. de metanol/cloroformo (3:97) y recoger esta última fracción, desde el momento de su adición a la columna hasta la detención del flujo, en el matraz colector en forma de corazón.

Evaporar hasta alcanzar un volumen de 2 ml., en rotavapor sobre baño maría a 50^o C, con un vacío de / 0.6-0.8 Kp/cm² y en atmósfera de nitrógeno. Romper vacío y lavar las paredes del recipiente con tres porciones de 1 ml. de cloroformo. Agitar. Evaporar a sequedad y redissolver el residuo con 500 µl. de cloroformo, agitando vigorosamente.

* Cromatografía en capa fina bidimensional:

Ver METODO I.

* Confirmación:

Ver METODO I.

---0---

METODO III.-

* Principio:

El método se basa en la extracción selectiva de las aflatoxinas con acetonitrilo/cloruro potásico al 4 %, la eliminación de compuestos grasos con isooctano y la separación de los compuestos interferentes solubles / en agua por transferencia de las aflatoxinas a una fase clorofórmica, con ayuda de cambios de pH. El extracto obtenido se concentra en rotavapor y las aflatoxinas se resuelven por cromatografía en capa fina unidimensional, / siendo posteriormente confirmadas y cuantificadas.

* Material y aparatos:

- Matraz Erlenmeyer de 250 ml., color topacio, tapón de vidrio esmeriladao.
- Embudo de separación de 125 ml., color topacio.
- Matraz colector de filtrados, forma de corazón, de 180 ml., con fondo en tubo graduado de 3 c.c. y boca esmerilada adaptable a rotavapor, con tapón de vidrio. Co--

-- Pipeta Pasteur conectada a trompa de agua para vacío.

-- Agitador de vaivén o muñeca.

-- Rotavapor.

-- Bomba de vacío.

* Equipo para cromatografía en capa fina:

Ver METODO I.

* Reactivos:

-- Acetonitrilo.

-- Cloruro potásico.

-- Isooctano.

-- Cloroformo.

-- Ac. clorhídrico.

-- Sulfato de sodio anhidro.

-- Tolueno.

-- Acetato de etilo.

-- Ac. fórmico 90 %.

-- Eter etílico.

-- Ac. acético.

-- Acetona.

-- Ac. sulfúrico.

-- Ac. trifluoroacético.

* Patrones de aflatoxinas:

Ver METODO I.

extracto:

Se pesan 25 gr. de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. con tapón de vidrio esmerilado, color topacio. Añadir 90 ml. de acetonitrilo y 10 ml. de / solución acuosa de cloruro potásico al 4 %. Agitar vigorosamente durante 30 min. en agitador de vaivén o muñeca.

Filtrar el extracto (papel de filtro Whatman 41 o similar) y transferir 50 ml. a un embudo de separación de 125 ml., color topacio. Añadir 50 ml. de isooctano y agitar durante 30 seg. Dejar separar capas. Eliminar la capa superior de isooctano por medio de la pipeta Pasteur conectada a la trompa de agua para vacío, con la precaución de no aspirar en absoluto la capa inferior de acetonitrilo. Repetir la deslipidación con otras tres / porciones de 50 ml. de isooctano, eliminando cada vez la capa superior en la misma forma. A continuación, añadir a la capa de acetonitrilo 12.5 ml. de agua destilada / (con el fin de eliminar pigmentos solubles en agua interferentes en el análisis) y 25 ml. de cloroformo, agitando durante 30 seg. tras cada adición. Dejar separar capas y filtrar la capa inferior de acetonitrilo-cloroformo a través de un filtro Whatman 41 lleno de sulfato de sodio anhidro. Colectar esta fracción en el matraz colector de filtrados con forma de corazón.

rador se le añade 1 ml. de ác. clorhídrico 1N. Agitar. / Seguidamente se añaden 20 ml. de cloroformo, con el fin de recuperar posibles fracciones de aflatoxinas disueltas en la capa acuosa, desplazando el coeficiente de reparto con un pH favorable. Agitar durante 30 seg. Dejar separar capas. Filtrar la capa inferior clorofórmica a / través del filtro con sulfato de sodio anhidro y coleccionar la fracción en el matraz colector de filtrados con / forma de corazón, junto a la fracción que habíamos obtenido anteriormente.

Repetir la extracción en la capa acuosa acidificada con tres porciones de 10 ml. de cloroformo, con / el fin de evitar posibles pérdidas en el método. Filtrar cada fracción clorofórmica en forma análoga a las anteriores, y reunir todas las fracciones en el matraz colector de filtrados.

Evaporar el extracto conjunto obtenido hasta alcanzar un volumen de 2 ml., en rotavapor, sobre baño / maría a 50-55° C, con vacío de 0.6-0.8 Kp/cm² y en atmósfera de nitrógeno. Romper vacío y lavar las paredes del recipiente con tres porciones de 1 ml. de cloroformo. Agitar. Evaporar a sequedad y redissolver el residuo con / 1 ml. de cloroformo, agitando vigorosamente.

Dividir las cromatoplasmas de 20 x 20 cm. que van a utilizarse en el análisis, con un divisor de placas, en diez franjas de aproximadamente 2 cm. de ancho / cada una. Activar a continuación las cromatoplasmas (ver METODO I).

En la parte central de las franjas y en una / línea horizontal imaginaria situada a 4 cm. del borde inferior de la placa, depositar respectivamente 2, 2, 5 y 5 μ l. del extracto de la muestra obtenido. En uno de los puntos donde hemos depositado 2 y 5 μ l. del problema, su perponer 5 μ l. del patrón conjunto de las aflatoxinas / B_1 , B_2 , G_1 y G_2 , que actuarán como patrones internos. En una quinta franja, adyacente, depositaremos 5 μ l. del patrón conjunto de aflatoxinas, que actuarán así como patrón externo.

Desarrollar el cromatograma en cámara de desarrollo insaturada y en la oscuridad, utilizando como fase móvil tolueno/acetato de etilo/cloroformo/ác. fórmico 90 % (70:50:50:20). Cuando el frente del solvente de desarrollo alcance una altura de 16 cm. medidos desde el / borde inferior de la cromatoplasma, se extrae la placa y se permite su completo secado o se fuerza con una suave corriente de aire caliente.

Visualizar el cromatograma a la luz U.V. de /

con fluorescencias características y un R_f análogo al R_f del patrón conjunto utilizado como patrón interno, y análogo o muy próximo al R_f del patrón externo.

* Confirmación:

La confirmación de la identidad de las manchas sospechosas se realiza en forma análoga a la expuesta en el METODO I (basada en el método de Przybylski, / 1.975), por formación de los derivados B_{2a} y G_{2a} al reaccionar las aflatoxinas B_1 y G_1 con el ác. trifluoroacético, si bien el desarrollo de esta segunda cromatoplaqueta lo llevamos a cabo con otro solvente: cloroformo/éter etílico/ác. acético (170:30:10), con el fin de añadir una prueba adicional al comparar los nuevos R_f .

La pulverización con agua/ác. sulfúrico (3:1) para provocar el cambio de fluorescencia a tonos amarillos se utiliza como confirmativo tanto en la placa inicial como en la segunda placa adicionada con ác. trifluoroacético, y en forma análoga a la descrita en el METODO I.

* Cuantificación:

Hemos utilizado el método del límite de detección, basado en determinar, a partir del extracto de la muestra obtenido, para qué dilución puede detectarse todavía la sustancia cromatográficamente. Del límite infe-

larse la cantidad de micotoxina en cuestión, según el / producto a analizar, relacionando el volumen de la mancha para el que todavía puede comprobarse la micotoxina con el límite de detección de la micotoxina en cuestión, ambos factores en las mismas condiciones de trabajo.

Se depositan en una cromatoplaca varios volúmenes del extracto de la muestra (1 a 6 μ l.). En un punto aparte se depositan 3 μ l. del patrón de la micotoxina que se va a cuantificar (patrón externo). Tras el desarrollo de la placa, se observa cual es la última mancha de micotoxina que aún se detecta. Para el cálculo se aplica la fórmula:

$$\mu\text{g. de micotoxina/Kg. de producto} = LxVx10^8 / ax50xP,$$

donde:

L = límite de detección, en μ g., de la correspondiente micotoxina, según el producto a analizar.

V = volumen en ml. del extracto de la muestra (1 ml.).

a = volumen, en μ l., correspondiente a la última mancha que se ve.

P = peso de la muestra en gramos.

Si la micotoxina se detecta en todas las manchas, tomar 50 μ l. del extracto de la muestra y añadir / 250 μ l. de cloroformo. Repetir ahora el proceso anterior

misma fórmula y multiplicar por 6 el resultado.

Si la micotoxina se detecta también en todas las manchas, tomar 50 μ l. de la última dilución del extracto de la muestra y añadir 250 μ l. de cloroformo. Repetir de nuevo el cromatograma en condiciones análogas a las descritas. Para el cálculo, aplicar la fórmula anterior y multiplicar por 36 el resultado. En el caso de detectarse la micotoxina en todas las manchas, seguir sucesivamente con la misma secuencia de dilución y de factor de cálculo que se deduce de los pasos anteriores.

3.5.2.- En cultivos de laboratorio: Estudio de cepas aflatoxigénicas.-

Ante los primeros resultados que obtuvimos en el estudio de la micoflora de las especias, nos pareció especialmente interesante la existencia de Aspergillus / flavus en un considerable tanto por ciento de las muestras analizadas, y por ello procedimos al estudio del poder aflatoxigénico de las cepas aisladas en cultivos de laboratorio.

El medio de cultivo que hemos utilizado para distinguir cepas de A. flavus y A. parasiticus potencialmente productoras de aflatoxinas de las cepas no toxigé-

recomendado por Hara et al. (1.974), de composición:

$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	10.0	gr.
K_2HPO_4	1.0	"
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	"
KCl	0.5	"
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01	"
Sacarosa	30.0	"
Licor de macerado de maiz ...	0.5	"
Agar	20.0	"
Agua destilada	1000	ml.
HgCl_2	5×10^{-4}	m

El pH del medio se ajusta a 5.5 con NaOH 1N /
antes de la adición del agar. Se esteriliza en autoclave
a 121°C durante 15 min.

Cuando el medio de cultivo se halla aproxima-
damente a 40°C , se vierte en placas de Petri de vidrio,
de 10 cm. de diámetro (alrededor de 25-30 ml. de medio /
por placa) y se deja solidificar a temperatura ambiente.

Debido a que nos encontramos con dificultades
para obtener el licor de macerado de maiz ("corn steep /
liquor"), procedimos a realizar estudios comparativos pa-
ra su sustitución como fuente de vitaminas y oligoelemen-
tos. Finalmente, hemos utilizado en su lugar extracto de
levadura, en una proporción de 0.5 gr./litro de medio, /
con unos resultados comparativamente análogos en cuanto
a crecimiento de las colonias y producción de aflatoxi--

La placa de agar preparada con el medio A.P.A. modificado se inocula superficialmente, en su punto central, con asa de siembras, a partir de una suspensión de esporas de la cepa a estudiar en agua con tween 80 al / 0.01 %. Se incuba la placa durante 10 días a 25° C, en / oscuridad, y tras el período de incubación se procede a su observación bajo luz U.V. de 254 y 366 nm., según el procedimiento descrito por Hara et al. (1.974), con el / fin de comprobar la aparición o no de la fluorescencia / característica de las aflatoxinas en el medio de agar.

A continuación, hemos llevado a cabo la inves tigación química de la producción de aflatoxinas en el / medio A.P.A. inoculado con las cepas a ensayar, según el siguiente método:

1) Trituración del contenido de la placa de / cultivo (agar y colonia fúngica), utilizando para ello / un homogeneizador "Stomacher 400".

2) Extracción de las aflatoxinas con clorofor mo, en agitador de muñeca, durante 30 min.

3) Filtración del extracto clorofórmico a tra vés de filtro Whatman 41 (o similar) lleno de sulfato de sodio anhidro.

4) Concentración del extracto en rotavapor, / sobre baño maría a 45° C, a sequedad.

roformo, agitando vigorosamente.

6) Análisis de este último extracto por cromatografía en capa fina, según la metodología descrita en el apartado 3.5.1, METODO III, incluida la confirmación de las aflatoxinas halladas.

4.- RESULTADOS.-

4.1.- Resultados cualitativos: Microflora de especias.-

A partir de las colonias aparecidas en las / placas de recuento, y tras su examen detenido, hemos procedido al aislamiento e identificación de un total de / 1.118 cepas de hongos, que finalmente han resultado pertenecer a un total de 84 géneros y especies, que detalla mos a continuación indicando su posición taxonómica.

4.1.1.- Taxonomía aplicada. Relación de hongos encontrados. ~~Descripción~~ Descripción de especies. Micrografías.-

Las obras de taxonomía que hemos utilizado para la clasificación de la totalidad de cepas aisladas se citan en los apartados 3.3.1 (taxonomía de mohos) y /

Como ya indicamos en 3.3.1, la taxonomía apli-
cada para la clasificación de mohos se basa en la esta-
blecida por von Arx (1.981), y, según ella, la relación
de mohos que hemos encontrado en nuestro estudio es la /
siguiente:

Clase Zygomycetes

Orden Mucorales

Género Absidia van Tieghem.

Especie: A. corymbifera (Cohn) Sacc. et Trotter.

Género Actinomucor Schostak.

Especie: A. elegans (Eidam) C.R. Benjamin et /
Hesseltine.

Género Circinella van Tieghem et Le Monn.

Especies: C. minor Lendner.

C. mucoroides Saito.

Género Mucor Micheli ex Fr.

Especies: M. circinelloides van Tieghem.

M. hiemalis Wehmer.

M. plumbeus Bonorden.

M. racemosus Fresenius.

Género Rhizopus Ehrenb.

Especies: Rh. oryzae Went et Prinsen Geerligs.

Rh. stolonifer (Ehrenb.) Lind.

Género Syncephalastrum Schröter.

Especie: S. racemosum Cohn ex Schröter.

Orden Sphaeropsidales

Género Phoma Sacc.

Orden Melanconiales

Género Epicoccum Link.

Especie: E. purpurascens Ehrenb. ex Schlecht.

Orden Moniliales (=Hyphomycetes)

Género Acremonium Link.

Género Alternaria Nees.

Especies: A. chartarum Preuss.

A. tenuis Nees.

A. tenuissima (Fr.) Wiltshire.

Género Aspergillus Micheli ex Link.

Especies: A. amstelodami (Mangin) Thom et Church.

A. awamori Nakazawa.

A. candidus Link.

A. clavatus Desmazières.

A. chevalieri (Mangin) Thom et Church.

A. ficuum (Reich.) Hennings.

A. flavus Link.

A. flavus Link var. columnaris Raper et
Fennell.

A. fumigatus Fresenius.

A. melleus Yukawa.

A. nidulans (Eidam) Wint.

A. nidulans Wint. var. latus Thom et /
Raper.

A. niger van Tieghem.

A. ochraceus Wilhelm.

A. oryzae (Ahlb.) Cohn.

A. oryzae (Ahlb.) Cohn var. effusus /
(Tira.) Ohara.

A. parasiticus Speare.

A. repens de Bary.

A. sydowi (Bain. et Start.) Thom et /
Church.

A. tamarii Kita.

A. unquis (Emile-Weil et Gaudin) Thom /
et Raper.

A. ustus (Bain.) Thom et Church.

A. versicolor (Vuill.) Tiraboschi.

A. wentii Wehmer.

Género Aureobasidium Viala et Boyer.

Especie: A. pullulans (de Bary) Arnaud.

Género Cephalophora Thaxter.

Especie: C. tropica Thaxter.

Género Cladosporium Link.

Especies: C. cladosporioides Fresenius.

C. herbarum Link.

Género Fusarium Link.

Género Paecilomyces Bainier.

Especie: P. varioti Bainier.

Género Penicillium Link.

Especies: P. aurantio-flammiferum Ramírez, Beren-
guer et Martí-
nez.

P. brevi-compactum Dierckx.

P. citreo-virens Abe ex Ramírez.

P. citrinum Thom.

P. corylophilum Dierckx.

P. chrysoqenum Thom.

P. frequentans Westling.

P. expansum Link ex Gray emend. Thom.

P. grancanariae Ramírez, Martínez et /
Ferrer.

- P. janthinellum Biourge.
- P. jensenii Zaleskii.
- P. miczynskii Zaleskii.
- P. oxalicum Currie et Thom.
- P. paxilli Bainier.
- P. purpurescens (Sopp) Raper et Thom.
- P. raistrickii Smith.
- P. roqueforti Thom.
- P. simplicissimum (Oudemans) Thom.
- P. steckii Zaleskii.
- P. velutinum van Beyma.
- P. verrucosum Dierckx var. corymbiferum
(Westling) Samson, Stolk
et Hadlok.
- P. verrucosum Dierckx var. cyclopium /
(Westling) Samson, Stolk
et Hadlok.
- P. verrucosum Dierckx var. melanochlorum
Samson, Stolk et Hadlok.
- P. verrucosum Dierckx var. verrucosum /
Samson, Stolk et Hadlok.

Género Scopulariopsis Bainier.

Especie: S. brevicaulis (Sacc.) Bainier.

Género Stemphylium Wallr.

Especie: S. botryosum Wallr.

Género Trichoderma Pers.

Especies: T. aureoviride Rifai.

T. pseudokoningii Rifai.

T. viride Pers. ex Gray.

Género Trichotecium Link.

Especie: T. roseum Link.

bles dentro del amplio grupo de las levaduras, y como indicamos en 3.3.2, hemos seguido fundamentalmente la obra de Kreger-van Rij (1.984). Del total de 220 muestras de especias analizadas, tan sólo en 50 (22.7 %) se han aislado levaduras, con unos recuentos proporcionalmente muy inferiores en general a los recuentos obtenidos para mohos. Circunscribiéndonos a las 120 muestras de pimentón analizadas, sólo en 33 de ellas (27.5 %) se aislaron levaduras; de las 100 muestras del resto de especias heterogéneas estudiadas, en tan sólo 17 (17.0 %) se aislaron levaduras.

Los géneros y especies más frecuentemente aislados son los detallados a continuación:

Género Candida Berkhout.

Especie: C. glabrosa Komagata et Nakase.

Género Cryptococcus Kützing emend. Phaff et Spencer

Género Rhodotorula Harrison.

Especie: Rh. rubra (Demme) Lodder.

Género Saccharomyces Meyen emend. Reess.

Especie: S. cerevisiae Meyen ex Hansen.

Género Sporobolomyces Kluyver et van Niel.

DESCRIPCION DE ESPECIES

MICROGRAFIAS

Los hongos incluidos en esta clase taxonomica se caracterizan fundamentalmente por presentar micelio / multinuclear, cenocítico, y reproducción sexual por conjugación de gametangios (que pueden ser del mismo tamaño o muy desiguales, aunque esencialmente similares en naturaleza y función) que da como resultado la formación de una espora de resistencia de pared gruesa denominada zigospora. En genral, no se conocen cuerpos fructíferos.

En esta Clase se incluyen dos Ordenes:

O. Entomophtorales.

O. Mucorales.

Las especies que hemos aislado en el presente trabajo pertenecen en su totalidad al O. Mucorales.

ORDEN MUCORALES.-

Incluye hongos en genral saprofíticos, caracterizados fundamentalmente porque las esporas asexuales se producen dentro de esporangios, esporangiolos o merosporangios, y no son despedidas violentamente. Micelio generalmente abundante.

Entre los géneros pertenecientes a este Orden, hemos aislado en nuestro estudio especies pertenecientes a: Absidia, Actinomucor, Circinella, Mucor, Rhizopus y / Syncephalastrum.

Género caracterizado por presentar esporangi^óforos principalmente como ramas que salen de los estolones, pero no desde el punto de unión con los rizoides, a diferencia del género Rhizopus, y, sobre todo, por la existencia de esporangios pequeños, piriformes, con notorias y características apófisis infundibuliformes. Columelas variables: semiesféricas, cónicas, mamiformes, ... Esporangiosporas lisas, redondas u ovals.

La especie aislada en nuestro estudio ha sido A. corymbifera.

A. corymbifera.-

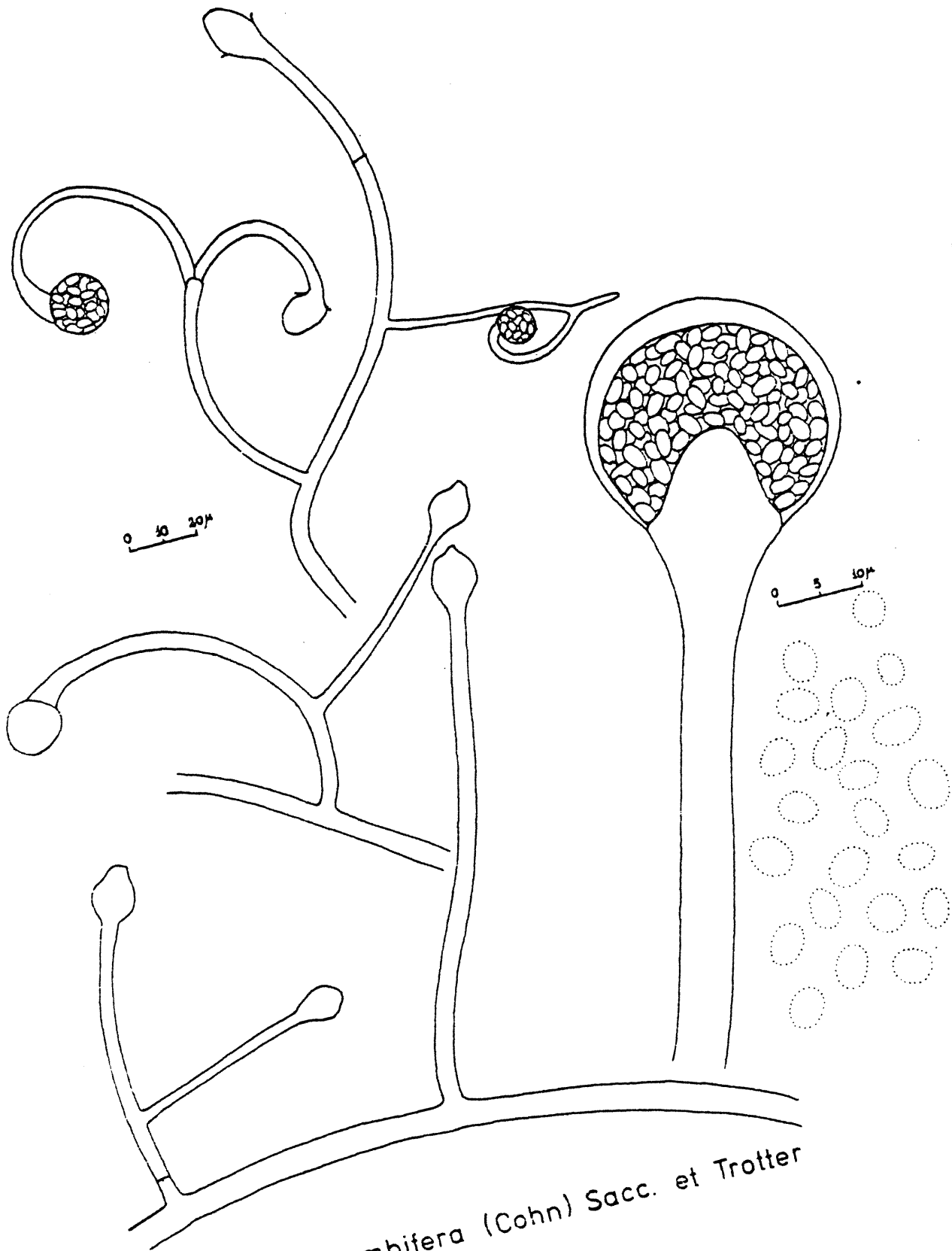
Colonias inicialmente blancas, algodonosas, / que luego van adoptando suaves tonalidades grises o gris azuladas, al madurar los esporangios. Césped miceliar de hasta 20 mm. de altura.

Esporangi^óforos ramificados, recurvados, ocasionalmente en verticilos.

Esporangios pequeños, piriformes, de tonos / grises en la madurez.

Columelas prácticamente cónicas que habitualmente presentan cortas proyecciones en su zona apical, / si bien éste no es un carácter constante.

Esporas ovals a subglobosas.



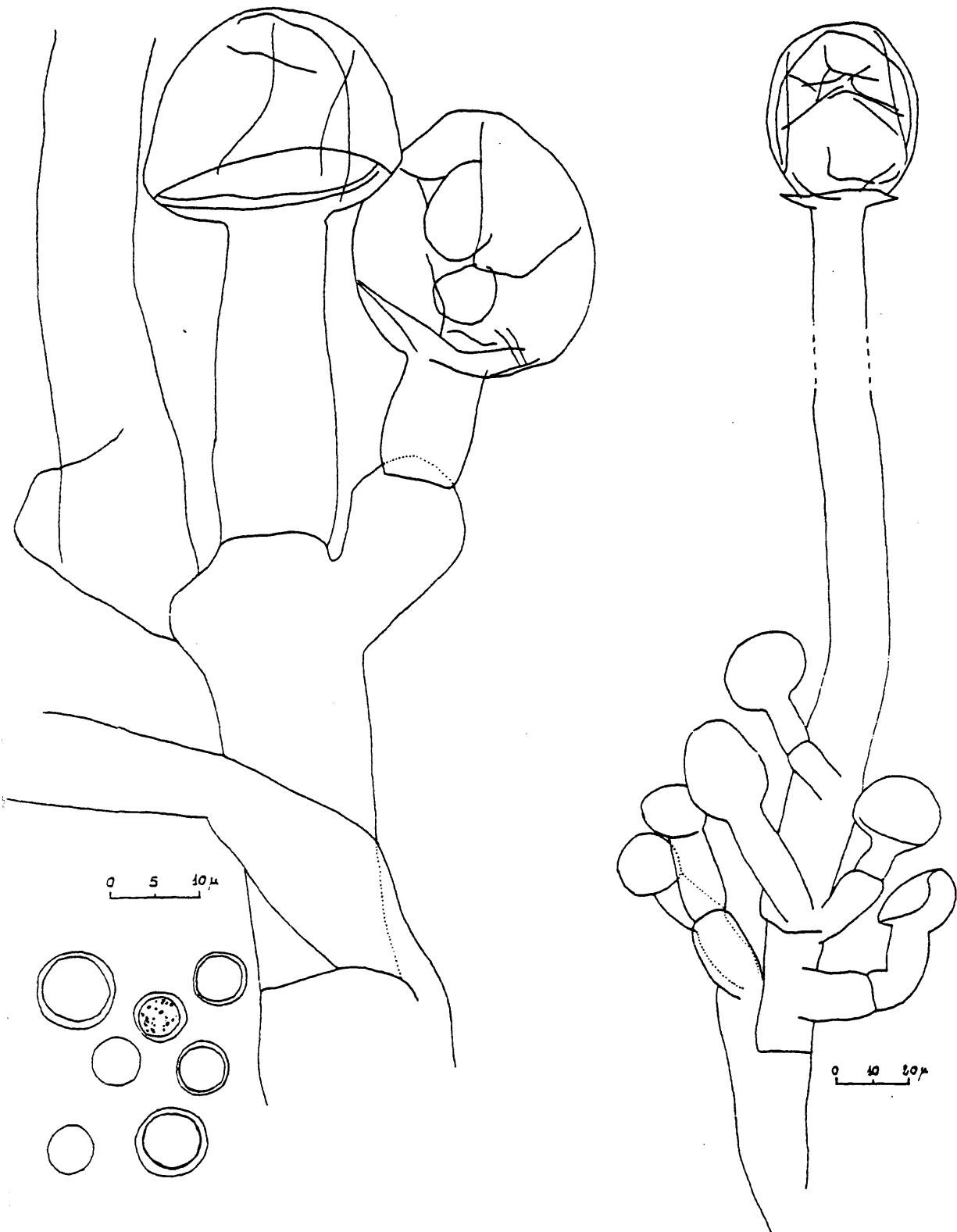
Absidia corymbifera (Cohn) Sacc. et Trotter

Este género y la especie aislada, A. elegans, se caracterizan por producir colonias inicialmente blancas que se tornan progresivamente pardas al madurar los esporangios. Esporangióforos nacidos sobre estolones, erectos, ramificados, con un esporangio grande terminal / sobre la rama principal y ramas laterales cortas, verticiladas, que acaban en esporangios más pequeños.

Esporangios sin apófisis, esféricos, de color pardo en la madurez.

Columelas lisas. ovoides a cónicas, con collarete.

Esporangiosporas globosas, lisas.



Actinomucor elegans (Eidam) Benjamin et Hesseltine

Incluye formas próximas a Mucor pero que difieren de este género en producir esporangióforos que / portan ramas circinadas finalizadas por esporangios globosos con paredes persistentes.

Esporangióforos no nacidos sobre estolones, a diferencia de Absidia, Actinomucor y Rhizopus, ramificados simpodialmente. Ramas con un esporangio o varios, a veces con una espina terminal estéril.

Esporangios sin apófisis que se sitúan terminalmente sobre las ramas circinadas, globosos, multiesporulados, con pared persistente e incrustada.

Columelas cónicas a ovales.

Esporangiosporas globosas a ovales, lisas.

En el presente estudio hemos aislado las especies C. minor y C. mucoroides.

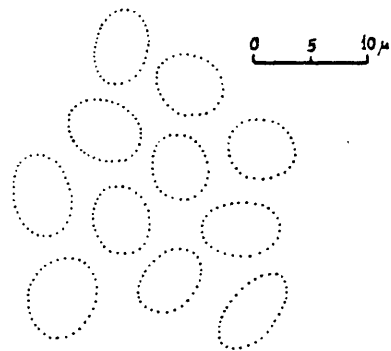
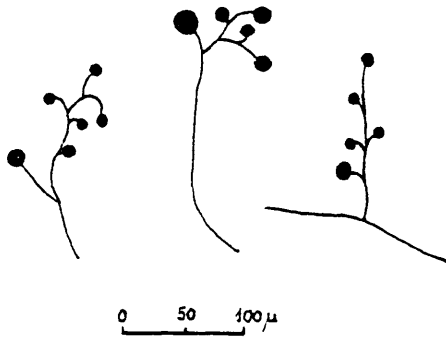
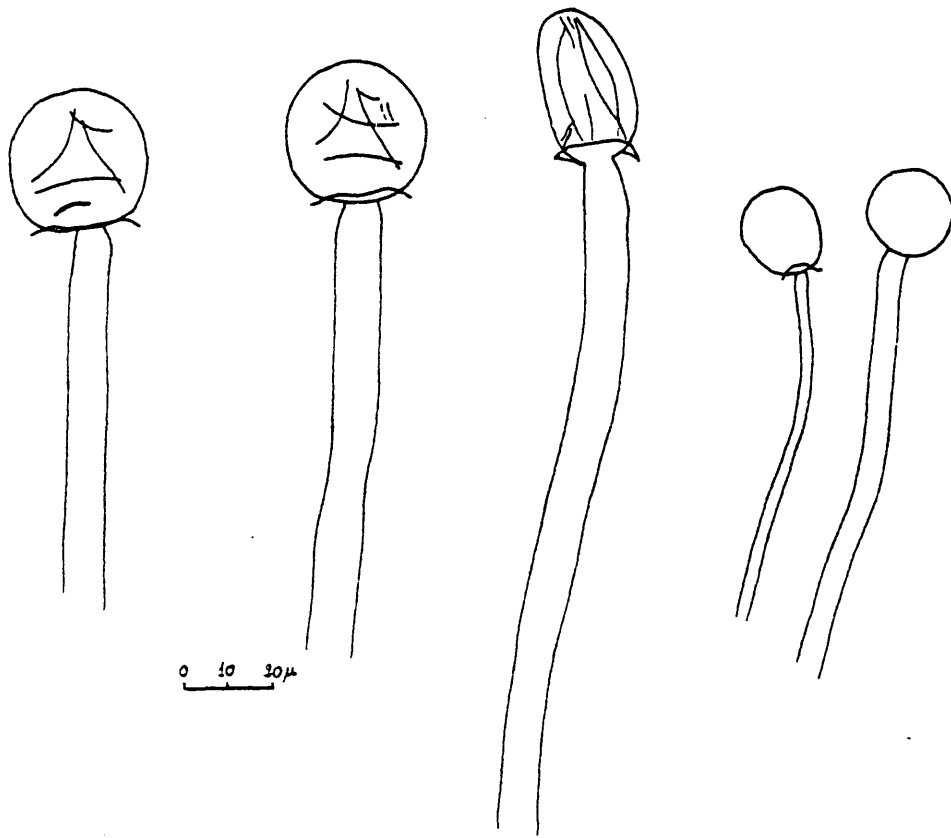
Colonias de crecimiento flocoso y micelio inicialmente blanquecino que va adoptando progresivamente / tonos canela o ante.

Esporangióforos ramificados irregularmente, / con ramas circinadas, produciendo umbelas de 4 a 5 esporangios, uno encima de otro, aunque también se observan esporangios solitarios.

Esporangios globosos, hasta de 90 μ m. de diámetro, grises a negros.

Columelas variables, normalmente ovales a globosas, lisas, con collarete.

Esporangiosporas globosas a cortamente ovales, lisas.



Circinella minor Lendner

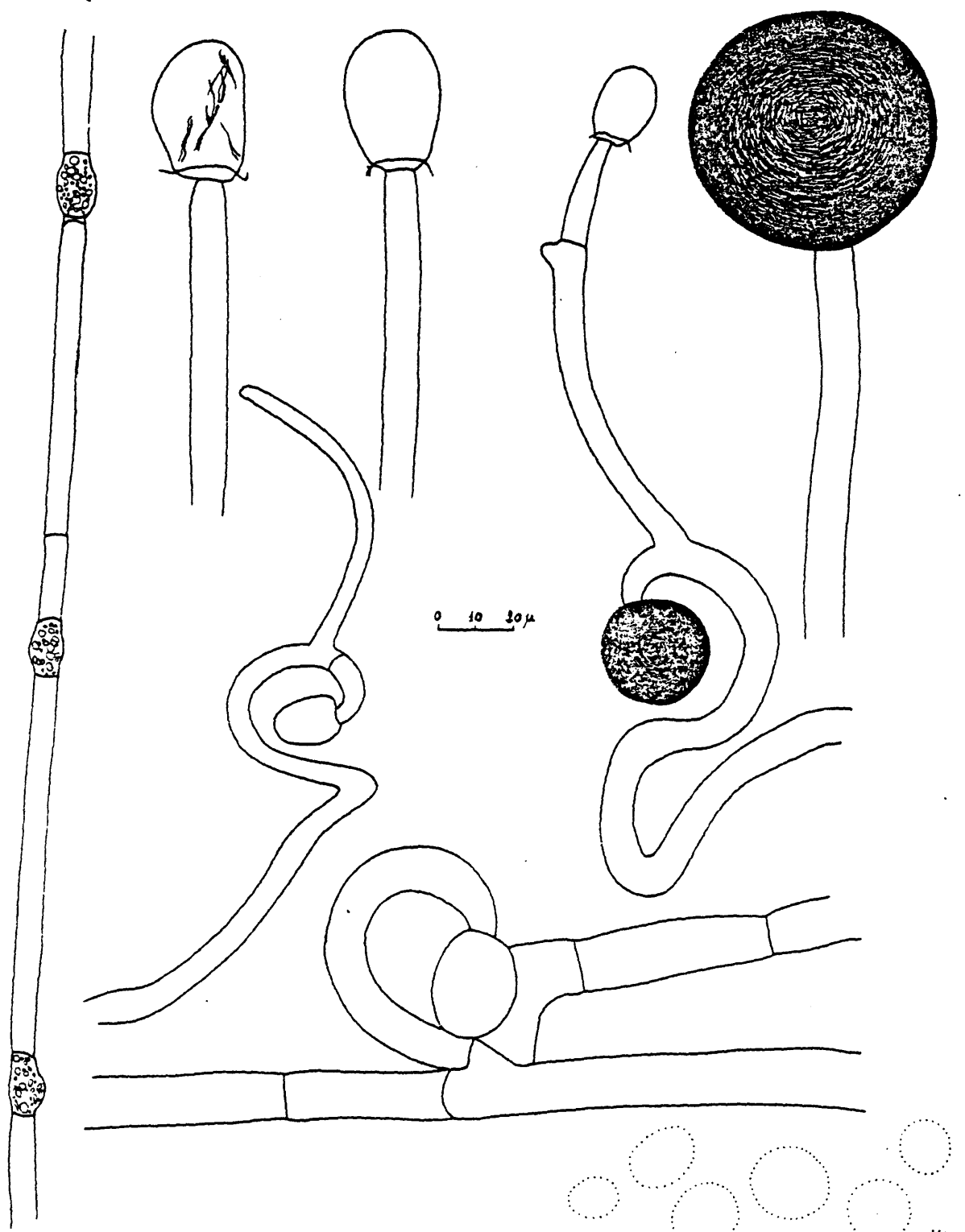
Colonias de crecimiento más rápido que las de C. minor, con césped miceliar de 10 a 15 mm. de altura, en tonos grises que pasan a marrón con la edad.

Esporangióforos característicamente retorcidos en forma de espirales abiertas, ramificados simpdialmente y produciendo pedúnculos circinados que portan un sólo esporangio, un esporangio y una espina estéril o dos esporangios.

Esporangios generalmente globosos, de hasta / 85 μm . de diámetro, de color gris oscuro.

Columelas ovales a piriformes, de hasta 50 x 70 μm ., con collarete.

Esporangiosporas globosas a cortamente ovales, lisas, de tamaño inferior a 10 μm . en su diámetro mayor.



Circinella mucoroides Saito

Dentro del O. Mucorales, el género Mucor es / el más abundante en especies, ampliamente difundidas, y que en general producen colonias de amplio desarrollo sobre la mayoría de los medios de cultivo, con césped miceliar bien desarrollado pero sin estolones ni rizoides.

Los esporangióforos, pues, surgen del micelio (no nacen sobre estolones, a diferencia, por ejemplo, de Rhizopus y Absidia), erectos, simples o ramificados monopodial o simpodialmente.

Esporangios esféricos, sin apófisis, con columela típicamente presente. Dicha columela adopta formas variadas, según las especies: hemisférica, esférica, obovoide, elipsoidal, piriforme, cónica con base truncada, etc.

Esporas globosas a ampliamente elipsoidales, incluso reniformes, según las distintas especies.

En nuestro estudio, las cepas aisladas han sido clasificadas como pertenecientes a las especies: M. / circinelloides, M. hiemalis, M. plumbeus y M. racemosus.

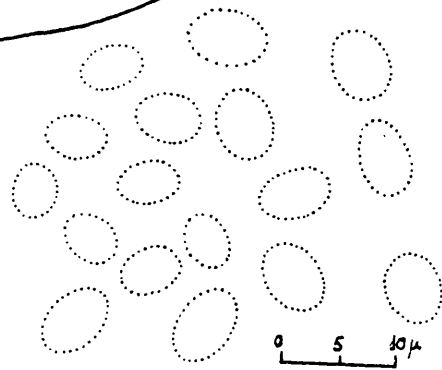
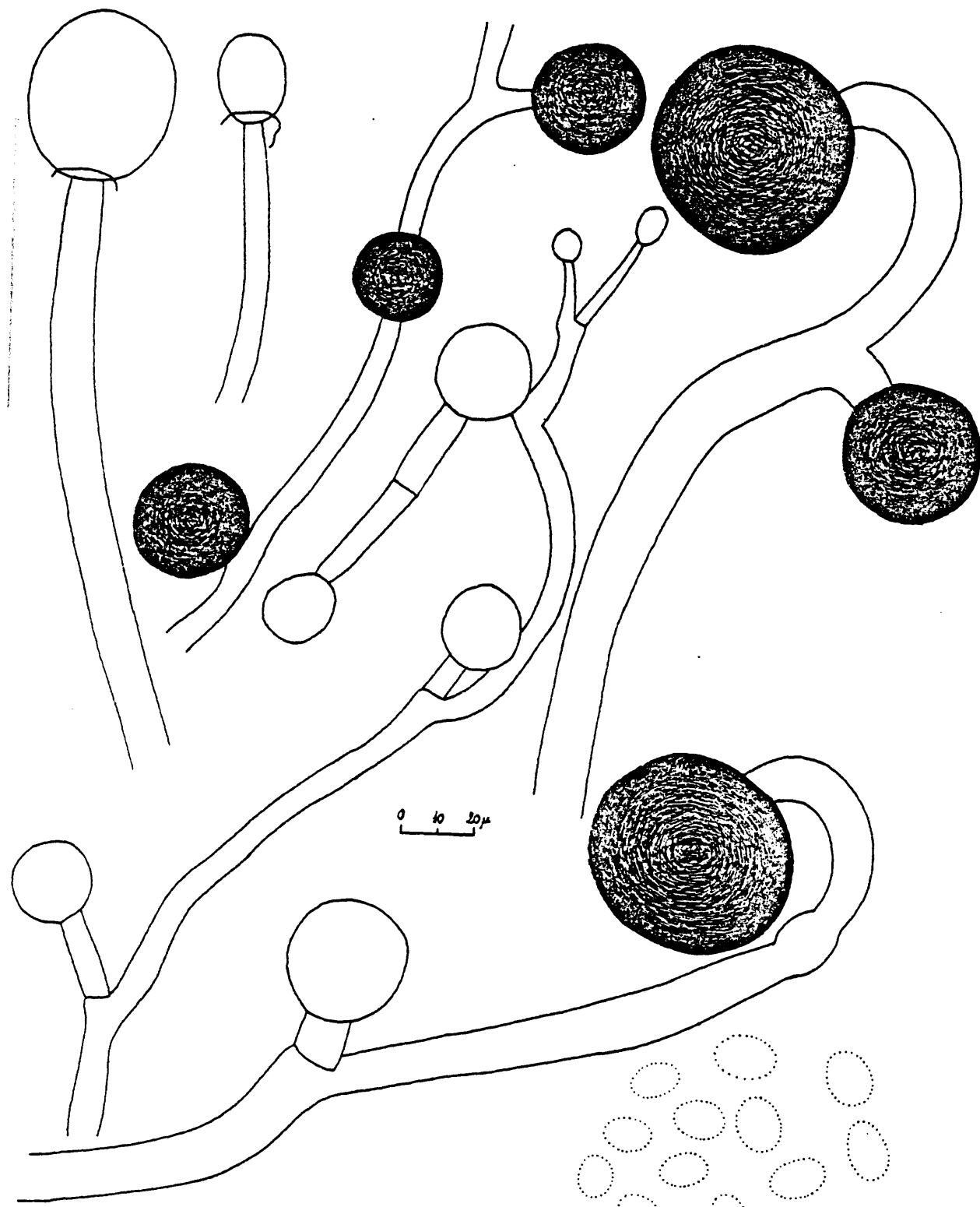
Colonias blanquecinas con tonalidades progresivamente marronáceas a grisáceas, extendidas.

Esporangióforos ramificados simpodialmente, / con ramas cortas y encorvadas, en ocasiones tan cortas / que el esporangio parece sésil. No es común la existencia de clamidosporas en los esporangióforos.

Esporangios globosos, oscuros, generalmente / de diámetro que alcanza hasta 80 μm .

Columelas elipsoidales, obovoides o globosas, lisas.

Esporangiosporas elipsoidales a subglobosas o globosas, lisas, de 4 a 6 μm de diámetro.



Mucor circinelloides van Tieghem

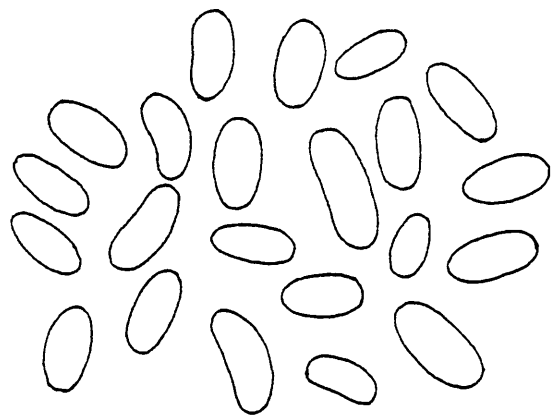
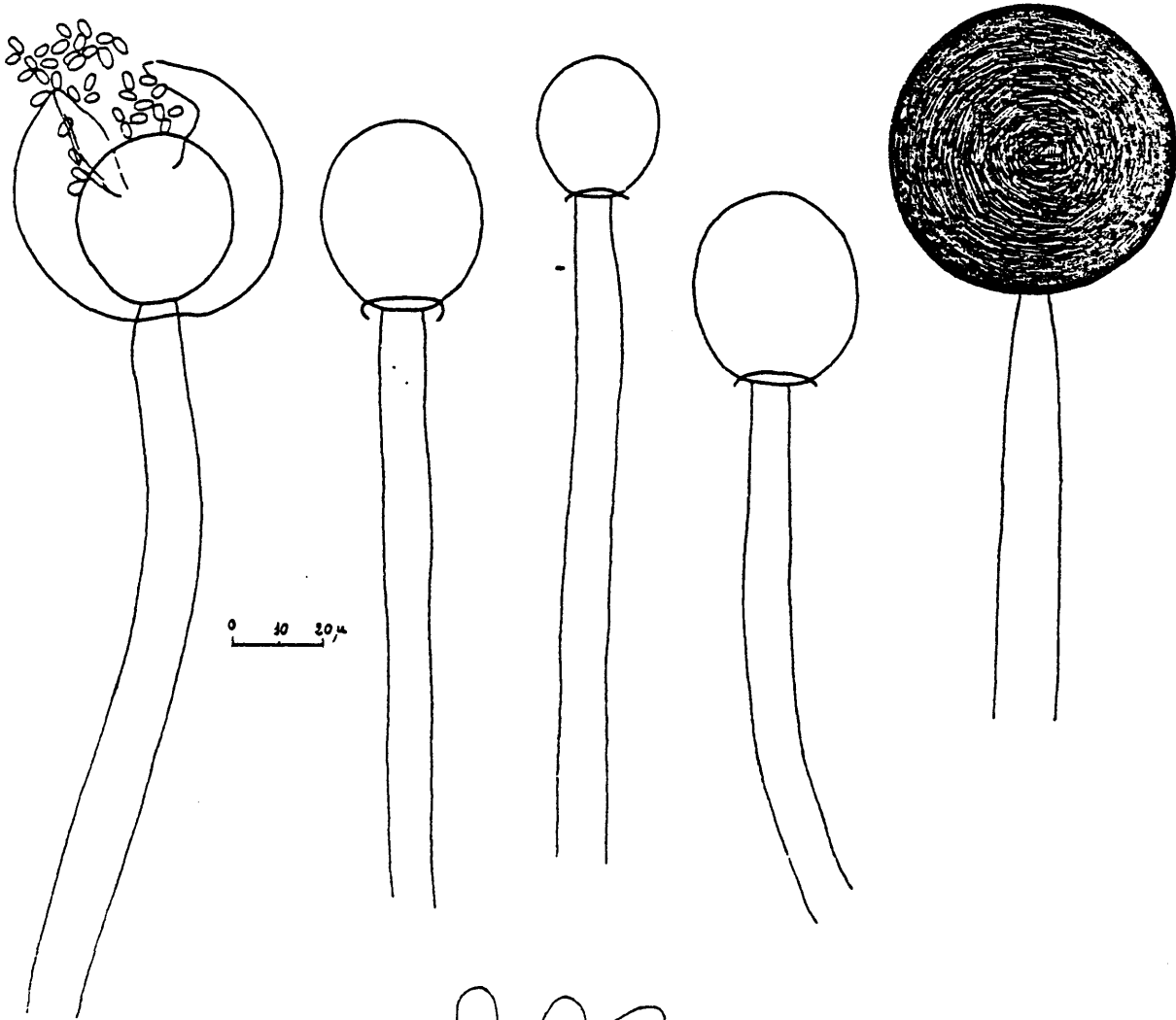
Colonias blancas, en ocasiones algo grisáceas con césped miceliar compacto, erecto, de 1-2 cm. de altura, que habitualmente llega hasta la tapa de la placa de cultivo.

Esporangióforos generalmente simples, en ocasiones ramificados simpodialmente, relativamente largos.

Esporangios esféricos, de 50 a 80 μm . de diámetro, pardo-grisáceos, con paredes delicuescentes que al desaparecer dejan un collarete en la columela.

Columelas esféricas a ovaes, de hasta 50 μm . de altura, en ocasiones mayores, lisas.

Esporangiosporas muy variables en tamaño, ovaes, elipsoidales, incluso reniformes. Lisas.



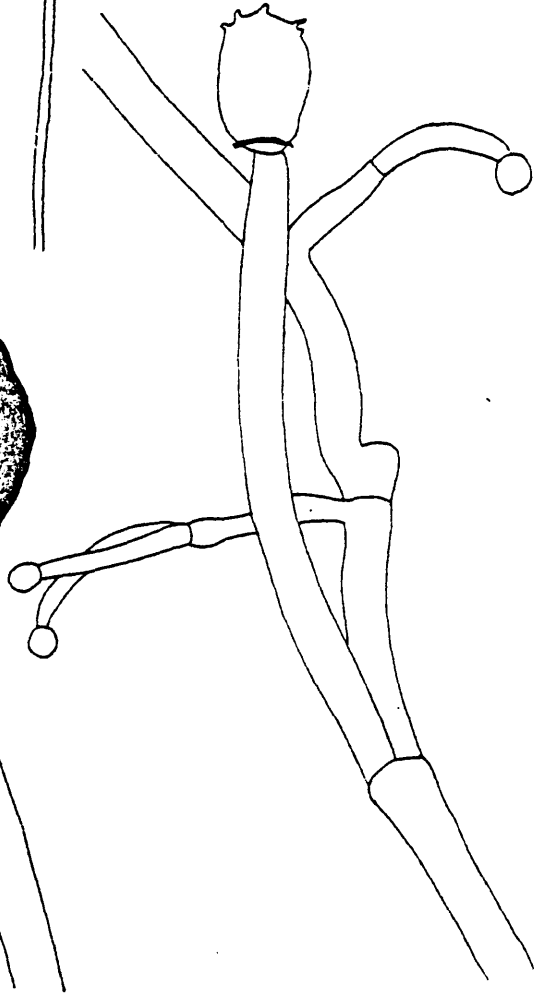
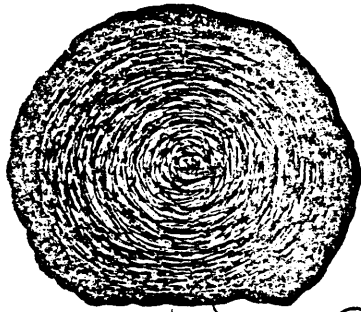
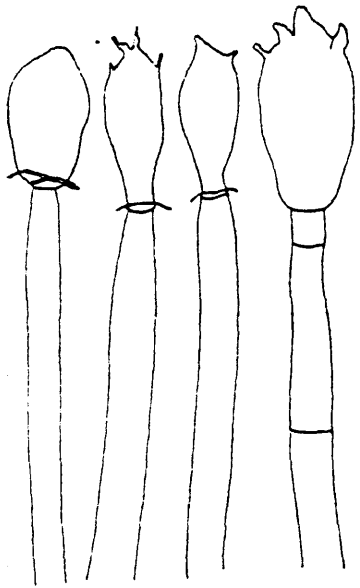
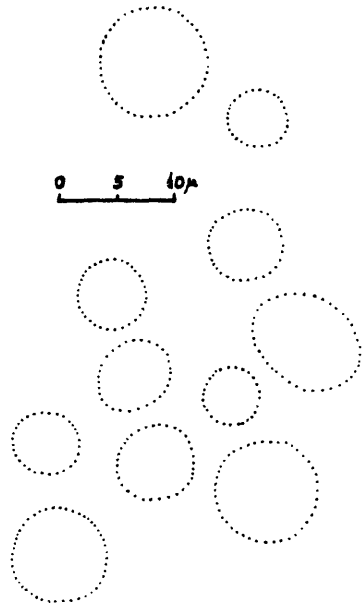
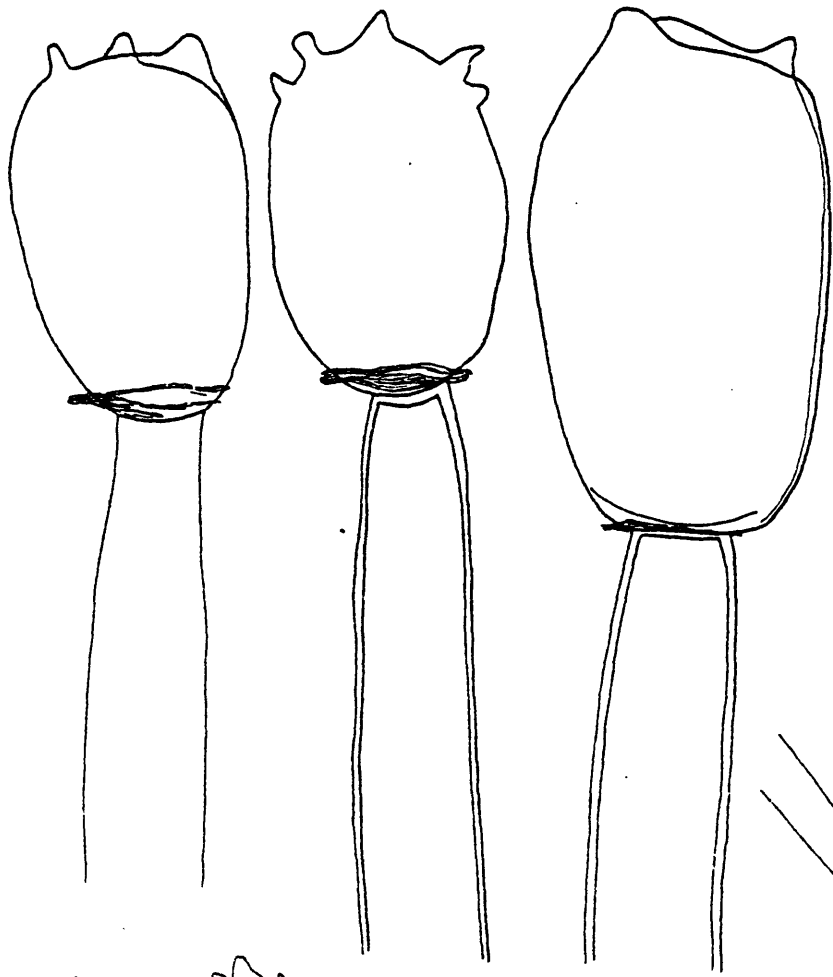
Mucor hiemalis Wehmer

Colonias con césped miceliar de 2 a 20 mm. de altura, color gris ratón a gris ratón oscuro. Esporangióforos ramificados monopodial y simpodialmente, ambas formas usualmente presentes en la misma colonia, algo estreñidos debajo de los esporangios.

Esporangios de color gris a gris oscuro, brillantes, de hasta 80-100 $\mu\text{m.}$, incluso mayores, con paredes incrustadas que se rompen al llegar la madurez.

Columelas piriformes, obovoides, sobre una base truncada, las menores apuntadas cónicamente, de hasta 50 x 25 $\mu\text{m.}$, infrecuentemente mayores, lisas o provistas de una o varias proyecciones puntiagudas en su parte apical, de hasta 5 $\mu\text{m.}$ de longitud. Con collarete.

Esporangiosporas globosas, un poco elipsoides o con forma irregular, de (5) 7 a 8 (12) $\mu\text{m.}$ de diámetro.



0 10 20 μ

Mucor plumbeus Bonorden

Colonias que alcanzan un desarrollo variable, generalmente con césped miceliar de altura inferior a 10 o 20 mm., de color gris-marrón.

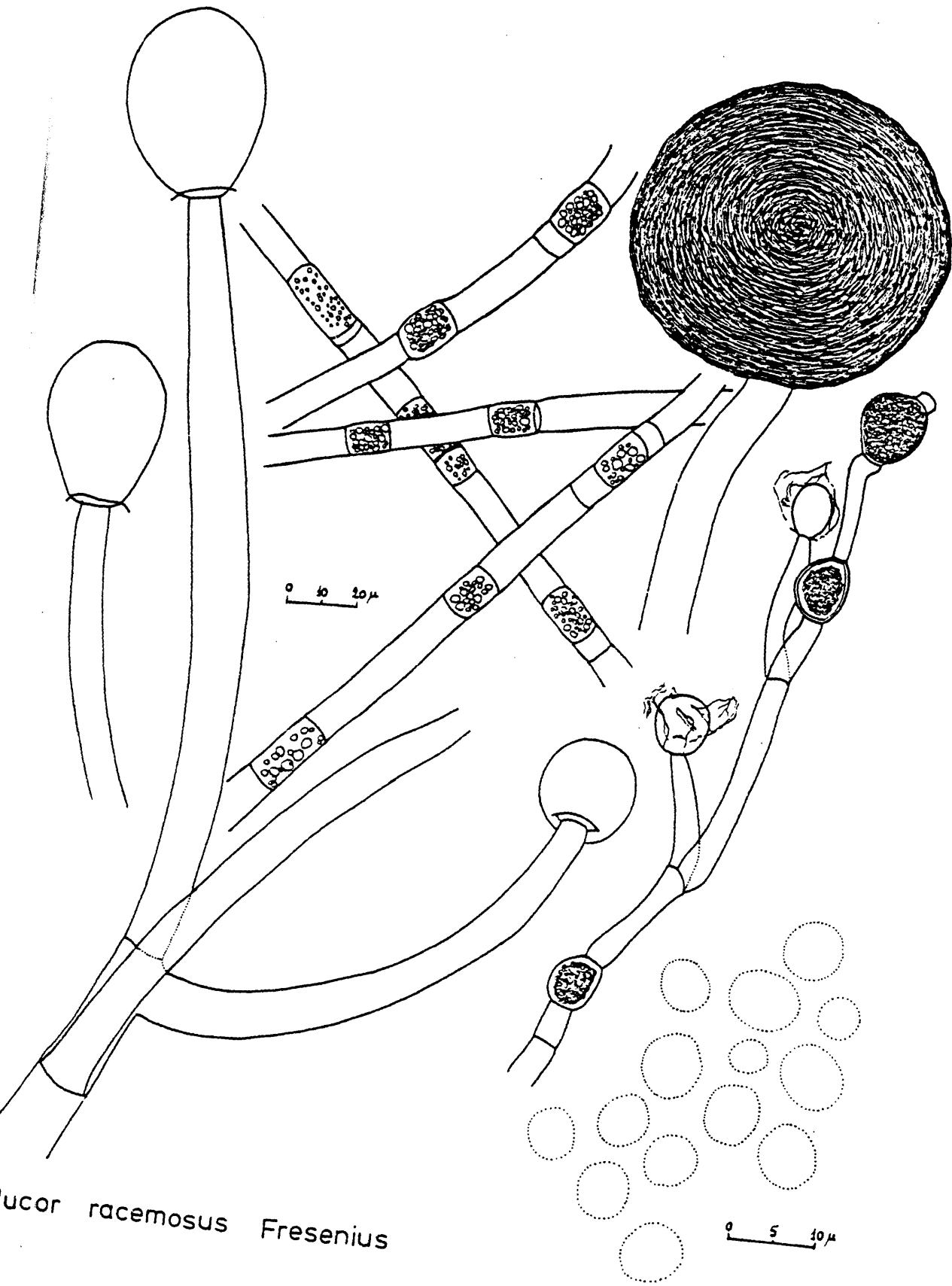
Esporangióforos ramificados monopodial y simpodialmente.

Esporangios en principio hialinos que luego adoptan tonalidades oscuras (gris-pardo), brillantes, de / hasta 80-90 μm de diámetro, con paredes incrustadas que / se rompen en la madurez.

Columelas variables: obovoides, elipsoidales o piriformes, usualmente con base truncada, de hasta 60 x / 40 μm ., raramente mayores, con collarete.

Esporangiosporas ampliamente elipsoidales a / subglobosas, según facies, lisas, de 5 a 8 (10) x 4 a 7 / μm .

Clamidosporas típicamente abundantes en las hifas aéreas y en los esporangióforos, con forma variable / aunque predominando la forma de barril.



Urococcus racemosus Fresenius

Las especies de este género crecen con extrema rapidez en la mayoría de los medios de cultivo, expandiéndose ampliamente por medio de estolones.

Presentan esporangióforos aislados o más frecuentemente en grupos, formados sobre estolones en los puntos de unión de los rizoides y opuestos a ellos, no ramificados, ocasionalmente divididos cerca del ápice y que portan esporangios terminales que contienen gran cantidad de esporas.

Esporangios globosos, con apófisis en forma de embudo. Inicialmente hialinos o blancos, se tornan negros en la madurez.

Columelas claramente perceptibles, de formas variables.

El género Rhizopus difiere de Mucor y Phycomyces por tener estolones y rizoides. Puede separarse de Actinomucor por sus esporangios oscuros sobre esporangióforos no ramificados, que surgen generalmente de estolones bien desarrollados con rizoides claramente distinguibles. Asimismo, se diferencia de Absidia por sus esporangios generalmente esféricos sobre esporangióforos no ramificados opuestos a los rizoides.

Según Cole y Cox (1.981), se han aislado diversas micotoxinas a partir de especies de este género:

B y fumigaclavina B.

Las cepas de Rhizopus que hemos aislado e i--
dentificado en nuestro estudio pertenecen a las especies
Rh. stolonifer y Rh. oryzae.

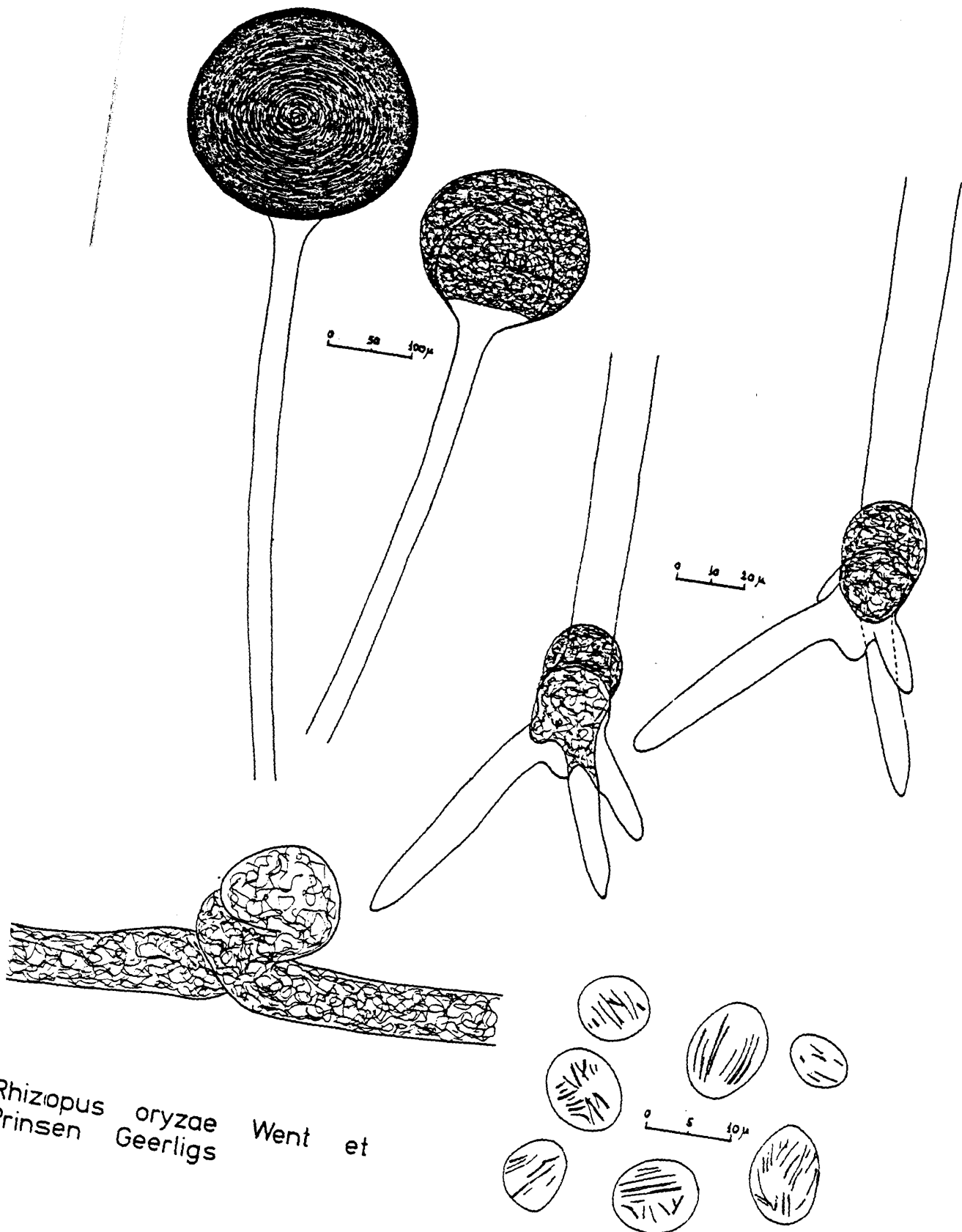
-----0-----

Colonias blanquecinas que se vuelven gradualmente grisáceas al madurar los esporangios.

Esporangióforos sobre estolones, de 1.5 a 2 / mm. de longitud, con hinchamientos locales, solitarios o agregados en pequeños grupos, opuestos a rizoides de tonos marrones.

Esporangios negro-grisáceos, de hasta 240 μ m. de diámetro, con columela elipsoidal o con base truncada, usualmente de tamaño inferior a 130 μ m. de altura.

Esporangiosporas semejantes a las de Rh. stolonifer, aunque de tamaño algo inferior.



Rhizopus oryzae Went et
 prinsen Geerligs

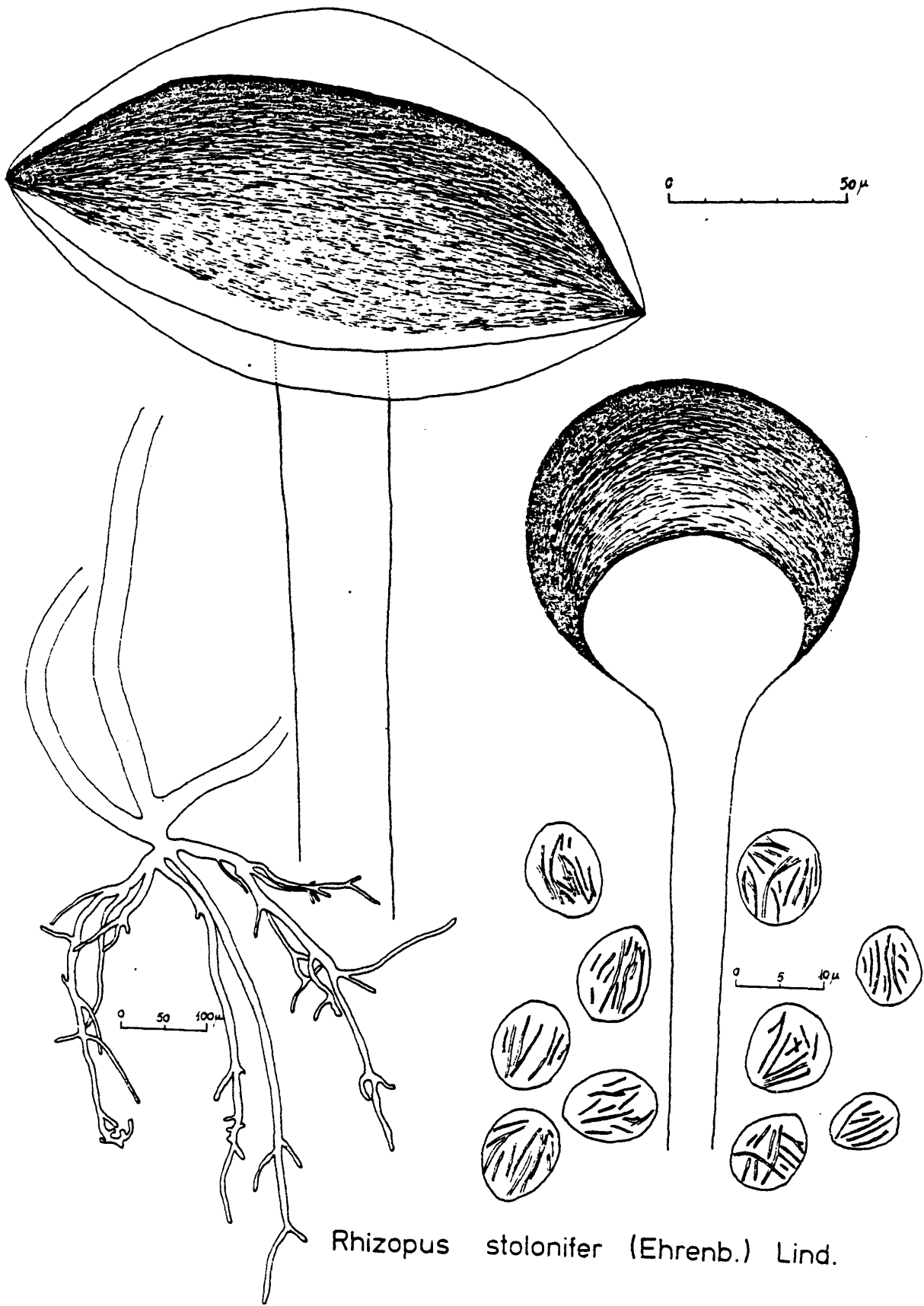
Especie de distribución universal que se desarrolla con gran rapidez en casi todos los medios de cultivo; sin embargo, crece pobremente sobre Agar Solución de Czapek.

Forma colonias blanquecinas, con micelio aéreo estéril y gran desarrollo de estolones, que invaden por completo los tubos o placas de cultivo en 3-5 días a 25° C.

Esporangióforos erectos sobre los estolones, de hasta 2 mm. (o incluso más) de longitud, marrones, / dispuestos en grupos de 1 a 3 (ocasionalmente más) y opuestos a rizoides pardos bien desarrollados, incluso / con ramificación secundaria.

Esporangios inicialmente blancos, que se vuelven negruzcos al madurar, esféricos, por lo general de / tamaño inferior a 275 μ m. de diámetro, con columela cónica a hemisférica que, después de la dehiscencia del esporangio, forma por colapso un órgano semejante al pileo / de una seta, usualmente de altura inferior a 140 μ m., raramente mayores.

Esporangiosporas globosas a elipsoidales, angulares, generalmente de 10 a 13 (15) μ m. de longitud en su eje mayor, claramente estriadas.



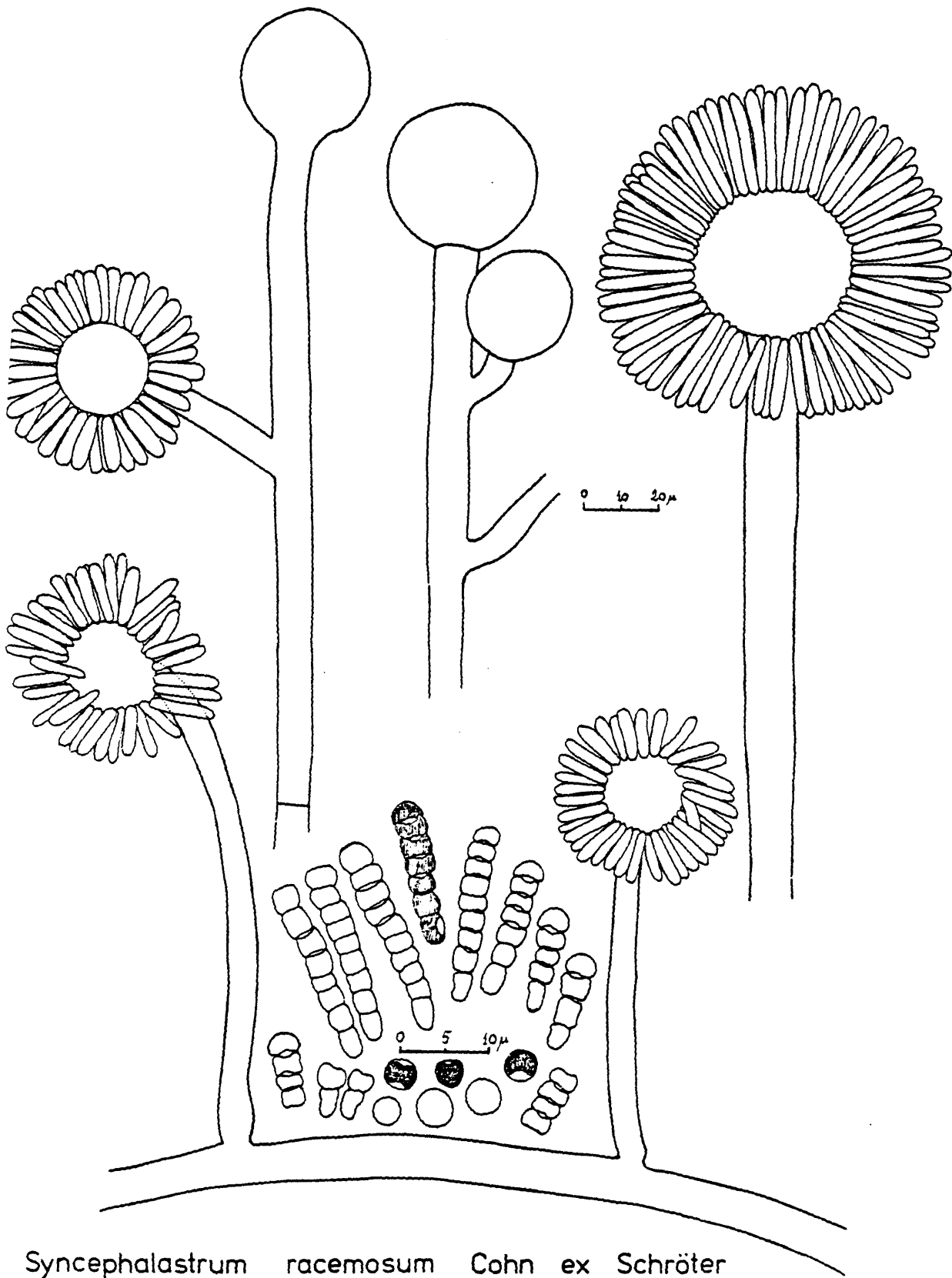
Rhizopus stolonifer (Ehrenb.) Lind.

Este género incluye una sola especie, aislada también en nuestro estudio: S. racemosum.

Se caracteriza por dar lugar a colonias con / césped miceliar inicialmente blanco que rápidamente pasa a gris oscuro, al madurar las estructuras reproductoras, de hasta 1 cm. de altura (usualmente menos).

Esporangióforos inicialmente simples, más taz de ramificados, con ramas secundarias generalmente cortas. En cualquier caso, finalizan en un ápice globular / que se cubre por merosporangios. Estos merosporangios / constituyen el carácter distintivo del género, y son esporangios tubulares radiados desde el engrosamiento vesicular. Las cabezas fructíferas así constituídas se asemejan, a pequeño aumento, a las de ciertos Aspergillus.

Esporas nacidas en hilera dentro de los merosporangios, de 2 a 5 μ m. de diámetro, globosas a irregulares.



Syncephalastrum racemosum Cohn ex Schröter

Incluye a hongos con micelio septado de los /
cuales no se conocen formas sexuales o perfectas, por lo
que también se denomina a la Clase como Fungi Imperfecti.

Las esporas asexuales pueden ser producidas /
sobre las hifas, sobre conidióforos o dentro de cuerpos
fructíferos, pero no dentro de los esporangios.

En esta Clase se distinguen cuatro Ordenes:

O. Sphaeropsidales.

O. Melanconiales.

O. Moniliales.

O. Mycelia Sterilia.

Los géneros y especies aislados en el presen-
te trabajo, se incluyen dentro de los Ordenes Sphaeropsi-
dales, Melanconiales o Moniliales.

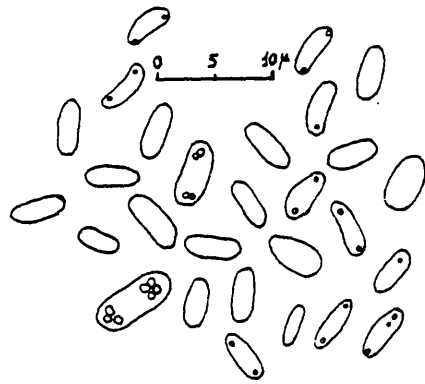
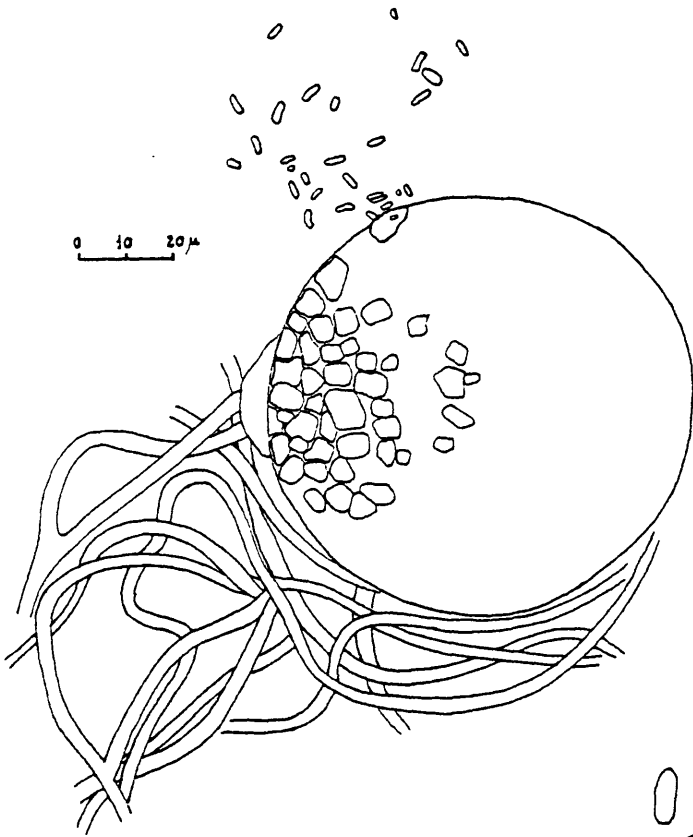
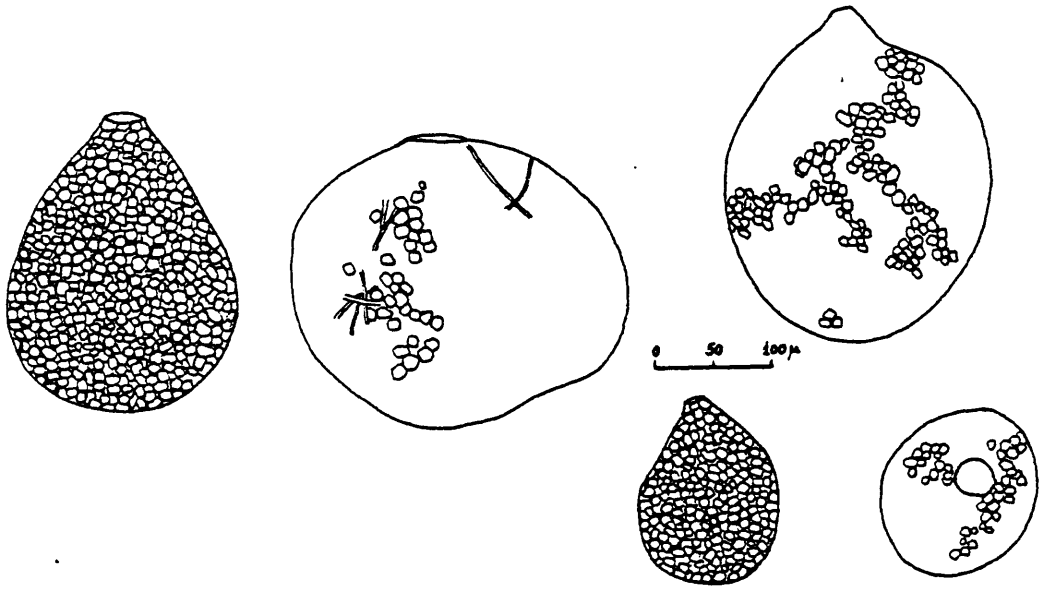
Se caracteriza fundamentalmente porque las esporas se producen dentro de cavidades de forma esférica o variable, denominadas picnidios, que pueden estar cerradas o presentar un poro u ostiolo.

Entre los hongos pertenecientes a este Orden, hemos aislado el género Phoma.

PHOMA.-

Género caracterizado por presentar hifas a menudo oscuras y picnidios ostiolados, glabros al menos alrededor del poro, con células esporógenas hialinas y esporas hialinas, generalmente unicelulares, con base redondeada, alargadas a ovaes.

Según Cole y Cox (1.981), en este género se / han encontrado especies micotoxigénicas, habiéndose aislado a partir de ellas: citocalasinas A y B, protofomina, deoxafomina, proxifomina, terreína, ác. tenuazoico, ác. secalónico A y emodina.



Phoma sp. Sacc.

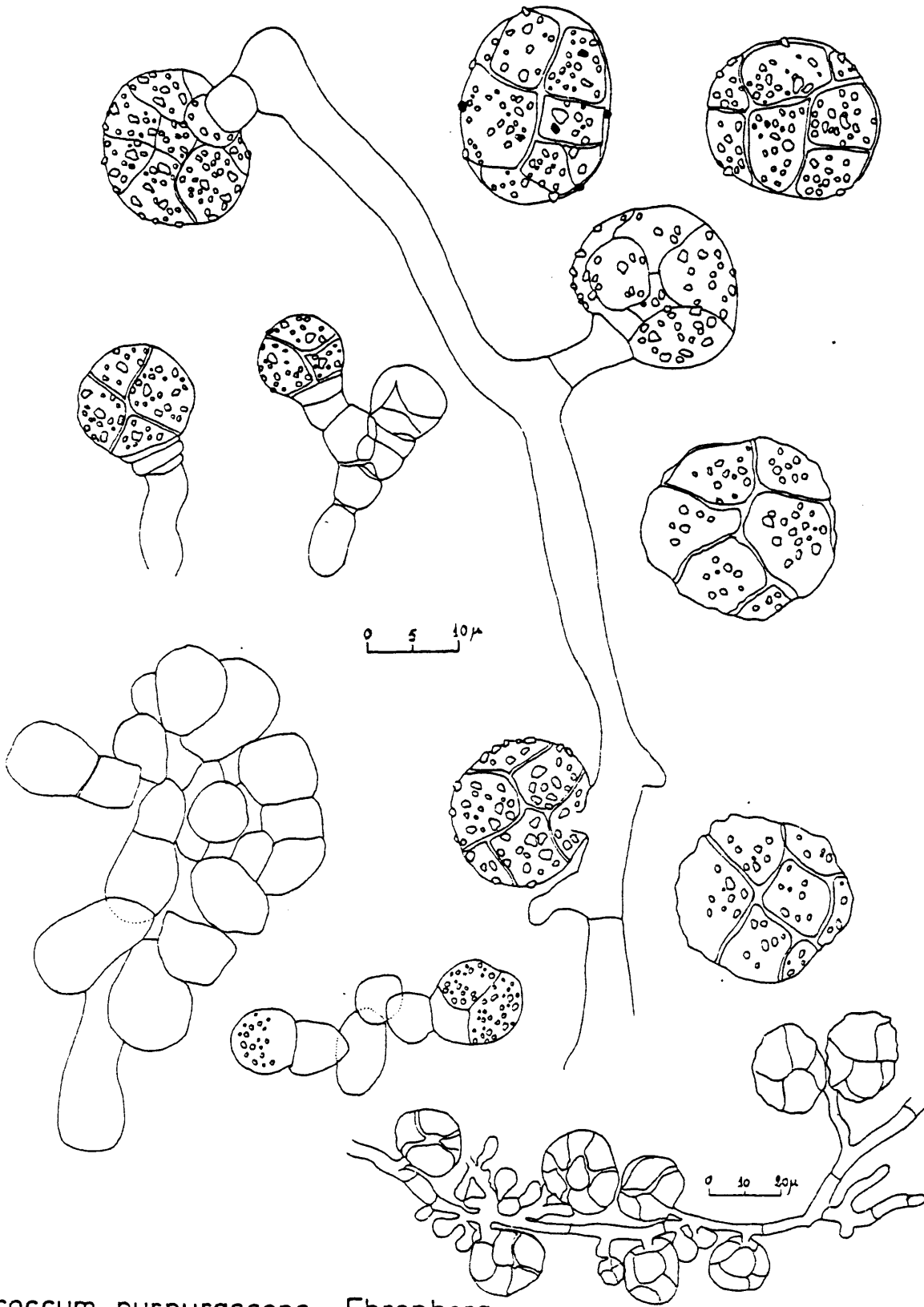
Se caracteriza fundamentalmente porque las esporas se producen sobre una capa discoide o aplanada de conidióforos o células en acérvulo.

Entre los hongos pertenecientes a este Orden, hemos aislado la especie Epicoccum purpurascens.

EPICOCIMUM.-

Género caracterizado por incluir micromicetos que producen acérvulos pequeños y dictiosporas.

La especie aislada, E. purpurascens, presenta conidióforos muy cortos sobre racimos apretados de hifas, dando en ocasiones la apariencia de que los conidios están sésiles sobre las hifas. Las esporas son dictiosporas, esféricas, verrugosas, generalmente aisladas, de tonalidades oscuras (marrón a marrón rojizo).



Epicoccum purpurascens Ehrenberg
ex Schlecht.

En el O. Moniliales se incluyen todas las formas de deuteromicetos en las que los conidióforos no se localizan en el interior de un picnidio (O. Sphaeropsidales) o sobre un acérvulo (O. Melanconiales), aunque presentan otras formas particulares de reproducción, a diferencia de aquellos hongos en los que no se conocen tales formas, que producen micelio y, en algunos casos, esclerocios, pero no verdaderas estructuras reproductoras o / conidios (O. Mycelia Sterilia).

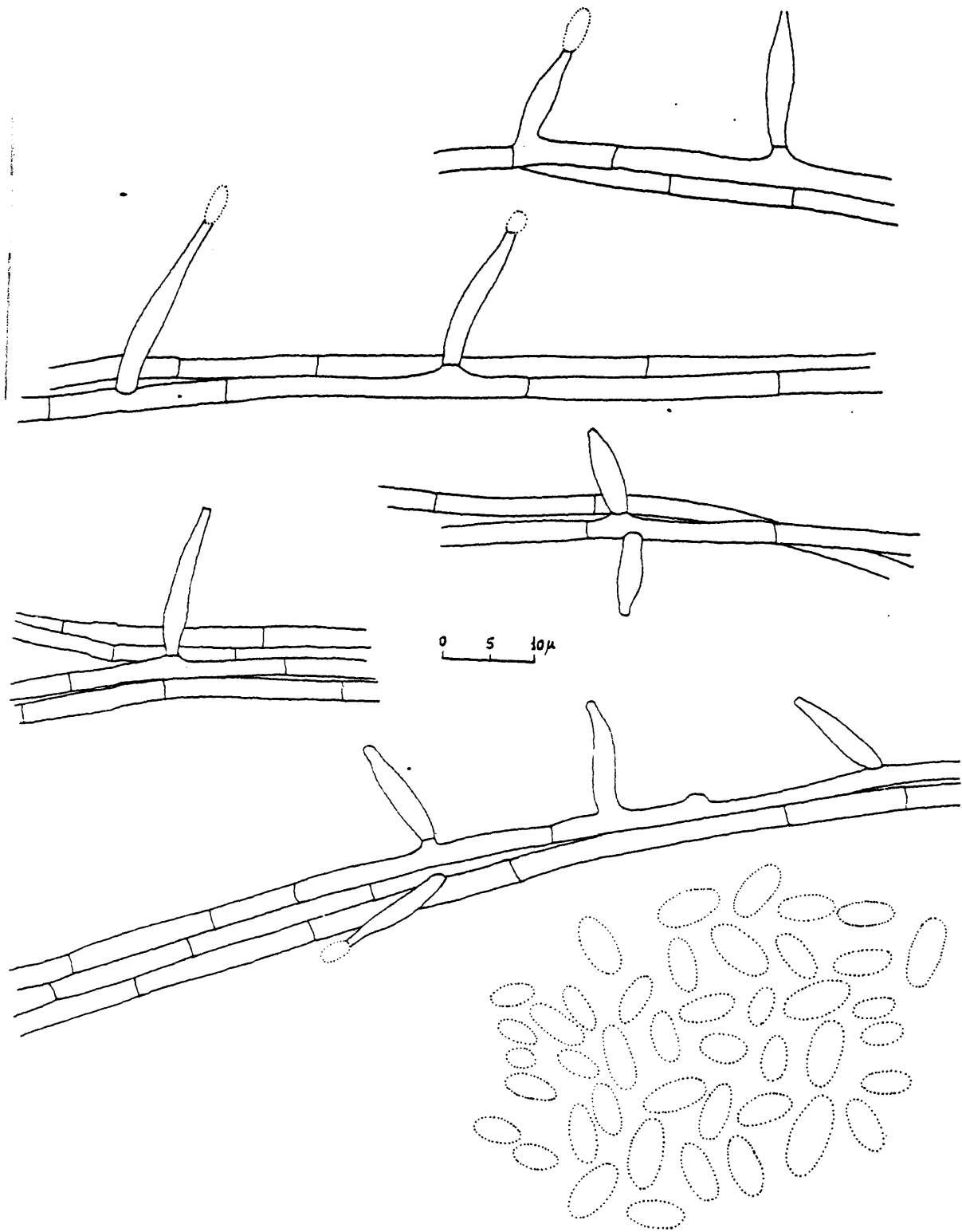
Entre los géneros incluidos en el O. Moniliales hemos aislado e identificado en nuestro estudio especies pertenecientes a: Acremonium, Alternaria, Aspergillus, Aureobasidium, Cephalophora, Cladosporium, Fusarium, Paecilomyces, Penicillium, Scopulariopsis, Stemphylium, Trichoderma y Trichotecium.

Colonias generalmente blancas a rosadas, flo-
cosas. Hifas delgadas que habitualmente dan lugar a es--
tructuras en forma de trenza.

Conidióforos ausentes. Las células esporóge--
nas son fiálides que surgen directamente y aisladas des-
de las hifas vegetativas o desde trenzas de hifas. Fiálii
des ahusadas hacia el ápice, generalmente largas, que /
producen fialosporas nacidas en sucesión basipétala, hiaa
linas, globosas a ovoides o cortamente cilíndricas, no /
septadas. Las fialosporas se agrupan en masas que adop--
tan la forma de esferas en el ápice de las fiálides, o /
más raramente en cadenas sumamente frágiles.

Cole y Cox (1.981) citan el aislamiento de /
sustancias conceptuadas como micotoxinas a partir de cull
tivos de Acremonium, como por ejemplo la oosporeína (= i
soosporina = chaetomidina).

-----0-----



Acremonium sp. Link

Colonias de aspecto muy variable, generalmente adoptando tonalidades oscuras, que crecen extensamente sobre los medios de cultivo.

Conidióforos oscuros, septados, simples o ramificados, que portan conidios en el ápice.

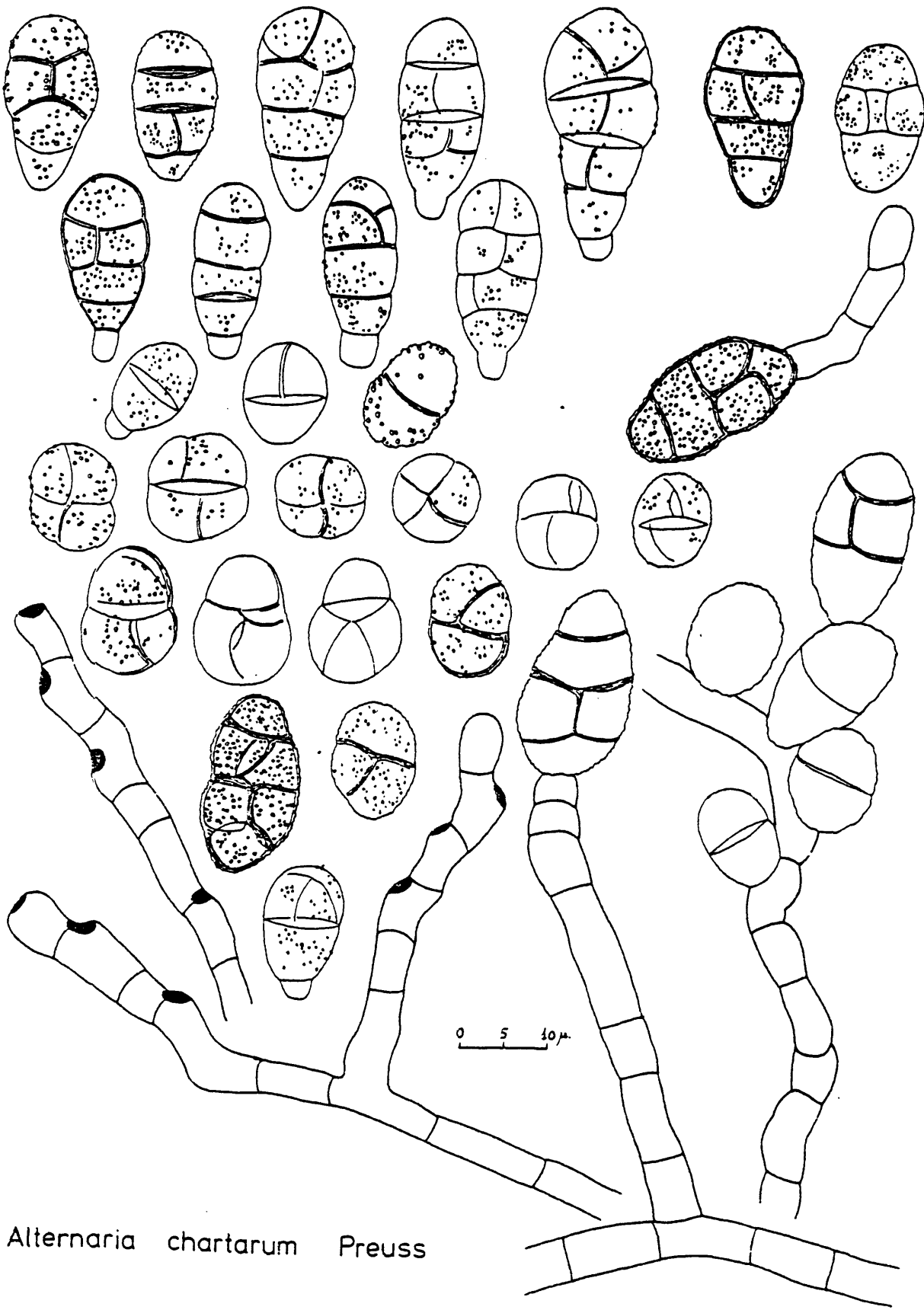
Las especies de Alternaria se caracterizan por la producción de dictiosporas, conidios obclavados, redondeados en la base, a menudo con una célula apical alargada, con septos transversales y longitudinales (murifor---mes), oscuramente pigmentadas, lisas, equinuladas o verrugosas, solitarias o más frecuentemente producidas en sucesión acropétala para formar cadenas simples o ramificadas.

Joly (1.964) agrupa las especies de Alternaria en tres Secciones: Clarseminae, Brunneoseminae y Rigidae.

Las cepas de Alternaria que hemos aislado e identificado en el presente estudio pertenecen a las especies: A. chartarum, A. tenuis y A. tenuissima.

Perteneciente a la Sección Brunneoseminae, A. chartarum se caracteriza por tener esporas de color marrón, verrucosas, equinuladas o casi lisas, más ventruadas que las de A. tenuis, y provistas de un estrechamiento apical marcado en las esporas que han dado origen a / una cadena; están, pues, prolongadas por un ápice simple, ramificado o geniculado, que sustenta esporas alternarioides y esporas globosas mezcladas, según la longitud de las cadenas hijas.

Se la distingue fácilmente de A. consortiale por sus proporciones siempre elevadas de esporas alternarioides. Por otra parte, la importancia de las ramificaciones entraña la existencia de proporciones relativamente elevadas (40 al 60 %) de esporas globosas, situadas / en el extremo de las cadenas. Es éste un carácter que / permite distinguir fácilmente A. chartarum de A. tenuis en preparaciones microscópicas en las que las cadenas de esporas están disociadas.

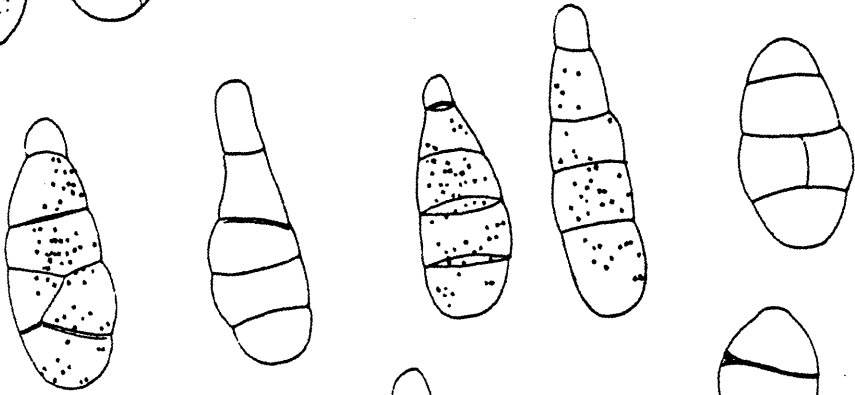


Alternaria chartarum Preuss

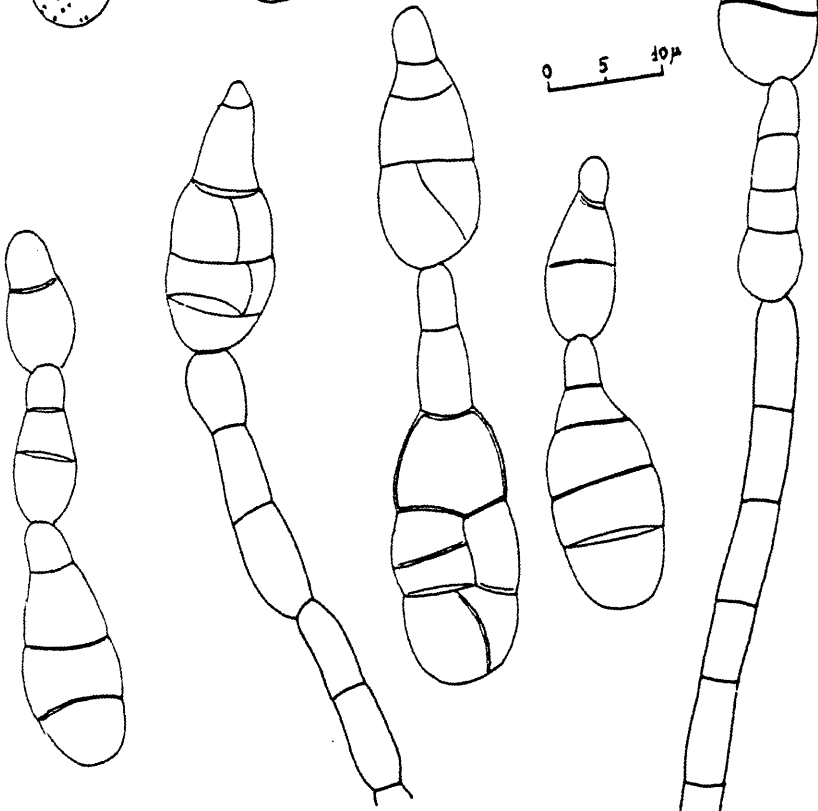
Perteneciente a la Sección Brunneoseminae, se caracteriza por la existencia de esporas agrupadas en cadenas muy poco ramificadas. Como consecuencia, y debido a que cada ápice no engendra en general más que una espora, resultan largas cadenas rectas, sin ramificar, que / contienen proporciones bajas de esporas terminales globosas y sin prolongación apical (20 al 40 % de los aisla--mientos).

Dictiosporas de color marrón, lisas a verrugo--sas, con ápice simple.

Cole y Cox (1.981) han recopilado las sustan--cias conceptuadas como micotoxinas producidas por A. te--nuis: alternariol, alternariol monometil éter, altenui--sol, altenuena, altenusina, dehidroaltenusina, altertoxi--nas I y II, ác. tenuazoico.



0 5 10 μ



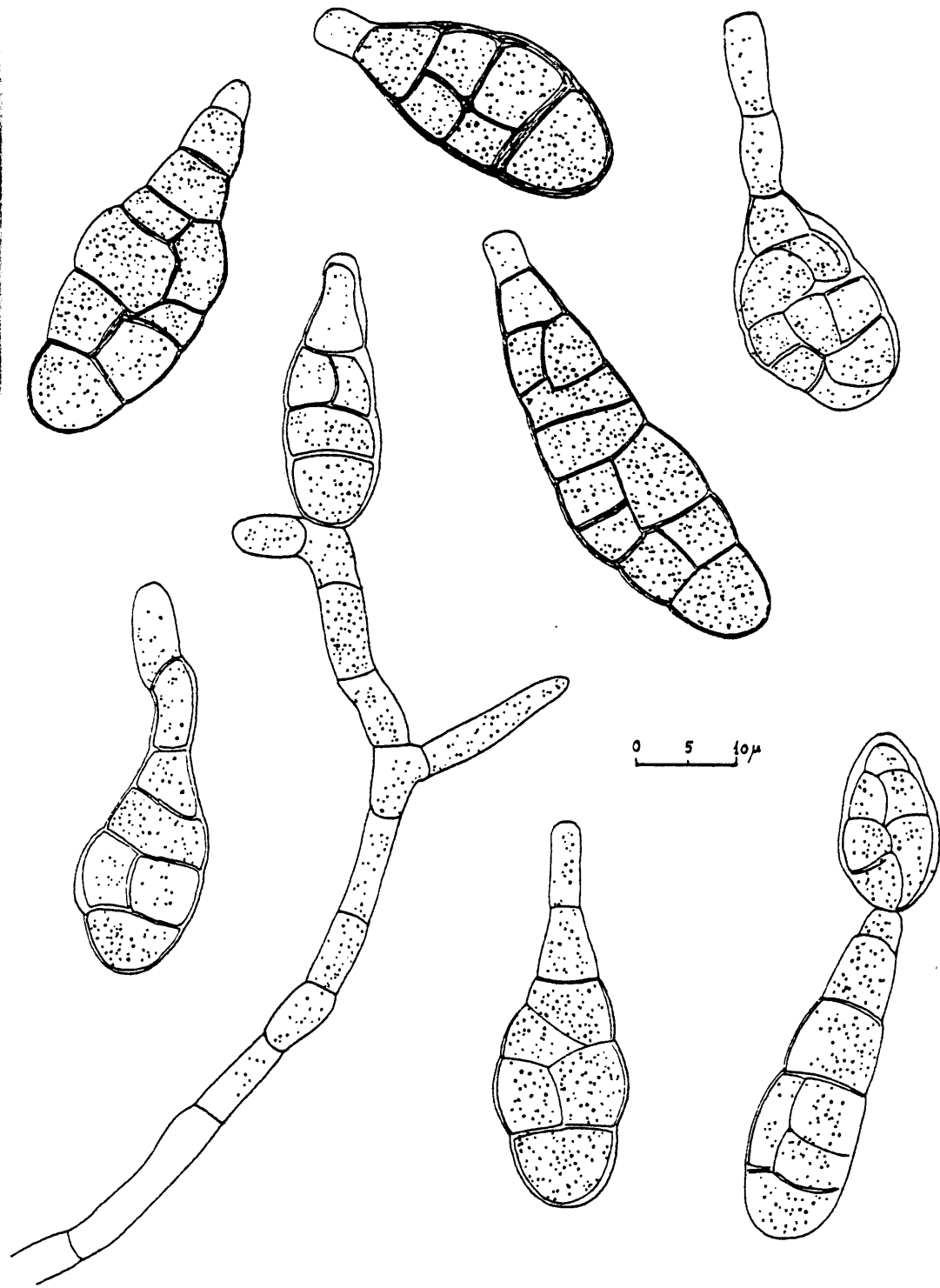
Alternaria tenuis Nees

Perteneciente a la Sección Claro-seminae, se /
caracteriza por presentar conidióforos de color claro, /
marrón amarillento, al igual que las esporas.

A partir del conidióforo pueden originarse /
una o varias cadenas de esporas, persistiendo las marcas
de los lugares de origen como claras cicatrices, tanto /
en el conidióforo como en las sucesivas esporas origina-
das.

Dictiosporas semejantes a las de A. tenuis, /
lisas o finamente verrugosas, aunque de tonalidad más /
clara.

A. tenuissima se ha citado como productora de
ác. tenuazoico (Cole y Cox, 1.981).



Alternaria tenuissima (Fr.) Wiltshire

Caracteriza a este género la presencia de conidióforos simples, erectos, con un hinchamiento o vesícula apical que porta las células esporógenas, fiálides, que producen conidios en forma de largas cadenas secas.

Frecuentemente, los conidióforos se originan a partir de una célula de pié bien desarrollada. La vesícula apical puede adoptar formas diversas (esférica, hemisférica, oval, alargada, clavada), y sobre ella se sustentan, bien directamente, bien sobre métulas, fiálides con forma de botella, ahusadas hacia el ápice, que, a su vez, originan fialosporas hialinas a oscuramente pigmentadas, globosas a elípticas, lisas, rugosas, espinosas o verrugosas.

Se trata de un género muy numeroso en especies y muchas de ellas están conceptuadas como productoras de micotoxinas.

En el presente estudio hemos aislado las siguientes especies: A. amstelodami, A. awamori, A. candidus, A. clavatus, A. chevalieri, A. ficuum, A. flavus, / A. flavus var. columnaris, A. fumigatus, A. melleus, A. nidulans, A. nidulans var. latus, A. niger, A. ochraeus, A. oryzae, A. oryzae var. effusus, A. parasiticus, A. / phoenicis, A. repens, A. sydowi, A. tamarisii, A. unguis, A. ustus, A. versicolor y A. wentii.

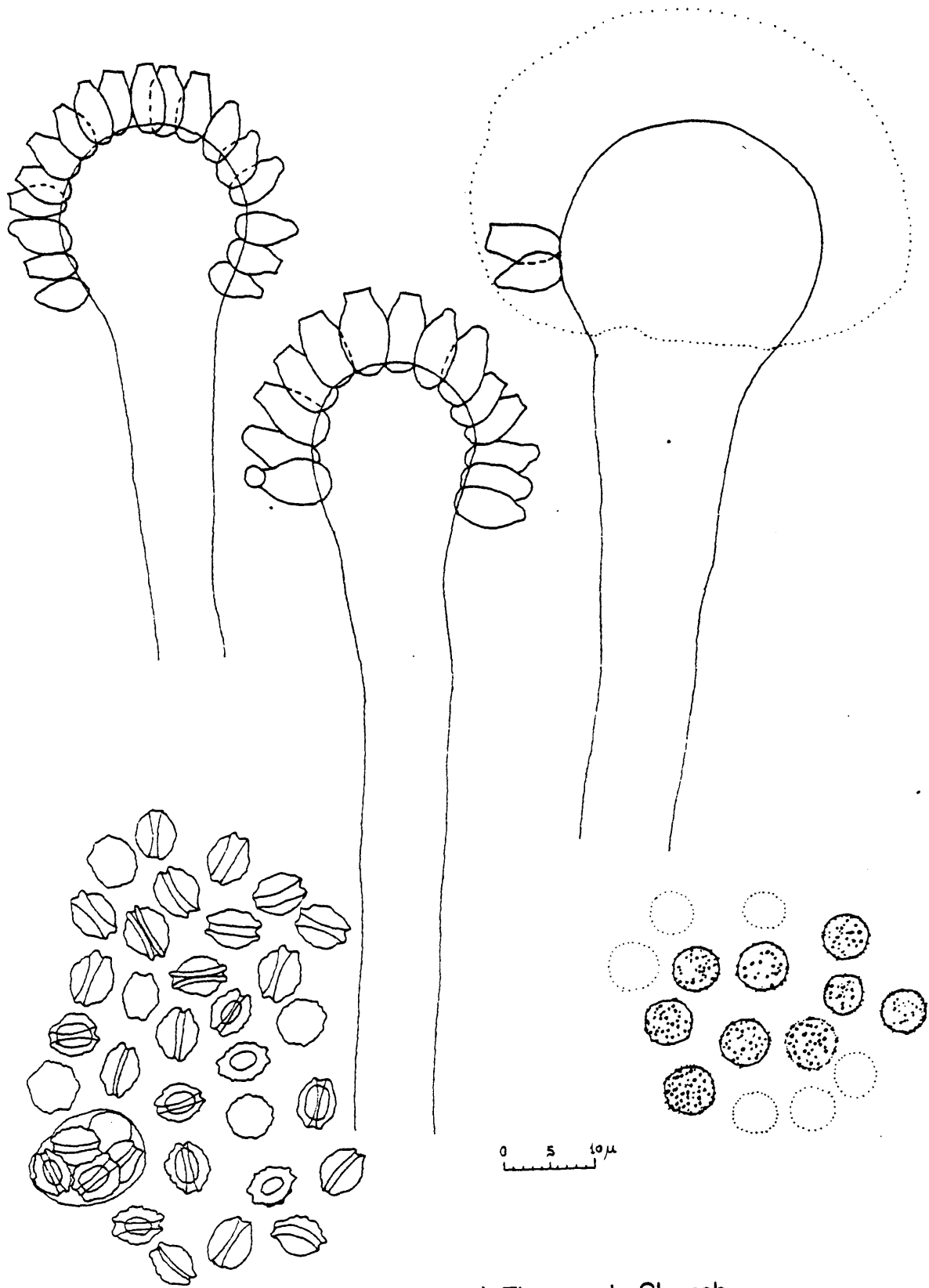
Colonias sobre Agar Solución de Czapek de crecimiento restringido, que alcanza alrededor de 3 cm. de diámetro en 14 d. a 25^o C., planas o arrugadas, por lo / general de color amarillo (al ser colonias predominantemente cleistoteciales) a verde-amarillo (al mezclarse / cabezas conidiales, cleistotecios e hifas estériles). Reverso incoloro a amarillento, volviéndose oscuro con la edad.

Colonias sobre Agar Solución de Czapek 20 % / Sacarosa más extendidas y de más rápido crecimiento, alcanzando diámetros superiores a 6-8 cm. en 14 d. a 25^o C. Color amarillo intenso, debido a la gran abundancia de / cleistotecios que forman una capa densa sobre la superficie del agar.

Ascosporas convexas, de superficies rugosas, sin crestas pero con un prominente surco en forma de V / flanqueado por rebordes irregulares.

Cabezas conidiales radiadas, uniseriadas, que portan conidios equinulados.

A. amstelodami ha sido citado como productor de micotoxinas tales como: equinulina, preequinulina, / neoequinulinas A, B, C, D y E, criptoequinulina A. (Cole y Cox, 1.981).



Aspergillus amstelodami (Mangin) Thom et Church

Colonias de crecimiento rápido sobre Agar Solución de Czapek, con micelio basal generalmente blanco o amarillo. Cabezas conidiales abundantes que adquieren rápidamente tonalidades marrón-rojizas. Reverso de la colonia en tonos similares.

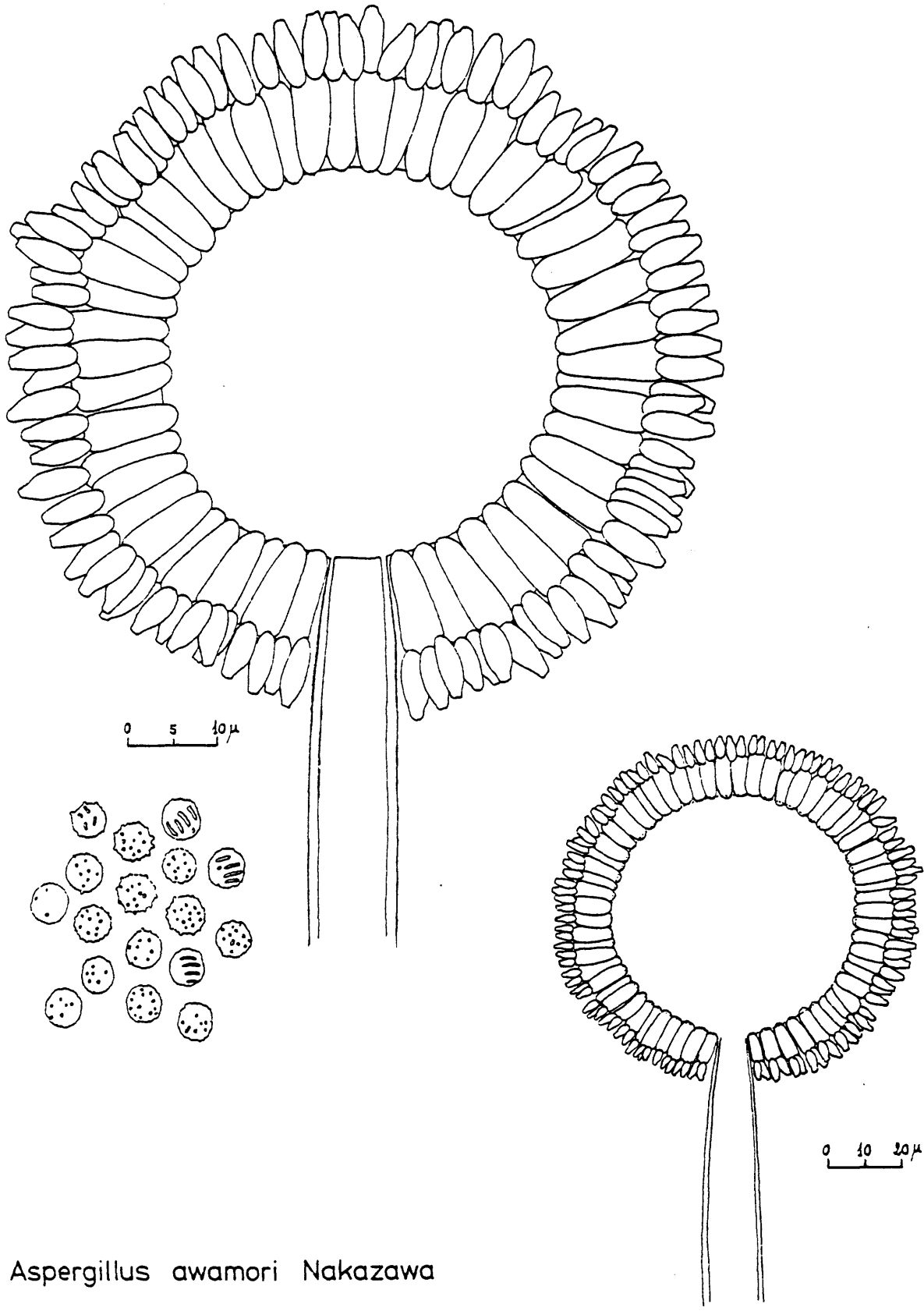
Conidióforos erectos, usualmente entre 1.0 y 1.5 mm. de longitud, lisos.

Vesículas globosas o casi, de tamaño variable, habitualmente entre 25 y 50 μm . de diámetro, aunque pueden alcanzar hasta 80 μm . de diámetro.

Cabezas biseriadas, con métulas de 10 a 20 / (40) μm . de longitud y fiálides de 5 a 10 μm .

Conidios entre 4 y 4.5 μm de diámetro, aunque oscilando entre 3.5 y 5 μm , desde casi lisos a muy rugosos, equinulados o con protuberancias coloreadas de hasta 1 μm . de longitud.

A. awamori ha sido citado como productor de malformina A₁, malformina B y ác. kojico, sustancias con ceptuadas como micotoxinas (Cole y Cox, 1.981).



Aspergillus awamori Nakazawa

Colonias de crecimiento lento sobre Agar Solución de Czapek (2-3 cm. de diámetro en 14 d. a 25^o C.), con cabezas conidiales persistentemente blancas o adquiriendo tonos que oscilan del crema al amarillento con la edad. Reverso incoloro a débilmente amarillento o rosado.

Conidióforos lisos, incoloros.

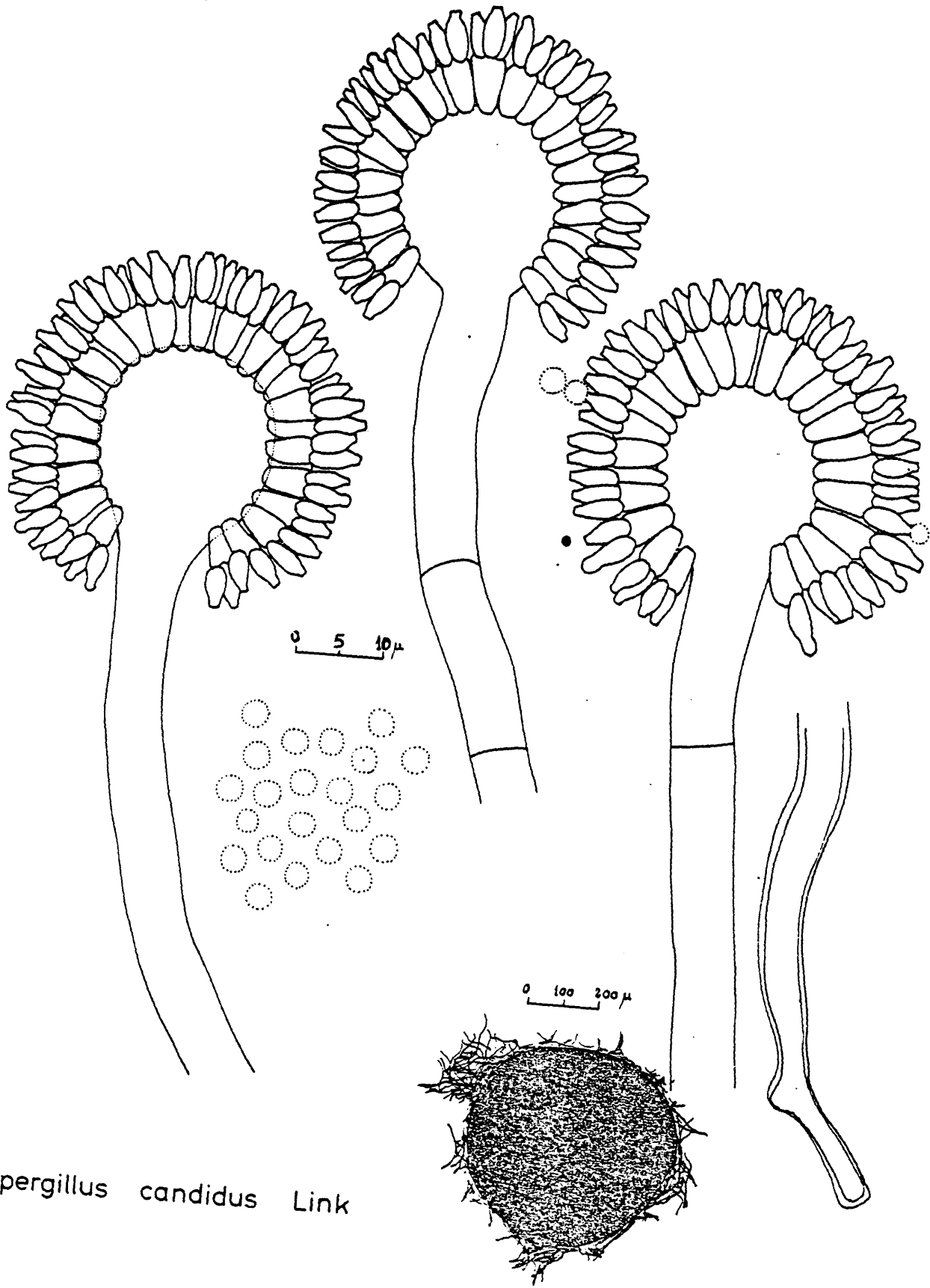
Vesículas globosas, fértiles sobre toda su superficie, con un diámetro de 10 a 40 μm .

Cabezas conidiales biseriadas, con m \acute{e} tulas de 5 a 15 (30) μm . de longitud, cuneiformes, y fiálides de 5 a 8 μm . de longitud.

Conidios globosos, de 2.5 a 4 μm . de diámetro.

En algunas cepas existen esclerocios, de color crema cuando jóvenes, que se vuelven púrpuras a negros cuando maduran.

Según datos recopilados por Cole y Cox, A. / candidus es capaz de producir micotoxinas como citrinina y ác. kojico. (1.981).



Aspergillus candidus Link

Colonias sobre Agar Solución de Czapek que alcanzan un diámetro de 3 a 3.5 cm. en 14 d. a 25° C., / fuertemente esporuladas. Cabezas conidiales grandes, clavadas, en tonos azul-verde a gris-azul-verde, uniseriadas.

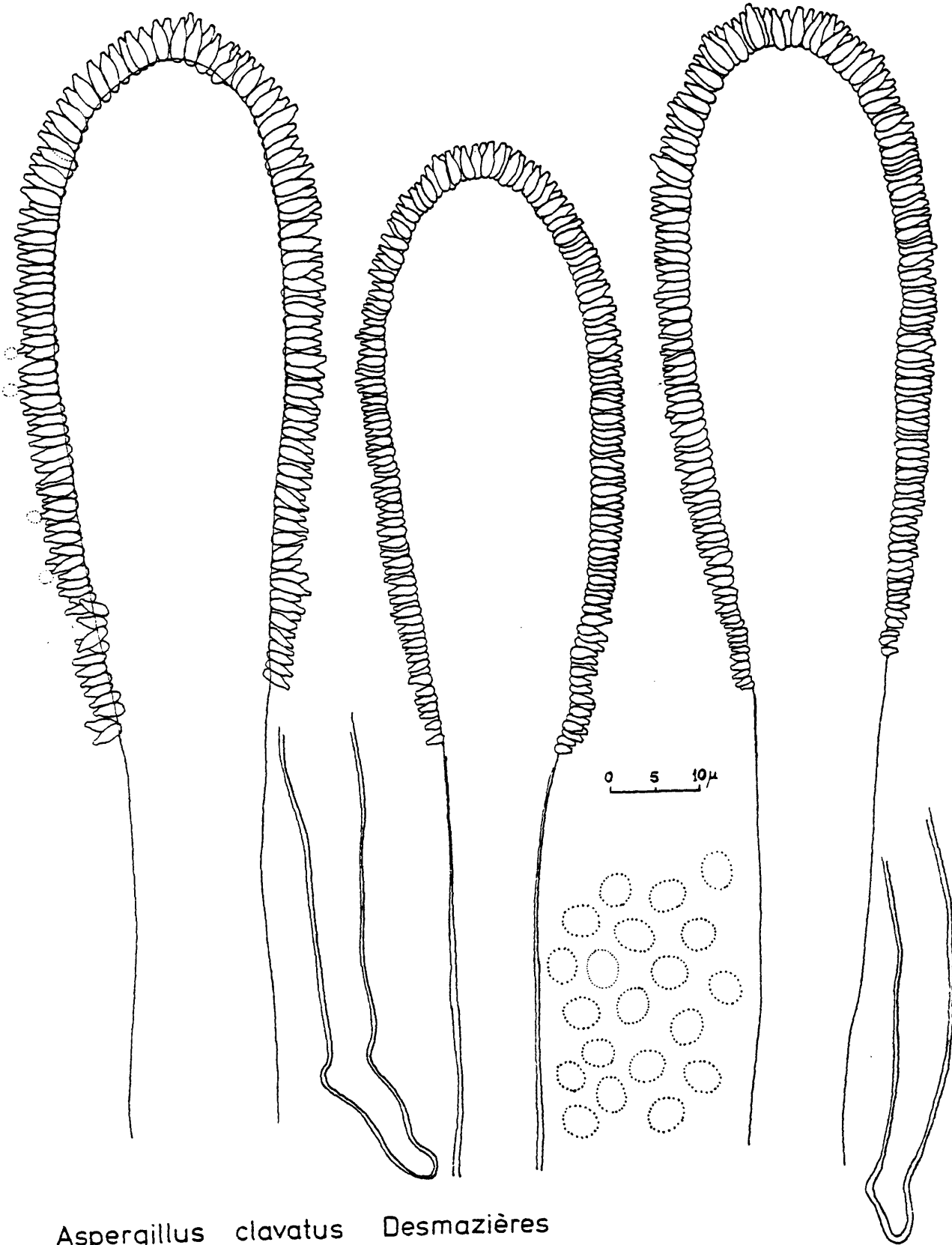
Conidióforos de 1.5 a 3 mm. de longitud, lisos, incoloros.

Vesículas clavadas, de 200 a 250 μm . de longitud por 40 a 60 μm ., o más, de anchura.

Fiálides de 2.5 a 3.5 μm . en la base de la vesícula y 7 a 10 μm . en su parte apical.

Conidios elípticos, lisos, de 3 a 3.5 μm ., o mayores.

A. clavatus ha sido citado repetidamente como productor de micotoxinas. Según datos de Cole y Cox (/ 1.981), es capaz de producir: citocalasina E, triptoquivalina, nortriptoquivalina, deoxitriptoquivalina, deoxinortriptoquivalina, nortriptoquivalona, deoxinortriptoquivalona, ascladiol, ác. kojico y patulina.



Aspergillus clavatus Desmazières

Colonias sobre Agar Solución de Czapek de crecimiento restringido (alrededor de 3 cm. de diámetro en 14 d. a 25° C), de color verde grisáceo en las áreas centrales debido al desarrollo de las cabezas conidiales. / Reverso amarillo anaranjado a marrón. -

Cabezas conidiales abundantes, radiadas.

Conidióforos finalizados en un ápice vesicular de 20-35 μm . de diámetro, que sustentan una sola serie de fiálides de 5 a 7 μm . de longitud.

Conidios ovales a elípticos, espinosos, usualmente de unas 5 μm . de diámetro mayor.

Cleistotecios amarillos, subglobosos.

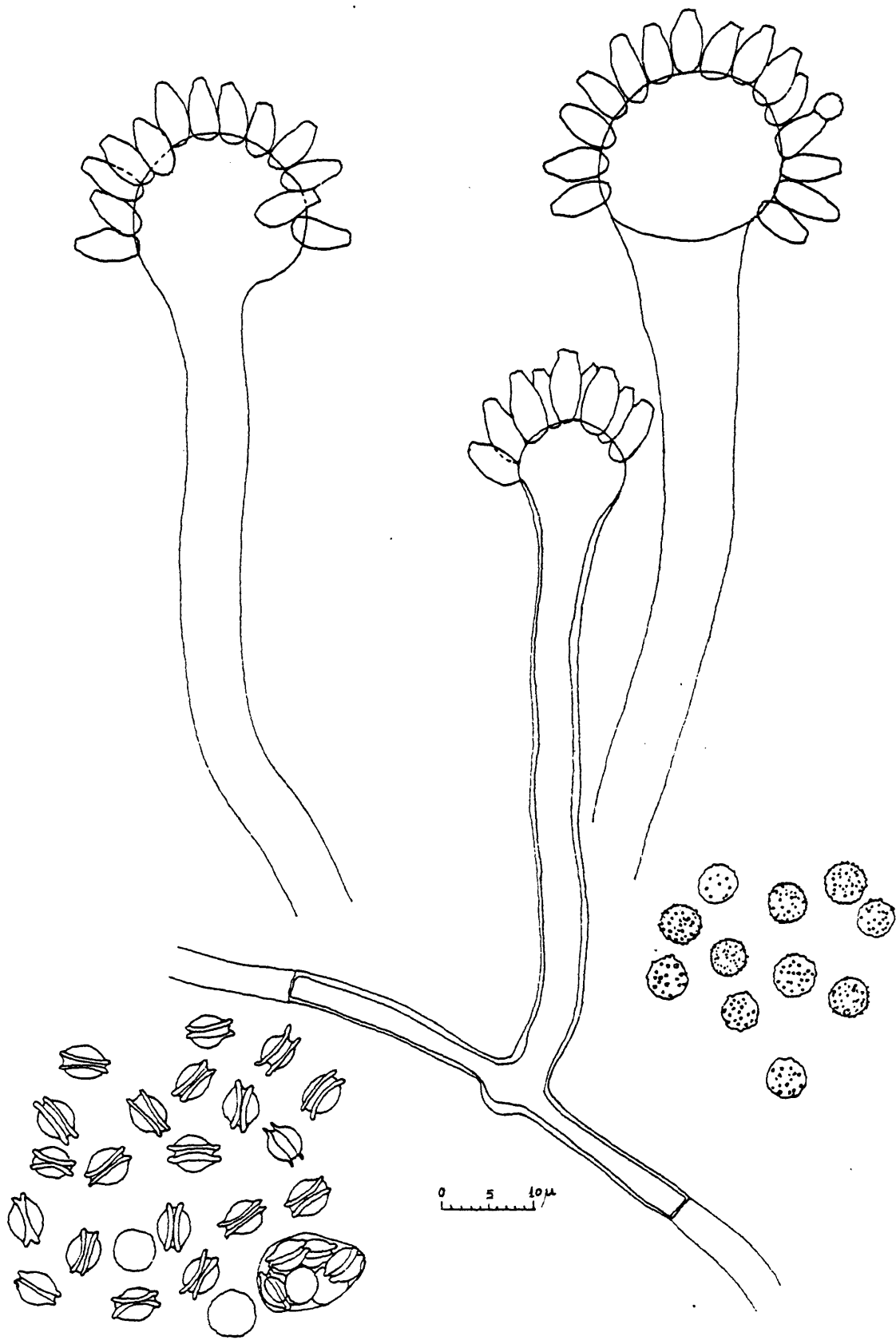
Ascas de 9-10 μm . de diámetro.

Ascosporas lenticulares de 4.5 a 5.5 μm . de diámetro, con crestas ecuatoriales delgadas y flexuosas que les confieren aspecto de polea. Lisas a ligeramente rugosas.

Sobre Agar Solución de Czapek 20 % Sacarosa, las colonias crecen más rápidamente, mostrando una capa continua de abundantes cleistotecios amarillos.

Según datos recopilados por Cole y Cox (1.981)

A. chevalieri es capaz de producir equinulina, preequinulina y gliotoxina, sustancias conceptuadas como micotoxinas.



Aspergillus chevalieri (Mangin) Thom et Church.

Colonias que se esparcen rápidamente sobre Agar Solución de Czapek, hasta superar los 4-5 cm. de diámetro en 14 d. a 25° C, densamente cubiertas por estructuras conidiales en tonos marrón-púrpura muy oscuro, que en masa parecen de color negro a simple vista.

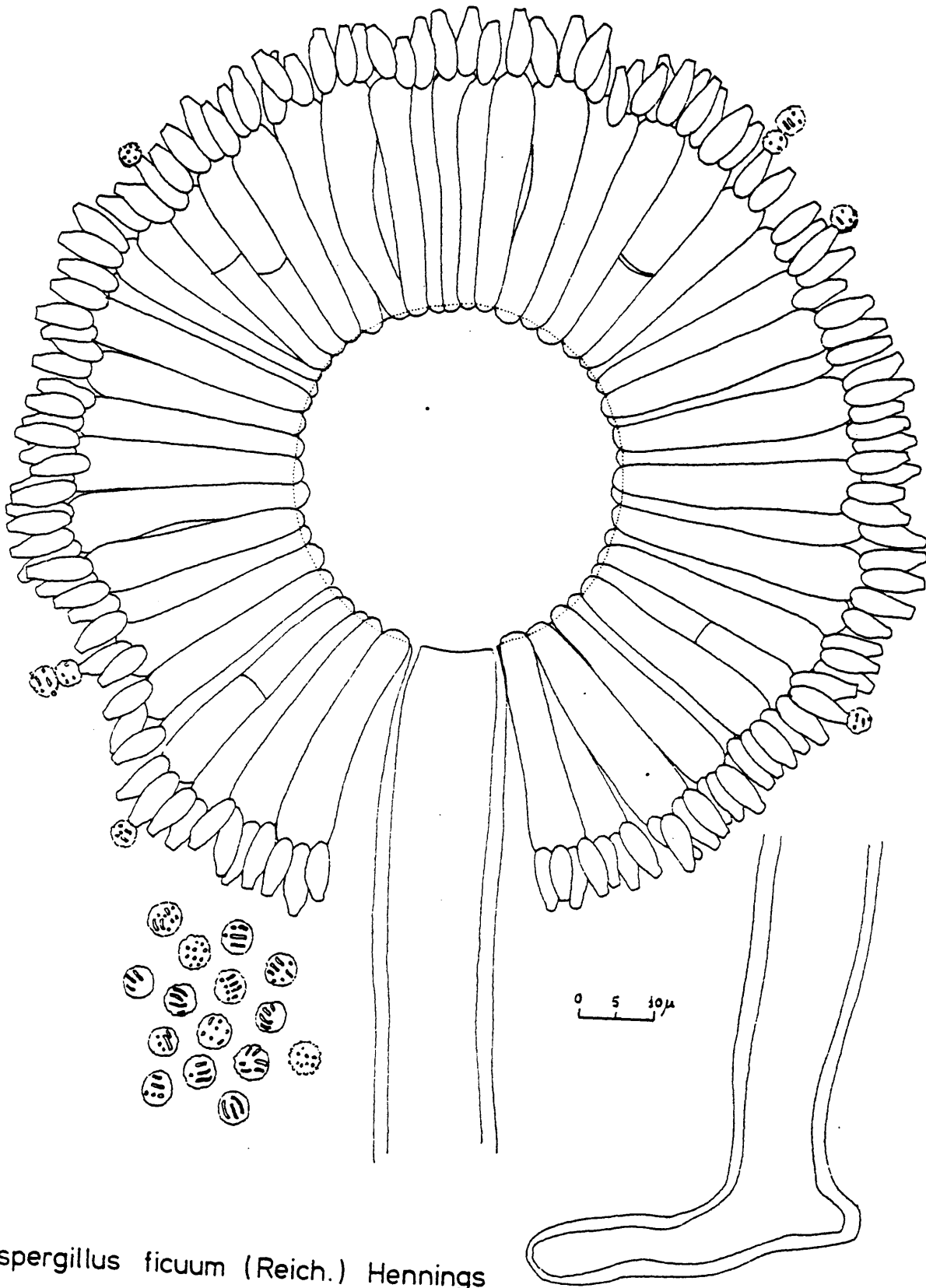
Conidióforos generalmente pigmentados en tonos de marrón, de paredes gruesas (2 a 4 $\mu\text{m}.$) y 1.0 a / 1.5 mm. de longitud por 15 a 25 $\mu\text{m}.$ de anchura, que se / reduce justo debajo de la vesícula a 10-15 $\mu\text{m}.$

Vesículas globosas de 45 a 55 $\mu\text{m}.$ de diámetro, aunque pueden oscilar entre 25 y 80 $\mu\text{m}.$, fértiles sobre toda su superficie.

Cabezas biseriadas, con métulas de (10) 20 a 40 (75) $\mu\text{m}.$ de longitud, pigmentadas en tonos marrón-rojizo, y fiálides de 7 a 10 $\mu\text{m}.$ de longitud.

Conidios globosos, rugosos, que en la madurez se vuelven estriados, de 3.5 a 4 $\mu\text{m}.$ de diámetro.

A partir de cultivos de A. ficuum se han aislado ciertas sustancias que se han conceptualizado como micotoxinas: malformina A₁ y malformina B (Cole y Cox, 1.981)



Aspergillus ficuum (Reich.) Hennings

Colonias sobre Agar Solución de Czapek que /
crecen con rapidez variable, alcanzando entre 3 y 6 cm.
de diámetro en 14 d. a 25^o C. Usualmente portan abundan-
tes estructuras conidiales que, en principio, son de co-
lor amarillo y, finalmente, adquieren un color verde in-
tenso, permaneciendo así en la madurez de los conidios.
Reverso generalmente incoloro a tonos rosados, y marrón-
rojizo oscuro en las cepas con gran cantidad de esclero-
cios. Estos aparecen en muchas cepas, y son globosos a /
subglobosos, variando de color desde el marrón rojizo os-
curo a casi negros.

Cabezas conidiales radiadas.

Conidióforos incoloros, de pared gruesa, suma-
mente rugosos.

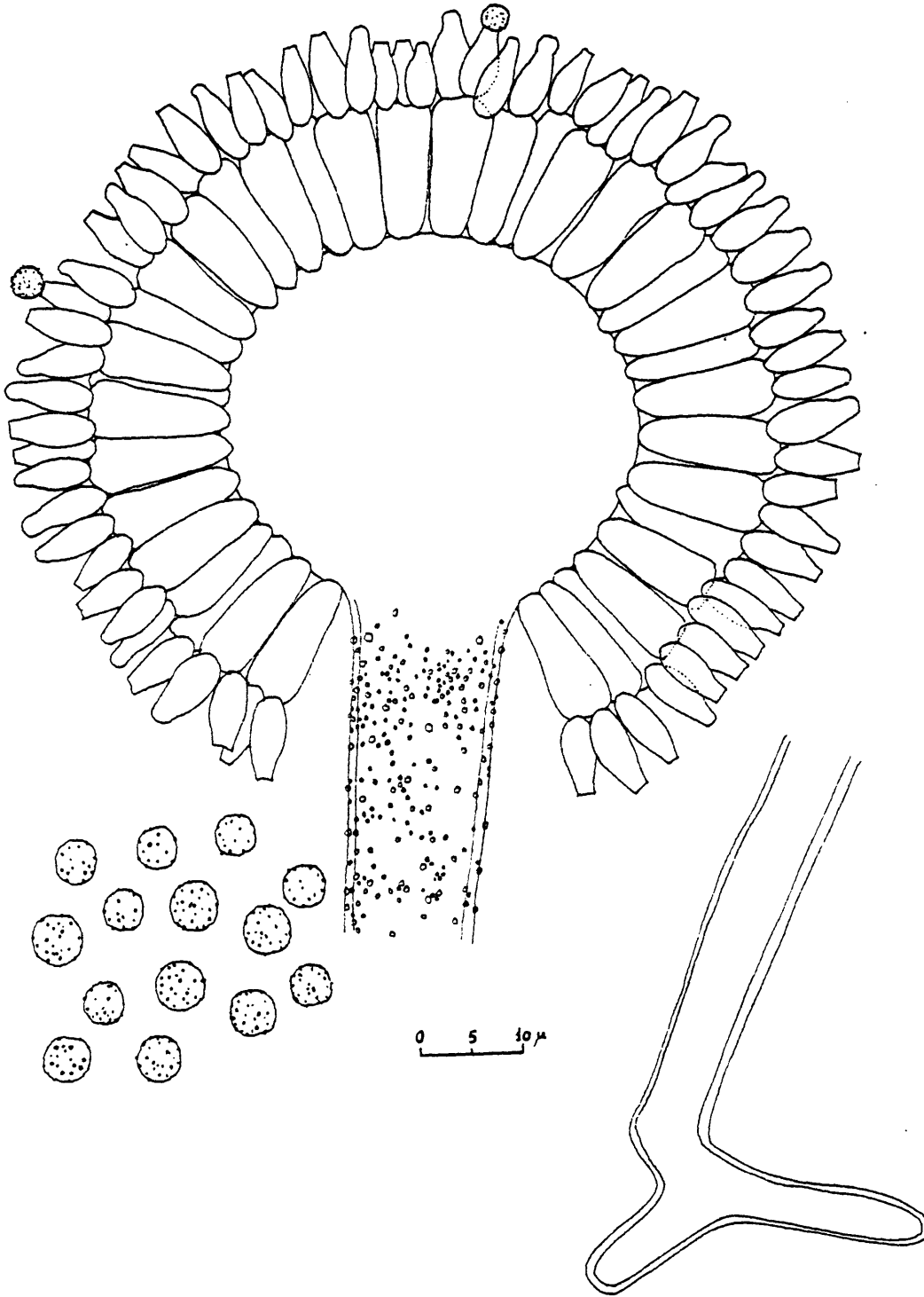
Vesículas alargadas cuando jóvenes, que más /
tarde se vuelven subglobosas a globosas, de hasta 70 μ m.
de diámetro mayor.

Cabezas conidiales uniseriadas o biseriadas.
Métulas y fiálides frecuentemente hinchadas, de dimensio-
nes variables.

Conidios globosos, equinulados, de 3 a 6 μ m.
de diámetro, aunque usualmente miden entre 3.5 y 4.5 μ m.,
a veces elípticos en el momento de su formación.

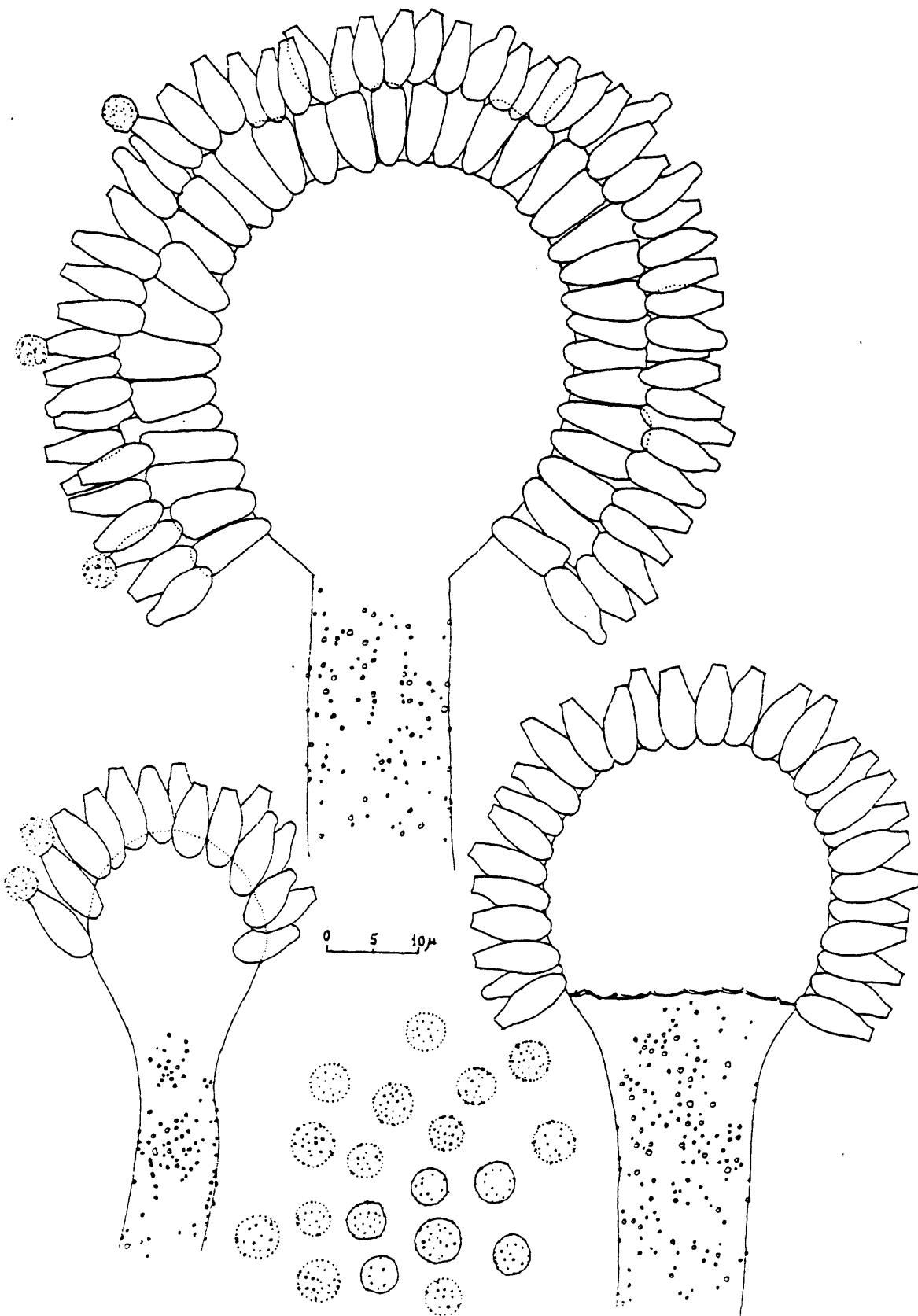
A. flavus es una de las especies de Aspergi--

toxinas. Según datos recopilados por Cole y Cox (1.981), entre las sustancias de este tipo aisladas a partir de / cultivos de A. flavus, podemos citar: Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, B_{2a}, G_{2a}, parasiticol (= aflatoxina B₃), esterigmatocistina, O-metilesterigmatocistina, dihidro-- O-metilesterigmatocistina, versiconal hemiacetal acetato, aflatrem, ác. ciclopiazónico, ác. β -nitropropiónico, ác. kójico, aspertoxina, ác. aspergíllico.



Aspergillus flavus Link

Presenta características análogas a las ya /
descritas para A. flavus, del que difiere principalmente
en la presencia constante, sobre Agar Solución de Czapek,
de cabezas conidiales predominantemente columnares, casi
enteramente uniseriadas. Los conidióforos, por último, /
suelen ser algo menos rugosos que los observados en A. /
flavus.



Aspergillus flavus Link var. *columnaris*
Raper et Fennell

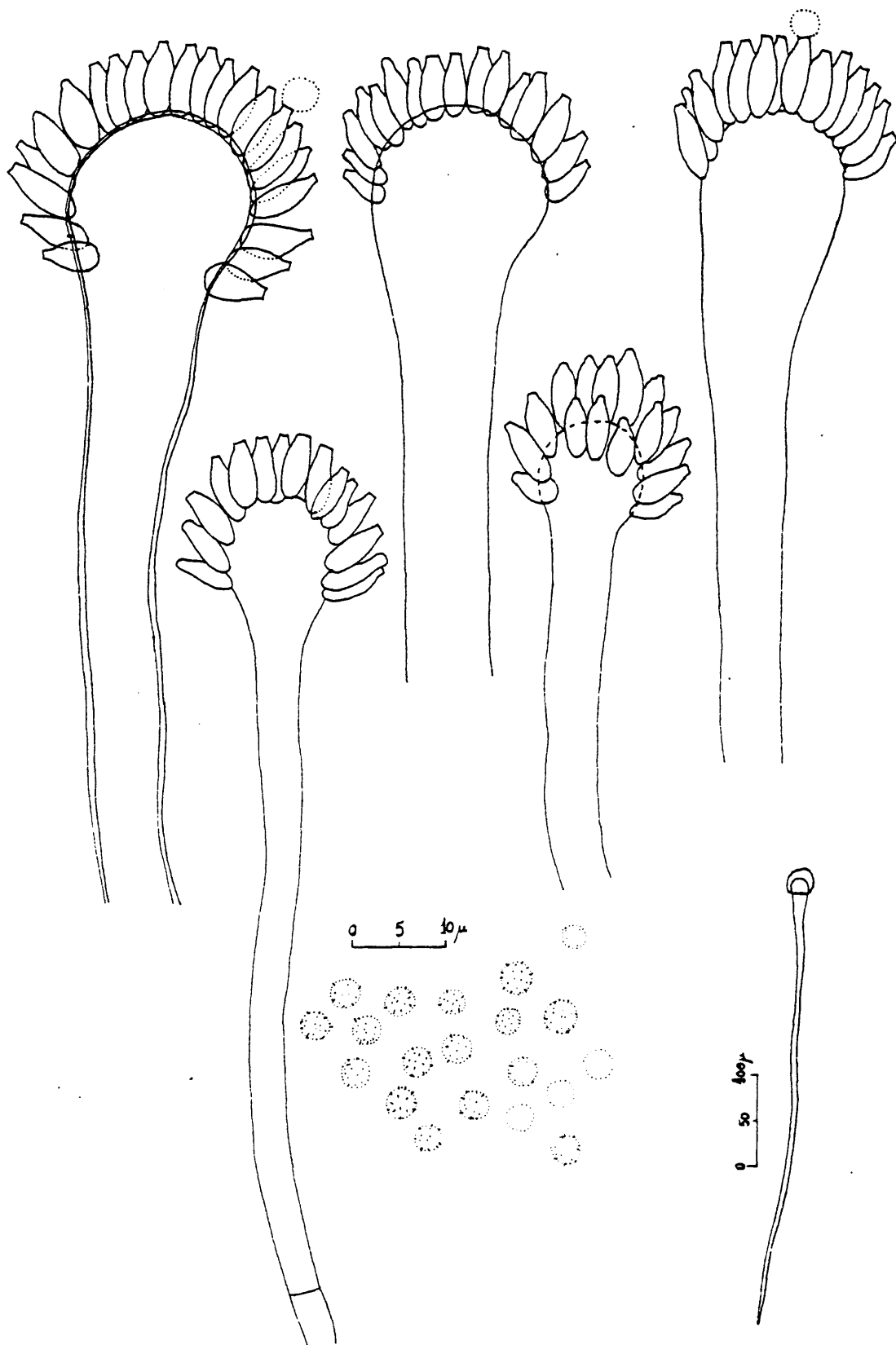
Colonias sobre Agar Solución de Czapek de cre-
cimiento rápido, extendiéndose prácticamente por toda la
superficie del agar en 14 d. a 25° C. Estructuras conidi-
diales en gran número, distinguiéndose cabezas conidia-
les columnares de color verde oscuro, uniseriadas.

Conidióforos cortos (menores de 500 μm . de /
longitud), lisos, de 5 a 9 μm . de anchura, por lo gene-
ral coloreados de verde, especialmente en su parte supe-
rior, engrosada en una vesícula terminal de 20 a 30 μm .
de diámetro, a menudo coloreada como los conidióforos.

Fiálides apretadas que recubren prácticamente
la totalidad de la vesícula, coloreadas también de verde,
de (5) 6 a 8 (10) μm . de longitud.

Conidios globosos, equinulados, de 2.5 a 3.5
 μm . de diámetro.

Además de su potencial poder patógeno, A. fu-
migatus es una especie ampliamente reconocida como pro-
ductora de micotoxinas. En datos recopilados por Cole y
Cox (1.981), se atribuye a esta especie la capacidad de
producir: fumitremorginas A, B y C, verruculógeno, toxi-
na TR-2, triptoquivalinas E, F, G, H, I, J, L, M y N, /
nortriptoquivalina, fumigaclavinas A, B y C, gliotoxina,
ác. kójico, fumigatina, espinulosina, ác. helvólico y fu-
magillina.



Aspergillus fumigatus Fresenius

Colonias que sobre Agar Solución de Czapek alcanzan un diámetro de alrededor de 3.5 cm. en 14 d. a / 25° C, con cabezas conidiales en tonos crema-amarillento, ante u ocre. Reverso en tonos rosado-rojizos.

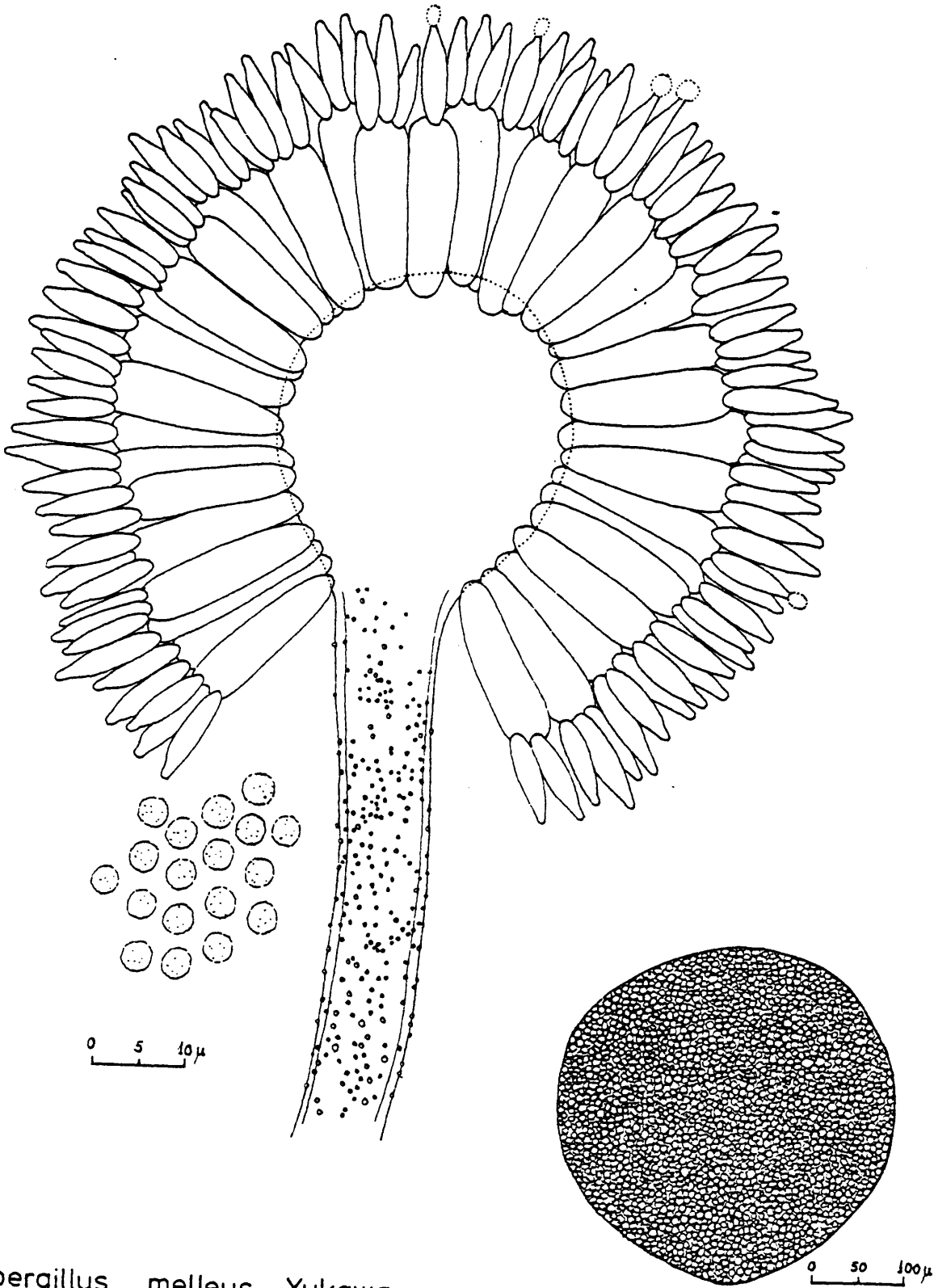
La mayoría de las cepas producen esclerocios blanquecinos a color ocre o marrón, generalmente abundantes y de pequeño tamaño (400 a 500 μm .).

Conidióforos rugosos, pigmentados en tonos de amarillo.

Vesículas globosas, fértiles sobre toda su superficie, biseriadas, con m \acute{e} tulas de hasta 20 μm . de longitud y fiálides de 9 a 12 μm . de longitud.

Conidios subglobosos, de hasta 3.5 μm . de diámetro, lisos a levemente rugosos o suavemente espinosos.

Según datos recopilados por Cole y Cox (1.981) A. melleus es capaz de producir diversas micotoxinas: ocratoxina A, melleína, ác. penicílico, xantomegnina, viomelleína, rubrosulfina, viopurpurina.



Aspergillus melleus Yukawa

Colonias sobre Agar Solución de Czapek que alcanzan extensiones superiores a los 4 cm. de diámetro en 14 d. a 25° C, de color variable (verde a crema o amarillo), según la presencia de cabezas conidiales (verdes), micelio estéril (crema o pardo) o cleistotecios (amarillos). Reverso en tonos rojo a púrpura, tonalidades que se extienden por el agar circundante volviéndose más intensas y oscuras con la edad del cultivo.

Cabezas conidiales típicamente formando cortas columnas de color verde.

Conidióforos pigmentados en tonos canela a violeta claro, lisos, cortos (en general, no superan las 150 μm . de longitud, y en muchos casos no alcanzan las 100 μm .), con células de pié claramente distinguibles.

Vesículas apicales de 8 a 12 μm . de diámetro.

Cabezas biseriadas, con métulas y fiálides de longitudes semejantes: 5 a 8 μm .

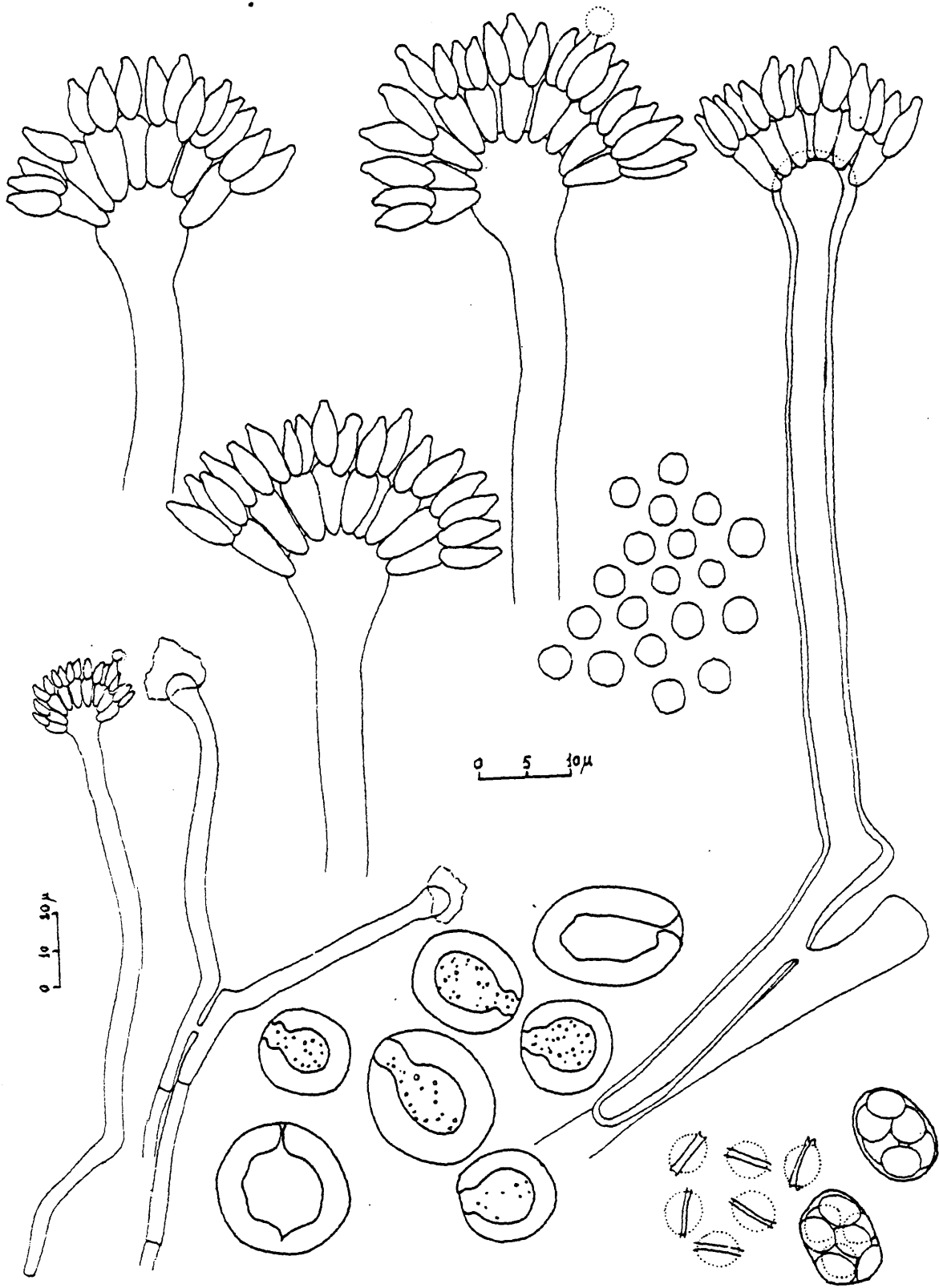
Conidios globosos, de 2.5 a 4 μm . de diámetro, levemente rugosos.

Cleistotecios que en ocasiones pueden tardar entre 15 y 30 días en aparecer y madurar en los cultivos, generalmente de color amarillo.

Ascas de alrededor de 11 μm . de diámetro mayor, que contienen 8 ascosporas.

tas ecuatoriales que no exceden de 2 μm . de anchura (entre 0.5 y 1.5 μm .) y de superficie lisa. El cuerpo de / las ascosporas alcanza entre 4 y 5 μm . de diámetro.

A. nidulans ha sido citado como productor de diversas micotoxinas (Cole y Cox, 1.981): esterigmatocistina, nidurufina, ác. kójico.

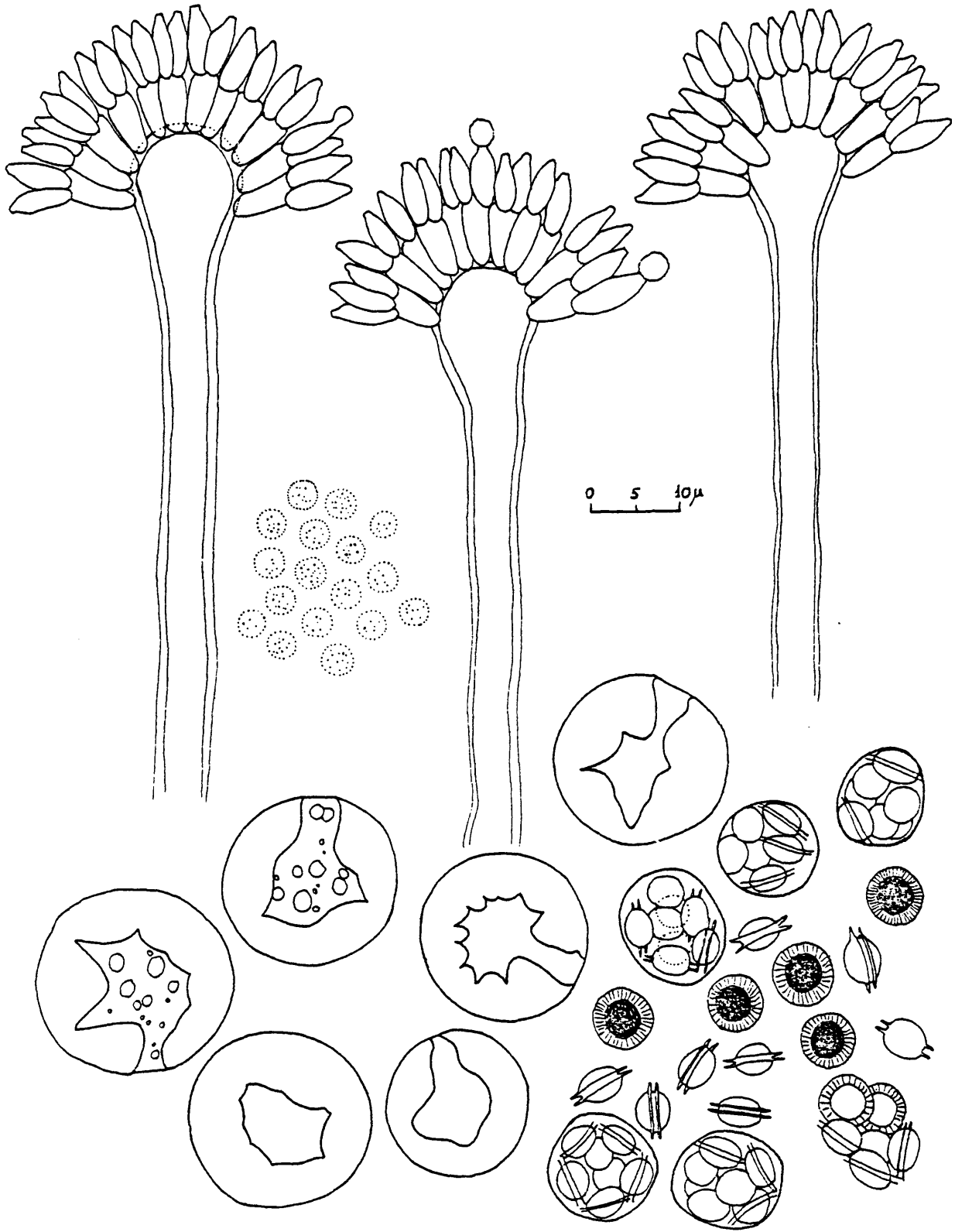


Aspergillus nidulans (Eidam) Wint.

De características muy próximas a A. nidulans, se distingue de él por la presencia de ascosporas de color rojo-púrpura, lenticulares, con crestas ecuatoriales de anchura superior a 1.4 μ m (aunque sin exceder de 2), estriadas, que les confieren una particular apariencia.

Cleistotecios rodeados por espesas masas de / células de Hülle, grandes, globosas, de pared sumamente gruesa.

La reproducción asexual aparece con menor intensidad que en los cultivos de A. nidulans, con un menor número de cabezas conidiales, análogas, por otra parte, a las descritas para A. nidulans. Conidios algo más rugosos e incluso levemente espinosos.



Aspergillus nidulans (Eidam) Wint. var. *latus* Thom et Raper

Colonias sobre Agar Solución de Czapek alcanzando un diámetro de hasta 3-3.5 cm. en 14 d. a 25° C / (crecen, pues, más restringidamente que A. ficuum). Micelio basal blanco o amarillo claro. Reverso incoloro a / suavemente amarillo. Estructuras reproductoras numerosas que cubren por completo la superficie de la colonia.

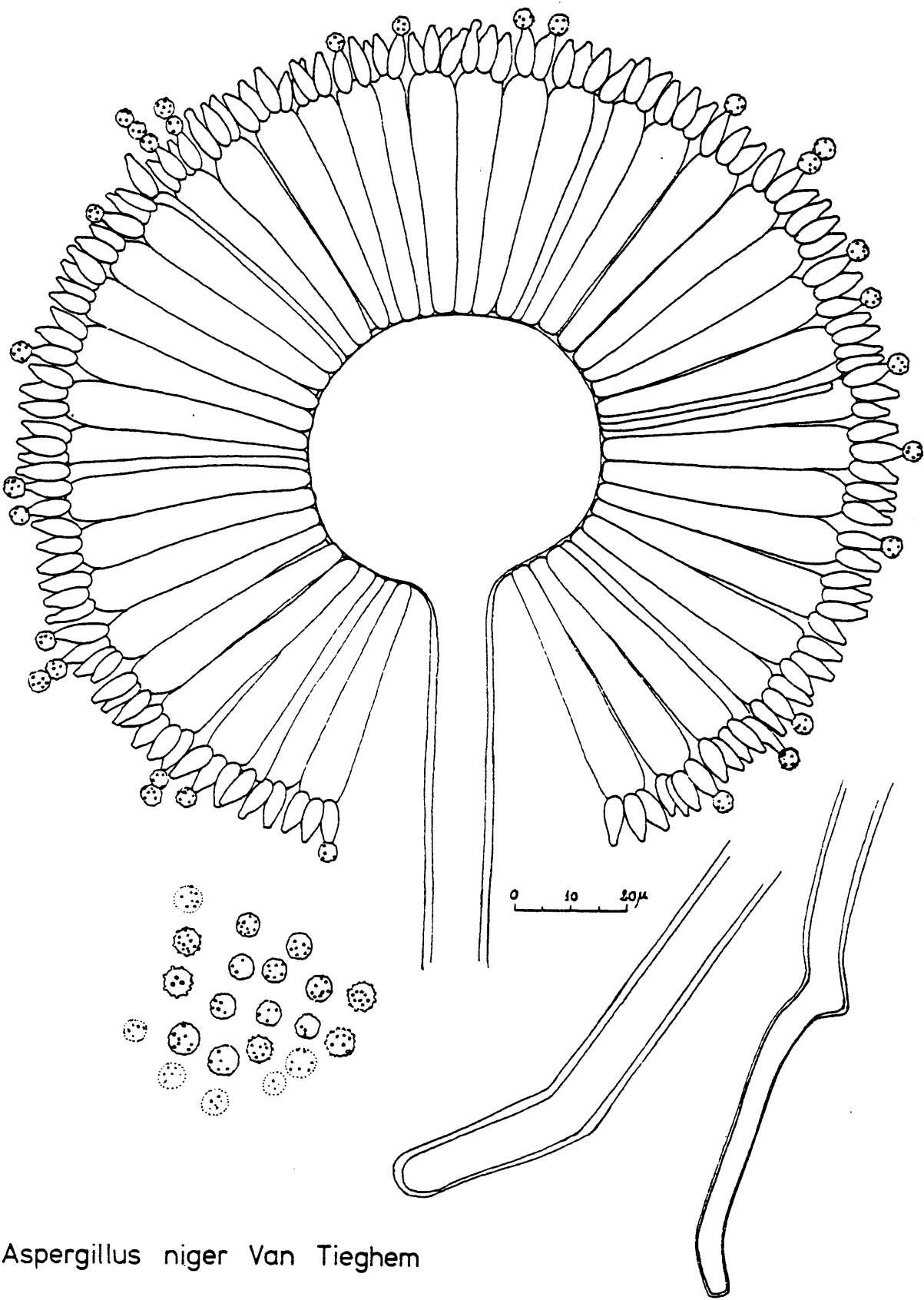
Cabezas conidiales de color negro ~~carbón~~ a simple vista, en ocasiones negro-rojizo, radiadas, globosas. Frecuentemente, las cabezas conidiales se escinden con / la edad en columnas bien definidas.

Conidióforos que no exceden de 4 mm. de longitud, lisos, de paredes gruesas (hasta de 2.5 μ m. de espesor), incoloros o teñidos de marrón-rojizo, preferente-- mente en su parte superior.

Vesículas globosas, usualmente de 50 a 65 μ m. de diámetro, que sustentan métulas de longitud variable según el tamaño de la cabeza (entre 25 y 45 μ m., generalmente). Fiálides de 8 a 10 μ m. de longitud.

Conidios globosos en la madurez, de 4 a 5 μ m. de diámetro, irregularmente rugosos, con conspicuos re-- bordes y equinulaciones no dispuestos como estrías longitudinales (a diferencia de A. phoenicis).

A. niger ha sido citado como productor de nigragillina y malforminas A₁, A₂, B y C (Cole y Cox, 1.981).



Aspergillus niger Van Tieghem

Colonias sobre Agar Solución de Czapek que alcanzan un diámetro de 3 a 4 cm. en 14 d. a 25° C, planas, más o menos zonadas en círculos concéntricos. Estructuras conidiales abundantes, en tonos crema-amarillento, / ante u ocre. Reverso de la colonia en tonos marrones más o menos oscuros a púrpura-rojizo.

La mayoría de las cepas producen esclerocios dispersos, desarrollados tardíamente, globosos a ovales, de tamaño comprendido entre 500 y 1000 μm ., en tonos rosa a púrpura-vináceo cuando maduran.

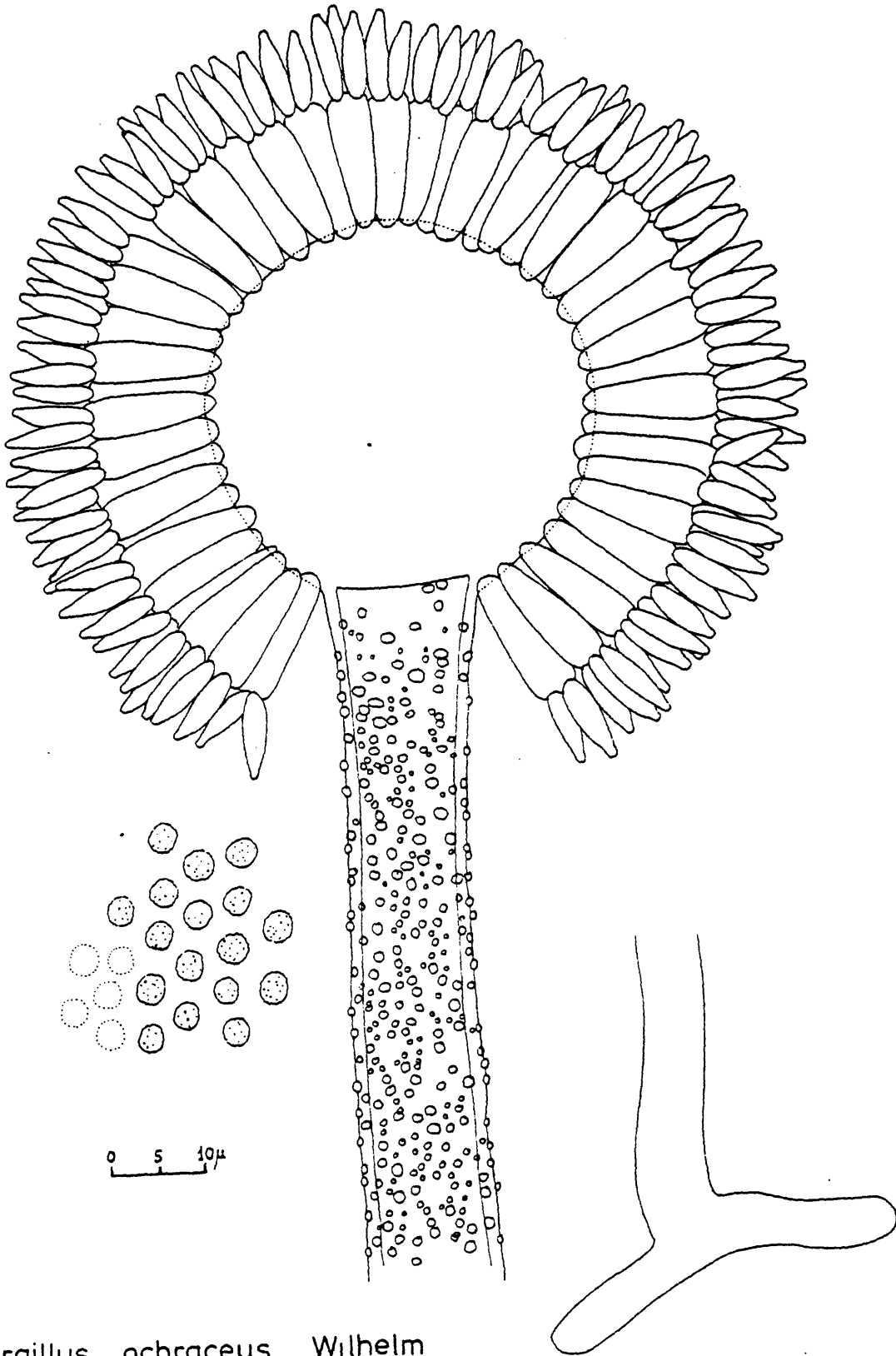
Conidióforos por lo general de hasta 1.5 mm. de longitud por 12-14 μm . de anchura, coloreados de amarillo oscuro a tonos marrón, intensamente rugosos a verrugosos.

Vesículas globosas, generalmente de unas 40 / μm . de diámetro.

Cabezas conidiales biseriadas, con métulas de 13 a 15 μm . y fiálides de 8 a 10 μm . de longitud.

Conidios subglobosos, de 2.5 a 3.0 μm . de diámetro en su mayoría, rugosos o levemente espinosos.

A. ochraceus es una especie reconocida como / productora de un gran número de micotoxinas (Cole y Cox, 1.981): melleína, 4-hidroximelleína, ocratoxinas A, B y C (=etil éster A), ác. penicílico, ác. secalónico A, emodina, xantomegnina, viomelleína.



Aspergillus ochraceus Wilhelm

Colonias sobre Agar Solución de Czapek de crecimiento rápido, alcanzando 5-6 cm. de diámetro, o más, en 14 d. a 25° C. Estructuras conidiales abundantes, en tonos amarillo-verdosos cuando jóvenes que típicamente / cambian a tonos de marrón claro o intenso con la edad / del cultivo. Reverso de las colonias incoloro.

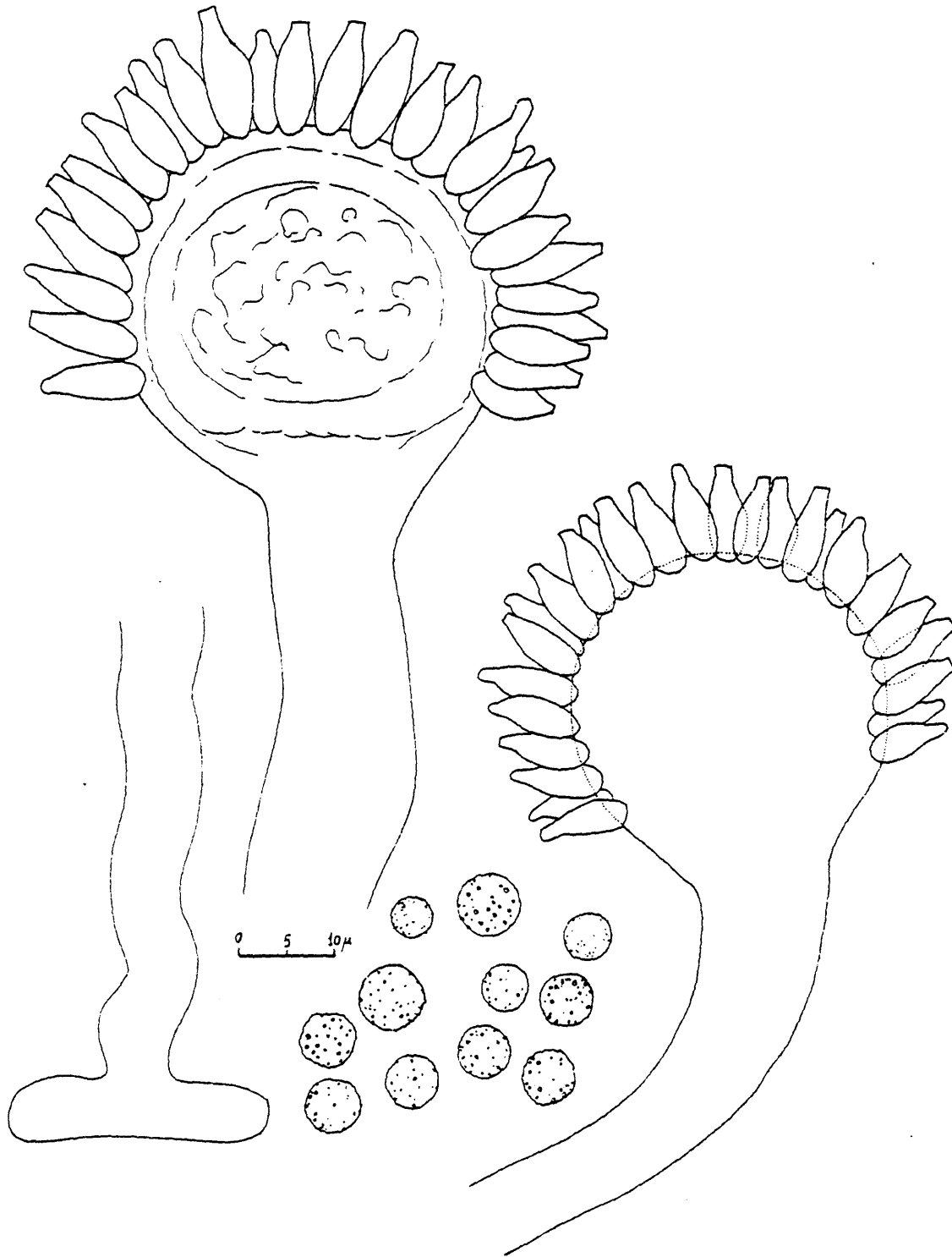
Cabezas conidiales radiadas.

Conidióforos largos (hasta de 5 mm. de longitud) que surgen del micelio sumergido, bastante más anchos debajo de la vesícula que en la base, de paredes rugosas.

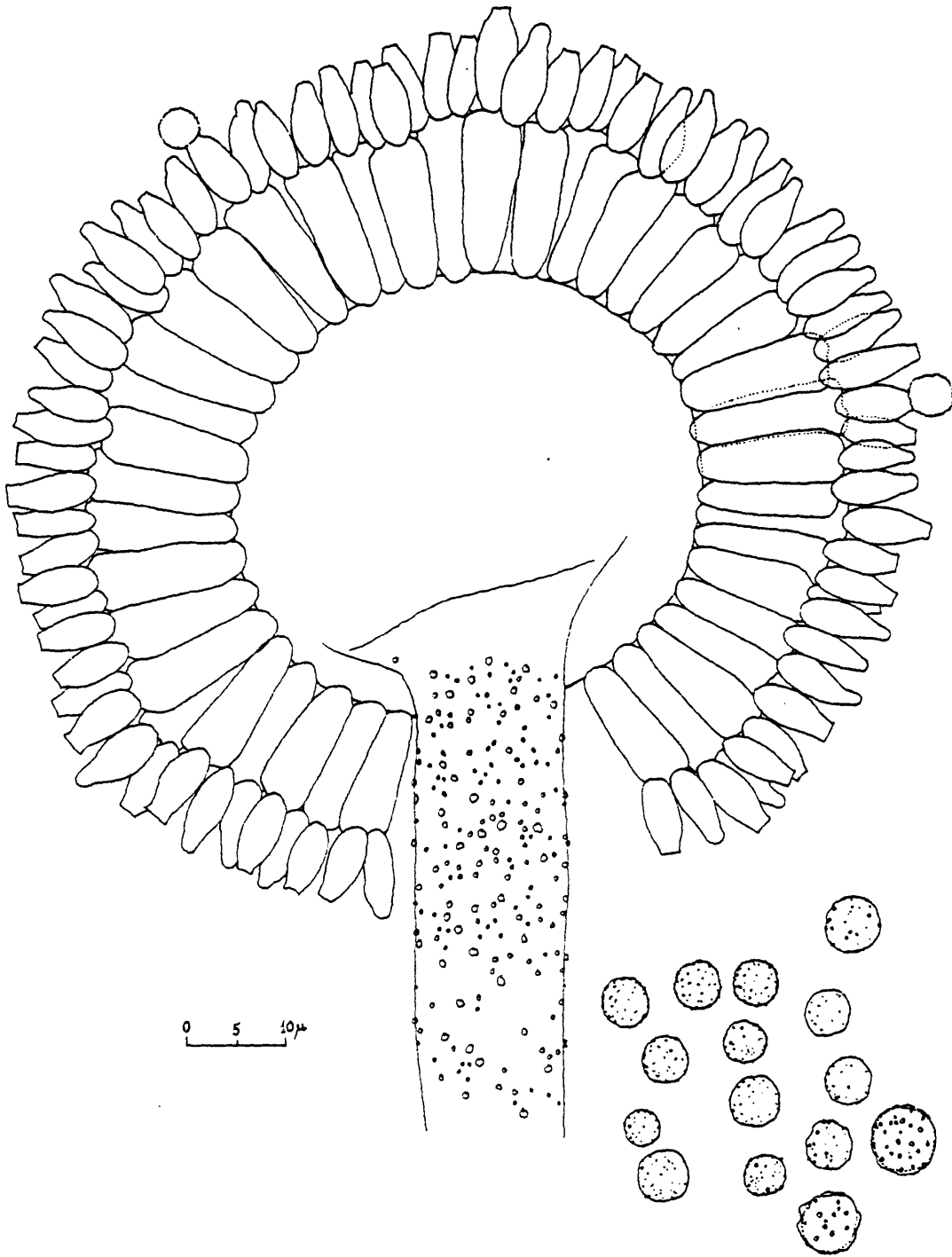
Vesículas globosas, usualmente de hasta 40 μm . de diámetro, en ocasiones mayores, que sustentan generalmente una sola serie de fiálides de 8-10 μm . de longitud. Algunas cepas presentan también cabezas conidiales biseriadas, con vesículas mayores (hasta 50-60 μm .) que sustentan mètulas de aproximadamente 15 μm . de longitud y / fiálides de 8-10 μm .

Conidios grandes, la mayoría entre 4 y 5.5 μm . de diámetro, pero pudiendo observarse conidios de hasta 8-10 μm ., inicialmente elípticos, luego globosos a subglobosos, lisos a irregularmente rugosos, según cepas.

A. oryzae ha sido citado como productor de ác. β -nitropropiónico y ác. kójico (Cole y Cox, 1.981).



Aspergillus oryzae (Ahlb.) Cohn
Uniseriado

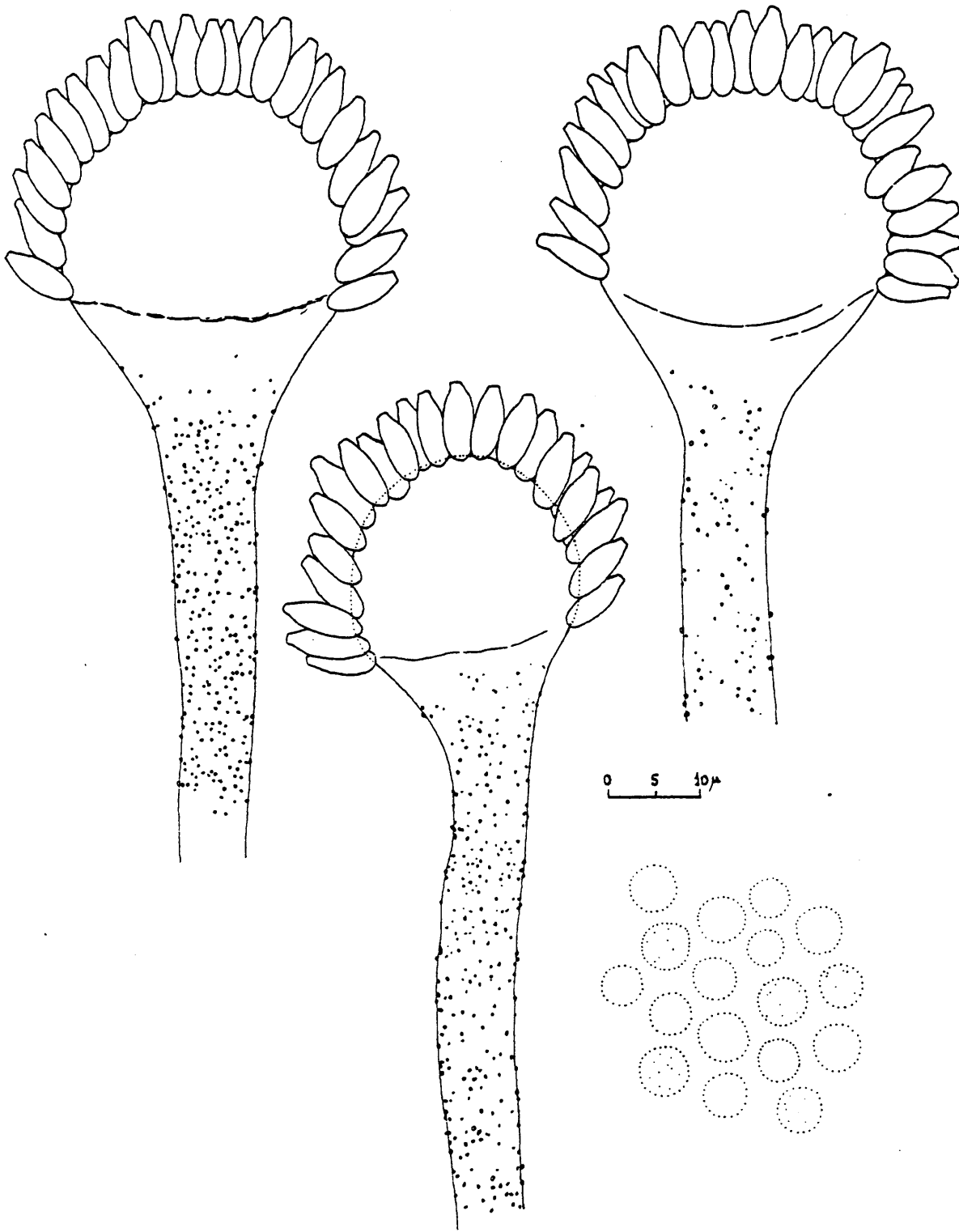


Aspergillus oryzae (Ahlb.) Cohn
Biseriado

Las características de esta variedad son en /
general análogas a las de A. oryzae, del que se distin--
gue por su crecimiento sumamente floccoso sobre Agar Solu
ción de Czapek, y la aparición de conidióforos nacidos /
en gran número como cortas ramas de las hifas aéreas, /
con vesículas relativamente pequeñas (hasta 35-40 μ m.) /
que sustentan por lo general una sola serie de fiálides.

Conidios globosos, usualmente de 3.5 a 5.5 μ m.
lisos o casi.

-----0-----



Aspergillus oryzae (Ahlb.) Cohn var. *effusus* (Tira.) Ohara

Colonias que alcanzan, sobre Agar Solución de Czapek, hasta 3-5 cm. de diámetro en 14 d. a 25° C, fuertemente esporuladas, con cabezas conidiales en tonos amarillo a verde amarillento cuando jóvenes, conservando el color verde en la madurez del cultivo y no cambiando a marrón (a semejanza de A. flavus y a diferencia de A. ory--zae).

Cabezas conidiales radiadas.

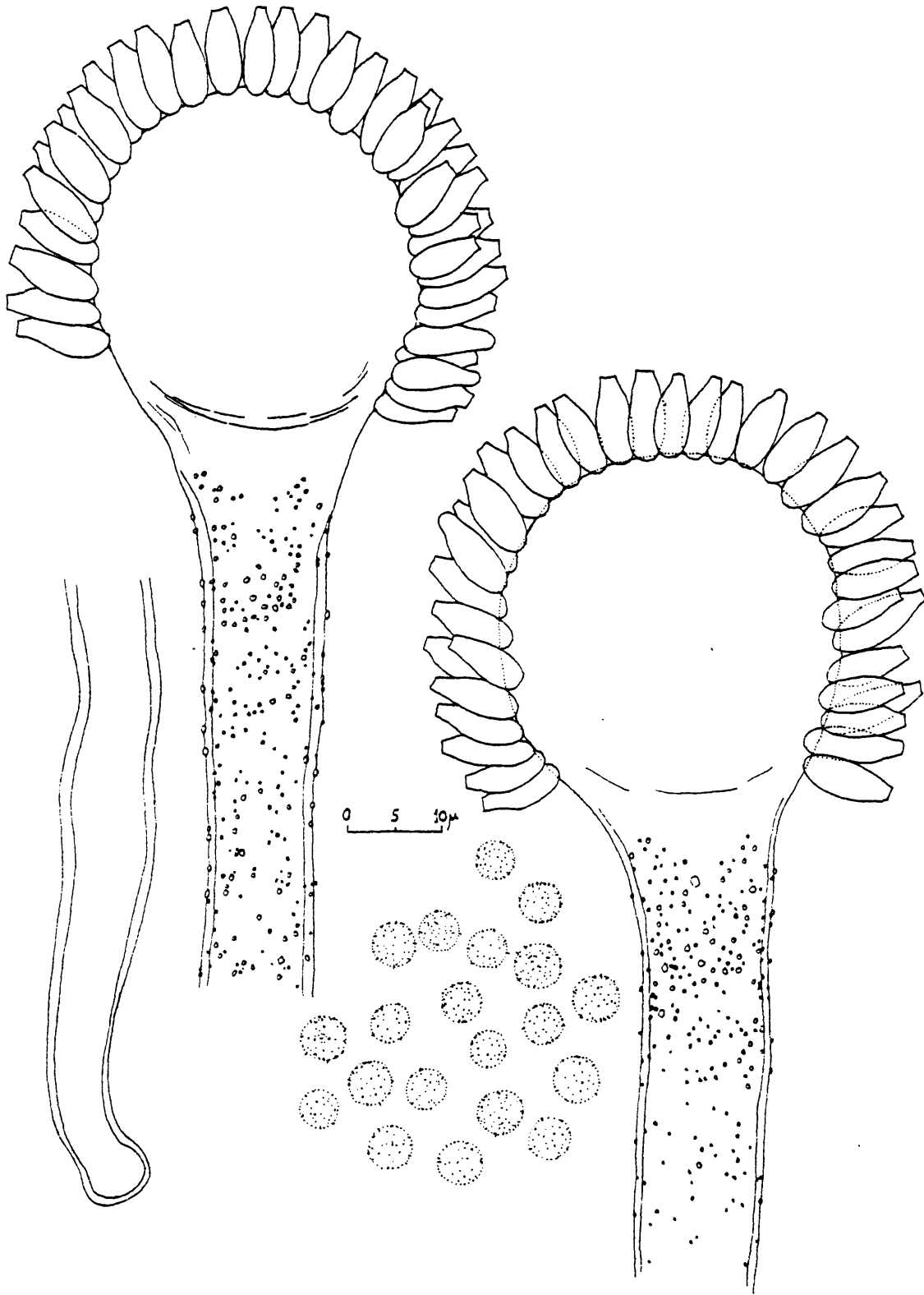
Conidióforos desde casi lisos a claramente rugosos.

Vesículas subglobosas, de 30 a 40 μm . de diámetro, que sustentan una sola serie de fiálides, de 8 a 10 μm . de longitud.

Conidios globosos, de 3.5 a 5 μm . de diámetro, equinulados.

No se han descrito cepas con esclerocios.

Al igual que A. flavus, A. parasiticus es una de las especies de Aspergillus más ampliamente reconocida como productora de micotoxinas. Según datos recopilados / por Cole y Cox (1.981); entre las sustancias de este tipo aisladas a partir de cultivos de A. parasiticus, podemos citar: aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, B_{2a}, G_{2a}, parasiticol (=aflatoxina B₃), esterigmatocistina, versicolorina A, averufina, ác. norsolorínico, versiconal hemiacetal acetato, versiconol acetato, versiconol, ác. kójico.



Aspergillus parasiticus Speare

Perteneciente al grupo del A. niger, esta especie da lugar, sobre Agar Solución de Czapek, a colonias de crecimiento algo lento, semejante al de A. niger, alcanzando 3 a 4 cm. de diámetro en 14 d. a 25° C, de color negro carbón a simple vista, con abundantes estructuras conidiales que recubren principalmente las zonas centrales.

Conidióforos de longitud inferior a 4 mm. (habitualmente menores de 2.5 mm.), de paredes gruesas y lisas, y a menudo estrechados ligeramente justo debajo de la vesícula.

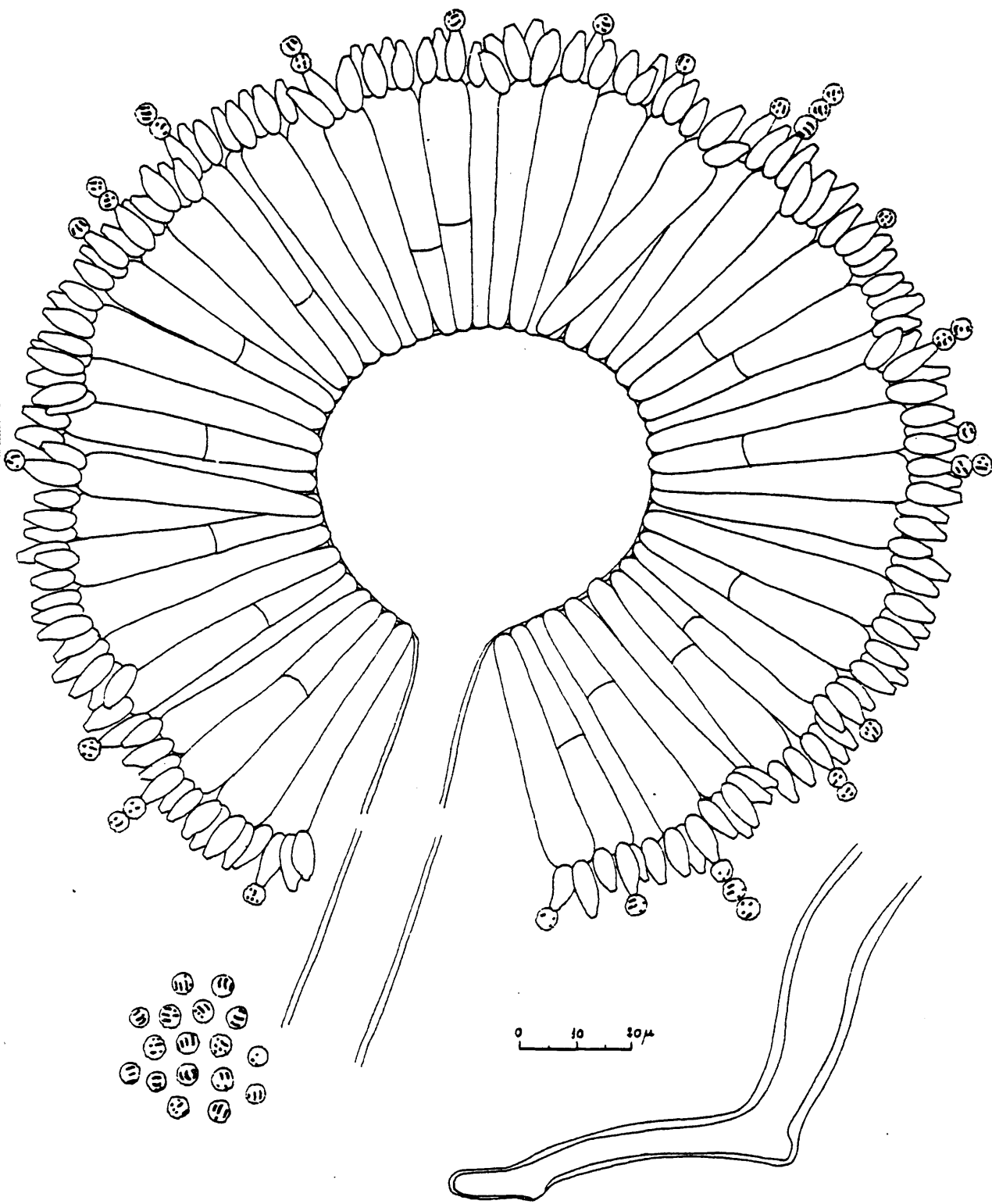
Vesículas globosas, generalmente de hasta 60 μ m. de diámetro, que sustentan m \acute etulas y fiálides.

M \acute etulas de tamaño variable, usualmente de hasta 40-50 μ m. de longitud; en ocasiones, aparecen m \acute etulas septadas, pudiendo alcanzar longitudes superiores.

Fiálides de 7 a 11 μ m. de longitud.

Conidios globosos, la mayoría entre 3 y 3.5 / μ m. de diámetro, con barras o estriaciones longitudinales oscuramente coloreadas.

A. phoenicis ha sido citado como productor de malforminas A₁ y B y nigragillina.



Aspergillus phoenicis (Cda.) Thom

Colonias sobre Agar Solución de Czapek de creci
miento restringido, coloreadas de verde y amarillo, debido
a la existencia simultánea de estructuras conidiales y de
cleistotecios. Reverso en tonos amarillento a marrón oscu-
ro.

Sobre Agar Solución de Czapek 20 % Sacarosa, /
las colonias crecen más rápidamente y se extienden alcan-
zando un diámetro de hasta 6 cm. en 14 d. a 25° C, alter-
nando igualmente áreas conidiales de color verde con áreas
cleistoteciales de color amarillo. Reverso amarillo-anaran-
jado a marrón oscuro.

Cabezas conidiales grandes, radiadas a suelta-
mente columnares, nacidas sobre la capa superficial de /
cleistotecios e hifas envolventes.

Conidióforos lisos.

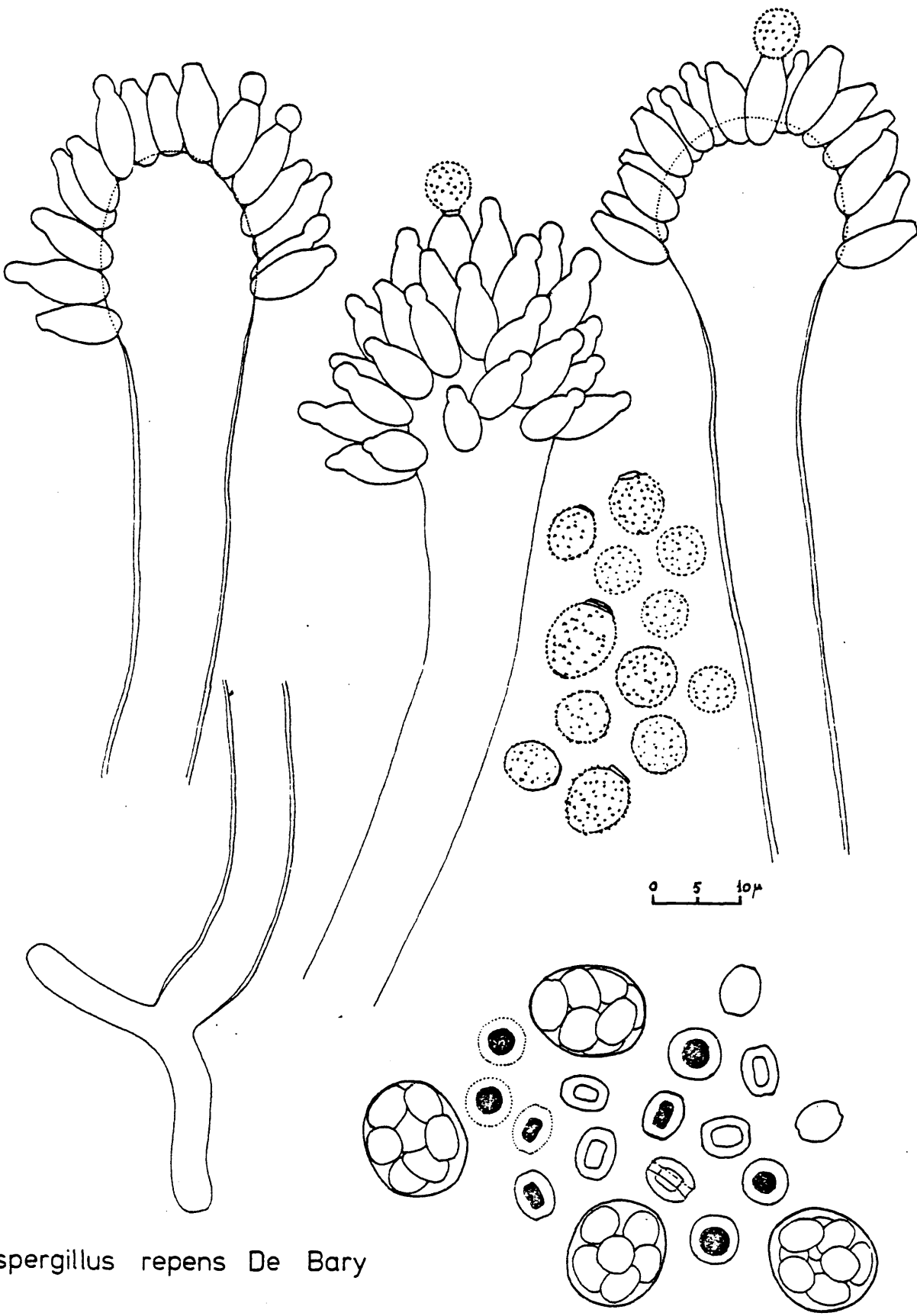
Vesículas alargadas a hemisféricas, de 20 a 30
 $\mu\text{m.}$ de diámetro, que sustentan únicamente fiálides de 7 a
12 $\mu\text{m.}$ de longitud.

Conidios ovales a globosos, de 5 a 10 $\mu\text{m.}$ de /
diámetro mayor, espinosos.

Cleistotecios muy numerosos.

Ascas subglobosas, de 10 a 14 $\mu\text{m.}$ de diámetro.

Ascosporas lenticulares, de 4 a 6 $\mu\text{m.}$, sin re-
bordes, crestas ecuatoriales ni surco, o mostrando apenas
trazas del surco ecuatorial.

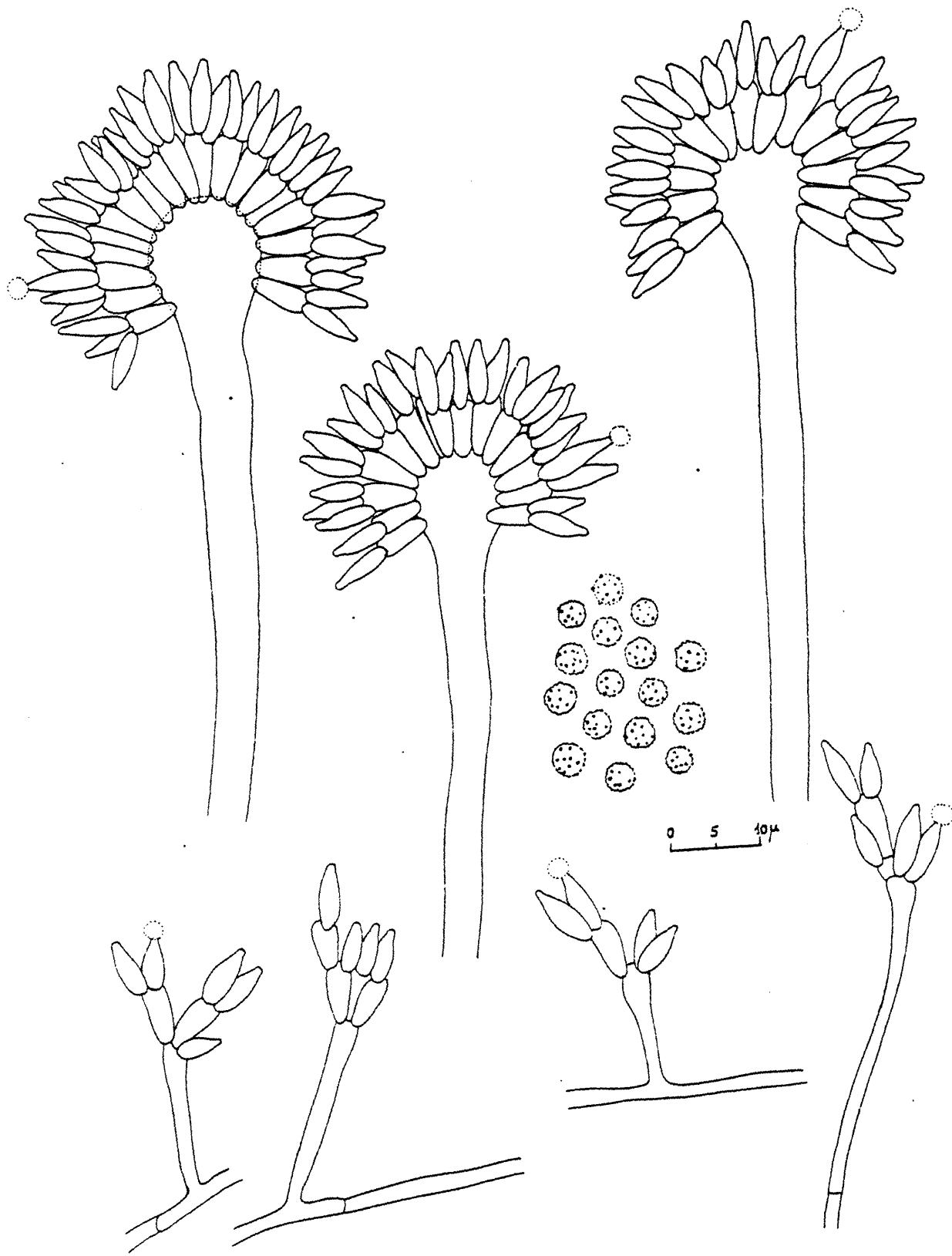


Aspergillus repens De Bary

Perteneciente al grupo del A. versicolor, A. sydowi es una especie próxima a la especie que da nombre al grupo, del que se distingue principalmente por la presencia de cabezas conidiales siempre de color azul-verde cuando jóvenes, con la tonalidad azul dominante en las áreas / conidiales maduras. Reverso de las colonias en tonos de rojo a rojo-púrpura muy oscuro, tonalidad que adquiere también el agar circundante de las colonias.

Estructuras conidiales muy parecidas a las de / A. versicolor, si bien suelen presentarse simultáneamente (a diferencia de lo que ocurre con la especie citada) cabezas conidiales grandes nacidas desde el sustrato y pequeñas cabezas, como pequeños racimos de métulas y fiálides, nacidas como ramas laterales de hifas aéreas.

Por otra parte, los conidios de A. sydowi suelen ser levemente mayores (entre 2.5 y 3.5 μm . de diámetro) que los de A. versicolor., y sumamente espinosos.



Aspergillus sydowi (Bain.) Thom et Church

Perteneiente al grupo del A. flavus, esta especie se caracteriza por presentar sobre Agar Solución de Czapek colonias de crecimiento rápido, que se extienden hasta 5-6 cm. de diámetro en 14 d. a 25° C, presentando cabezas conidiales inicialmente en tonos verde-amarillo oscuro que cambian a verde-marrón o marrón con la edad del cultivo.

Cabezas conidiales radiadas, uniseriadas o, más frecuentemente, biseriadas.

Conidióforos incoloros, de pared gruesa, verrugosos.

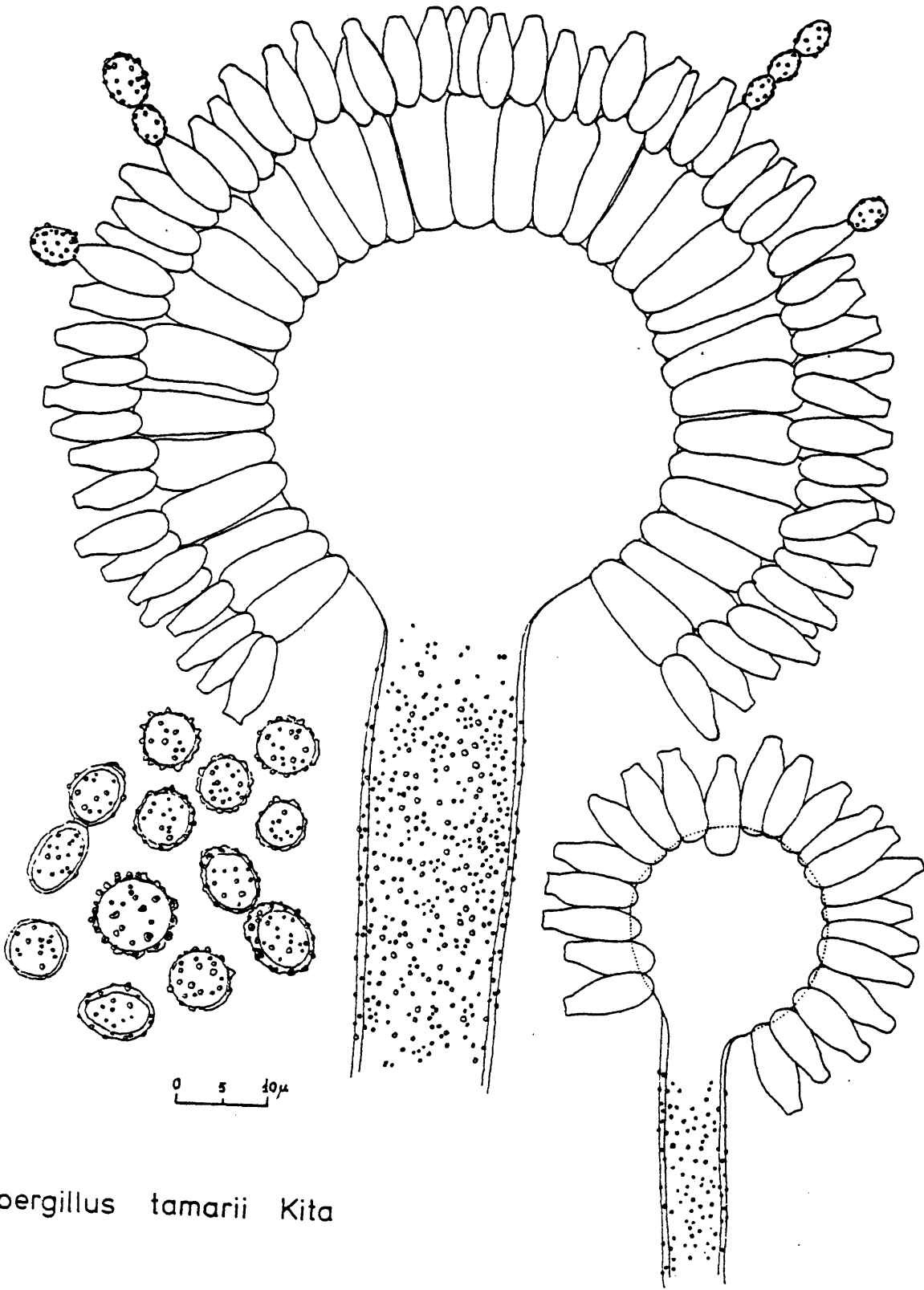
Vesículas subglobosas, de tamaño variable (generalmente entre 20 y 45 μm . de diámetro).

Métulas de hasta 15 μm . de longitud.

Fiálides de hasta 11 μm . de longitud.

Conidios elípticos a subglobosos, con diámetros que oscilan entre 4 y 8 μm ., verrugosos y con una doble pared claramente visible.

A. tamarii, en datos recopilados por Cole y Cox (1.981), se cita como productor de ác. kójico.

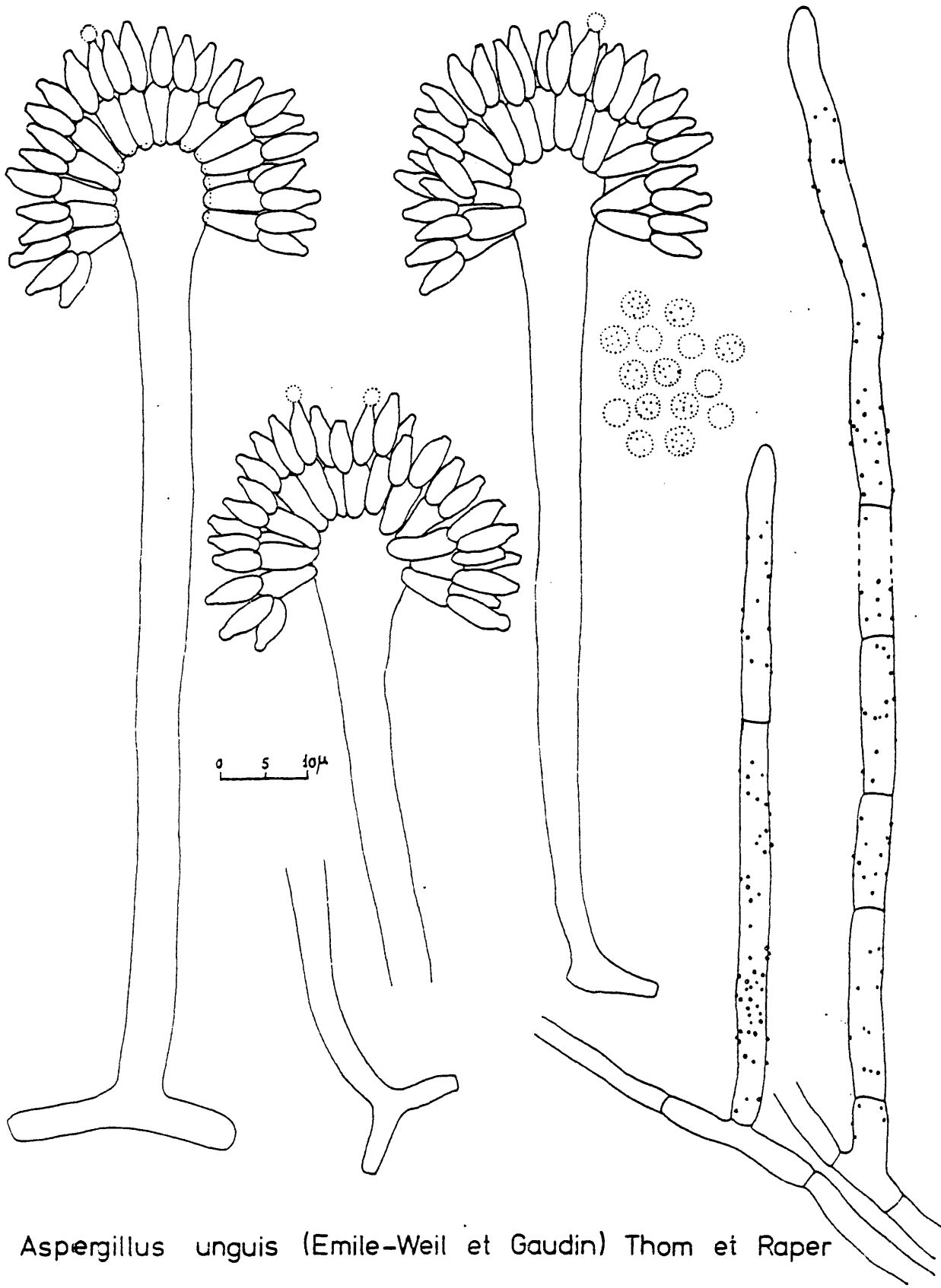


Aspergillus tamarii Kita

Colonias sobre Agar Solución de Czapek que alcanzan un menor desarrollo que las de la especie tipo / del grupo, A. nidulans, en tonos verde a verde-amarillento, que se oscurece con la edad hacia tonos pardos.

La característica diferencial de la especie / es la presencia de largas hifas espiculares estériles, / ásperas e incrustadas, que surgen de células de pie al i gual que los conidióforos.

Por lo demás, las características de la especie replican las de A. nidulans, si bien es muy rara la aparición de cleistotecios en los cultivos de A. unguis.



Aspergillus unguis (Emile-Weil et Gaudin) Thom et Raper

Colonias de crecimiento rápido sobre Agar Solu-
ción de Czapek, que alcanzan alrededor de 4-5 cm. de diáme-
tro en 14 d. a 25^o C. Cabezas conidiales radiadas a suelta-
mente columnares, en tonos gris-verdoso a marrón.

Conidióforos lisos, erectos o algo sinuosos en
ocasiones.

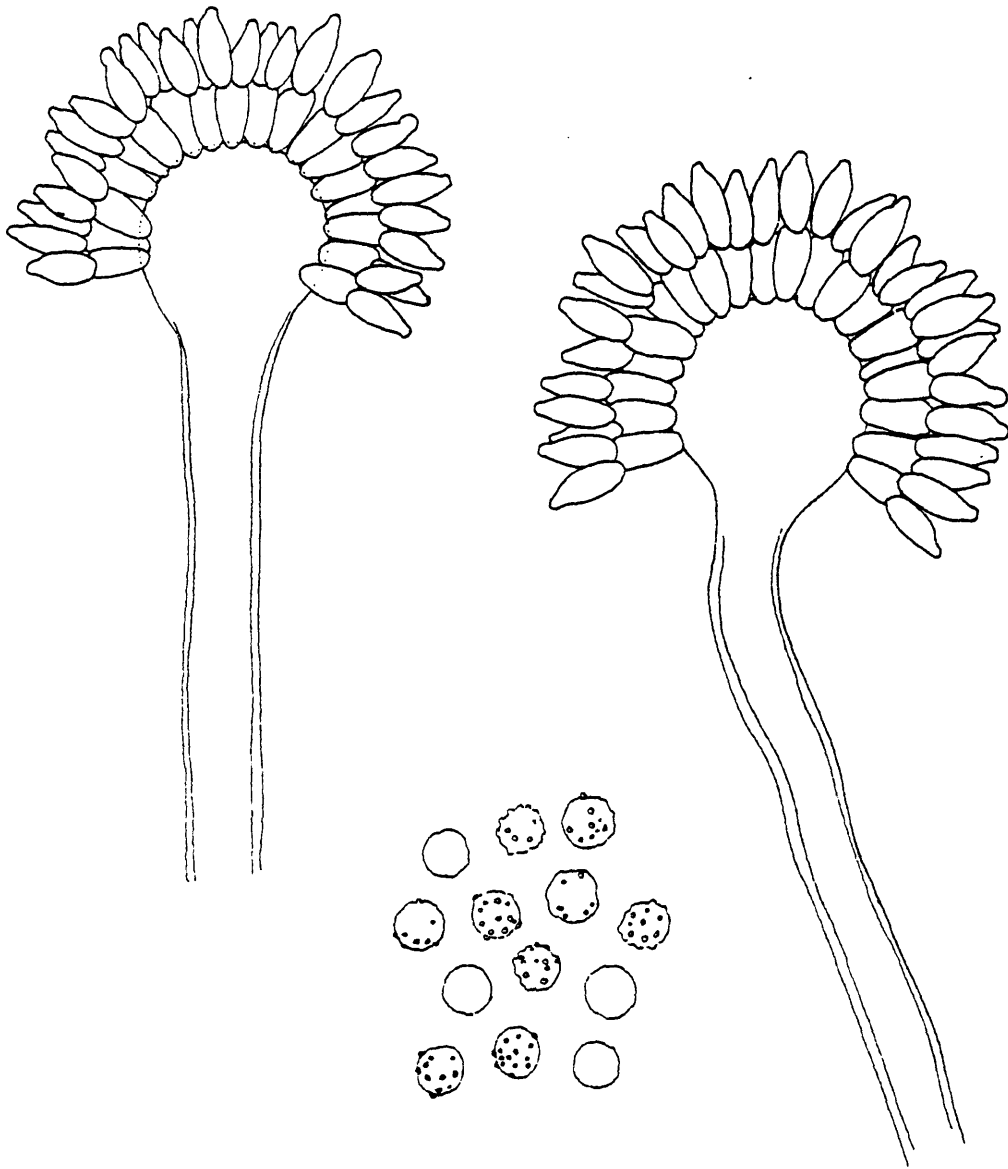
Vesículas subglobosas, de hasta 16 μ m. de diáme-
tro.

Cabezas conidiales biseriadas; métulas de 4-6 /
 μ m. de longitud; fiálides de 5.5 a 7 μ m. de longitud.

Conidios marrones, globosos, generalmente de 4
a 5 μ m. de diámetro, rugosos, espinosos e incluso verrugo-
sos, con barras de color oscuro.

Células de Hülle frecuentemente presentes, alar-
gadas a retorcidas.

Según datos recopilados por Cole y Cox (1.981),
A. ustus es capaz de producir diversas sustancias que se /
han conceptuado como micotoxinas: averufina, esterigmatoo-
cistina, deoxibrevianamida E, austamida, ác. kójico, aust-
diol, austina.



0 5 10 μ

Aspergillus ustus (Bainier) Thom et Church

Colonias sobre Agar Solución de Czapek alcanzan un diámetro de 3 a 3.5 cm. en 14 d. a 25° C, generalmente aterciopeladas, con cabezas conidiales de color variable, verde amarillo claro, ante, amarillo anaranjado a, ocasionalmente, color carne o rosado. Reverso mostrando poco a poco diversas tonalidades que finalizan en el rojo / púrpura, pigmentación que también adquiere el medio de agar que circunda a las colonias.

Cabezas conidiales radiadas, biseriadas.

Conidióforos de pared gruesa, lisos, ensanchados gradualmente hacia la zona de la vesícula apical.

Vesículas hemiesféricas a levemente elípticas, fértiles sobre la mayor parte de su superficie, de 11 a 16 μm . de diámetro.

Métulas de 5 a 7 (8) μm . de longitud.

Fiálides de 5 a 7 μm . de longitud.

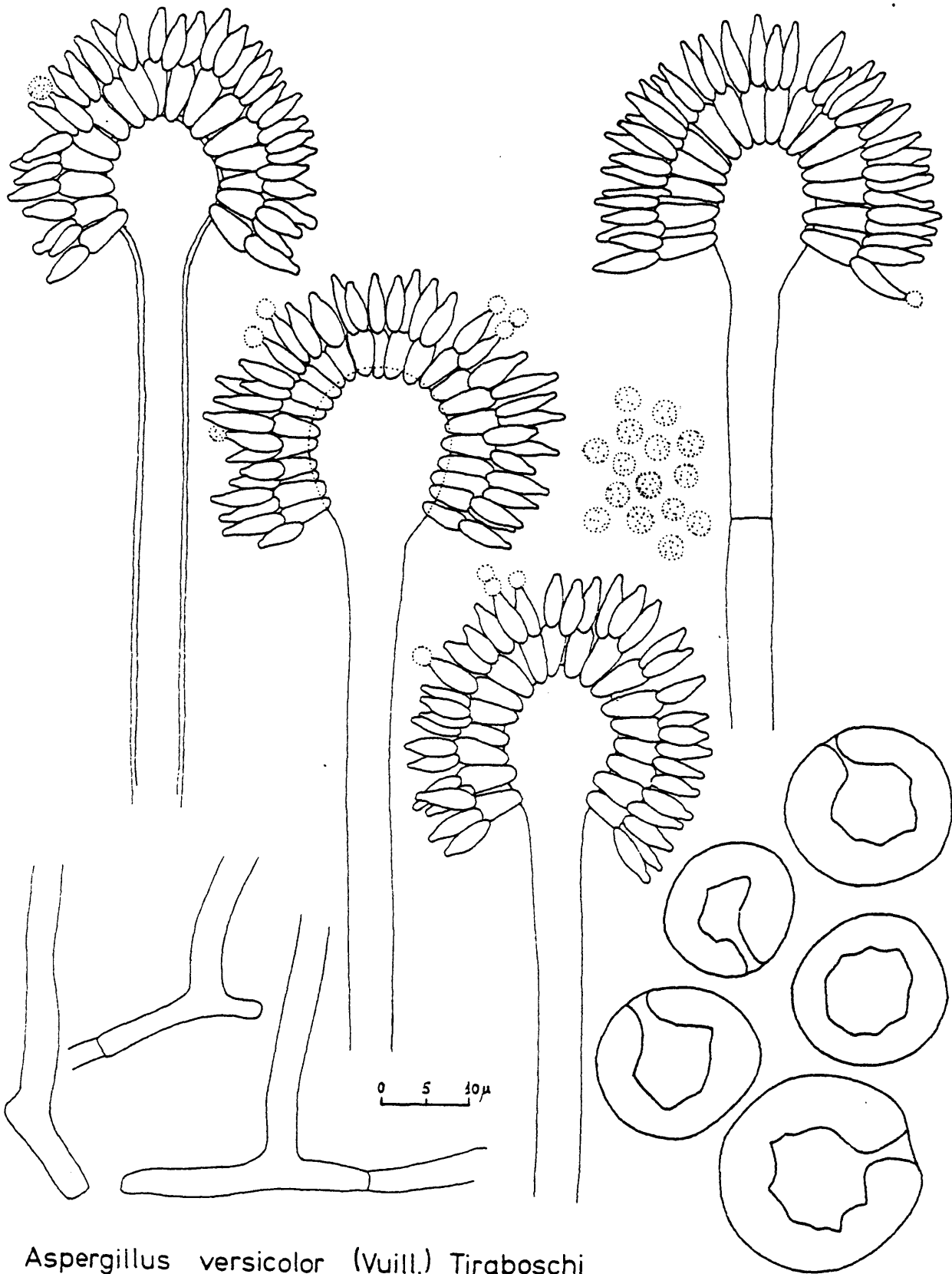
Conidios globosos, de 2 a 3 μm . de diámetro, espinosos.

Células de Hülle globosas, de pared gruesa, semejantes a las observadas en cultivos de A. nidulans.

Según datos de Cole y Cox (1.981), A. versicolor es capaz de producir las siguientes micotoxinas: esterigmatocistina, versicolorina A, B y C, dihidroesterigmatocistina, 5-metoxiesterigmatocistina, dihidrodemetilesterigmatocistina,

lorinico, O-metilaversina, ác. ciclopiazónico, ác. ciclo--
piazónico imina, ác. bissecodehidrociclopiazónico.

-----0-----



Aspergillus versicolor (Vuill.) Tiraboschi

Colonias con crecimiento lento sobre Agar Solu-
ción de Czapek, alcanzando un diámetro de 3 a 3.5 cm. en /
14 d. a 25° C, en tonos marrón amarillento a marrón oscuro
con la edad.

Cabezas conidiales grandes, radiadas, biseria--
das.

Conidióforos muy largos, de incluso varios milí-
metros de longitud por 15-20 μm . de anchura, de paredes li-
sas a muy levemente rugosas o granulares.

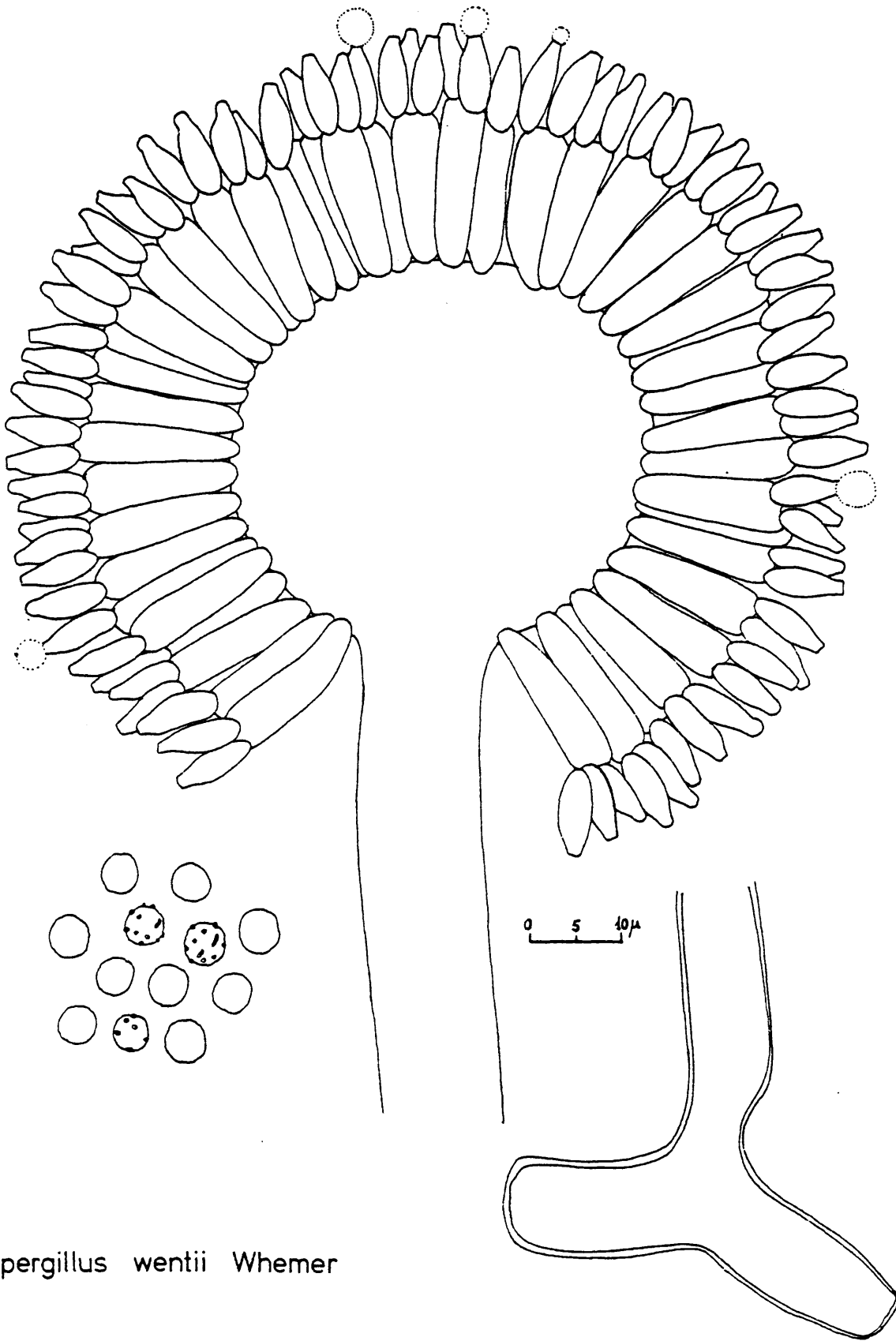
Vesículas globosas, grandes, generalmente de 40
a 50 μm . de diámetro, pero pudiendo ser mayores.

Métulas generalmente entre 15 y 20 μm . de longi-
tud.

Fiálides de 7 a 10 μm . de longitud.

Conidios marrones, globosos, usualmente entre 4
y 5 μm . de diámetro, rugosos a verrugosos, con barras de co-
lor oscuro.

A partir de cultivos de A. wentii se han aisla-
do diversas sustancias que se han conceptualizado como micoto-
xinas: emodina, ác. β -nitropropiónico, ác. kójico.



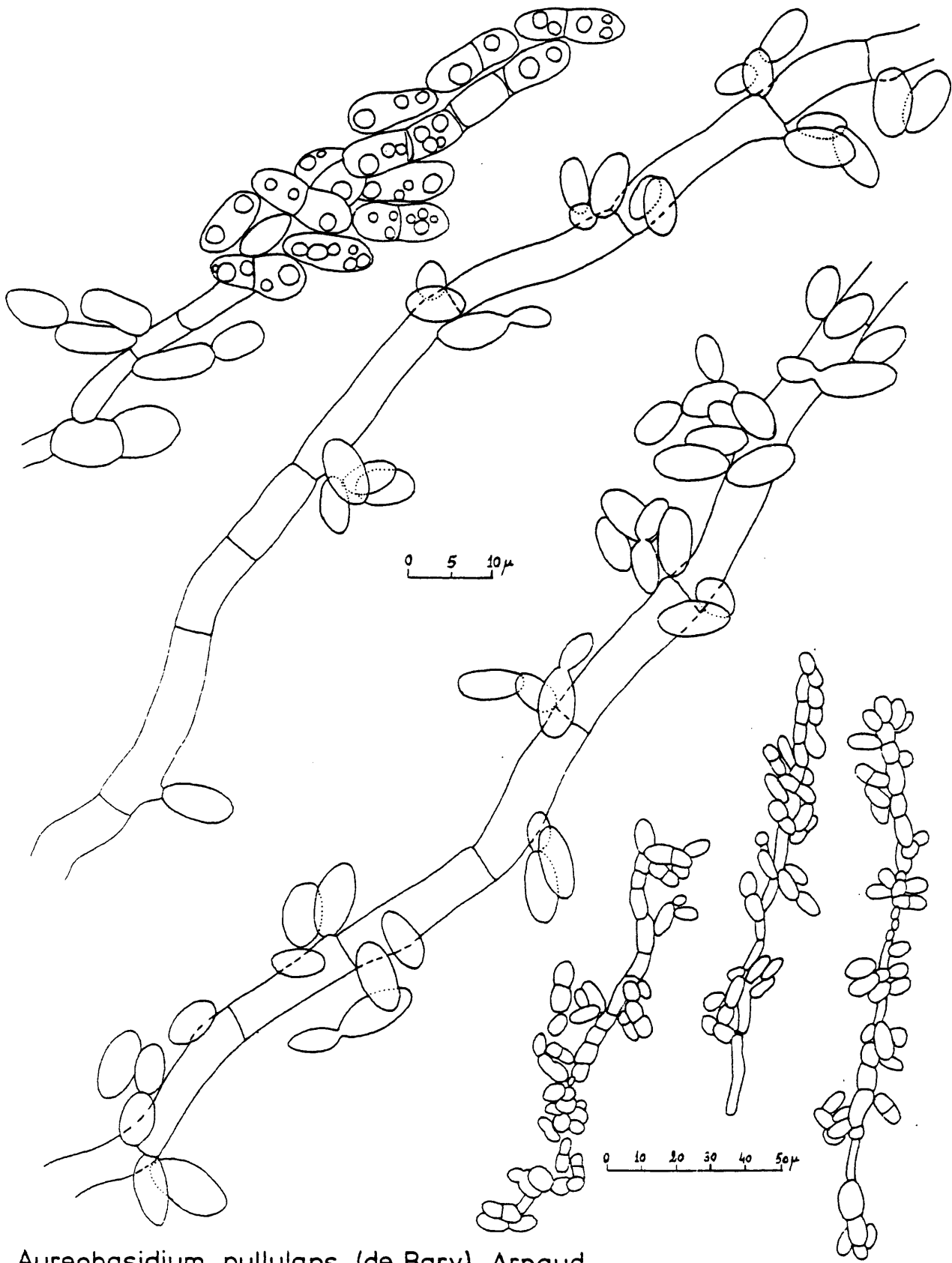
Aspergillus wentii Whemer

La especie aislada e identificada en el presente estudio, A. pullulans, origina colonias en principio blanquecinas y viscosas, con cierta apariencia levaduriforme, que gradualmente se tornan de color oscuro, / hasta negro, y consistencia coriácea.

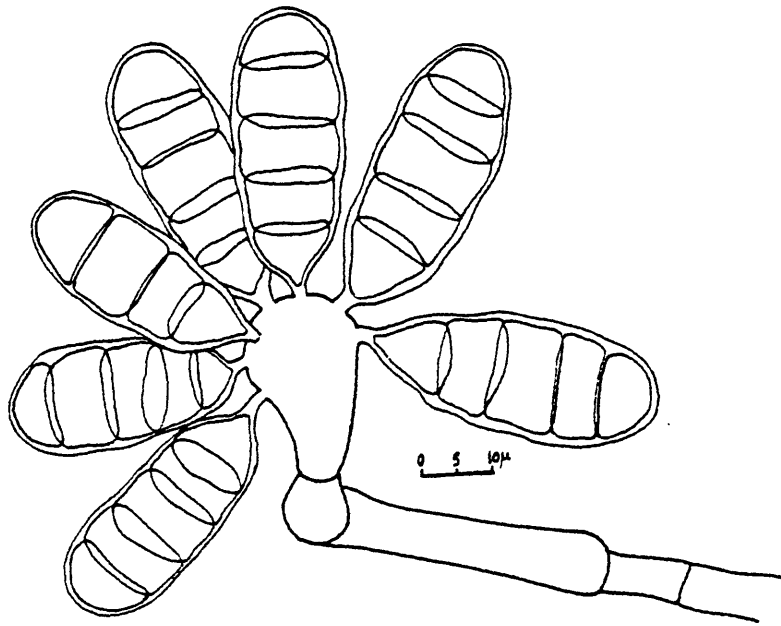
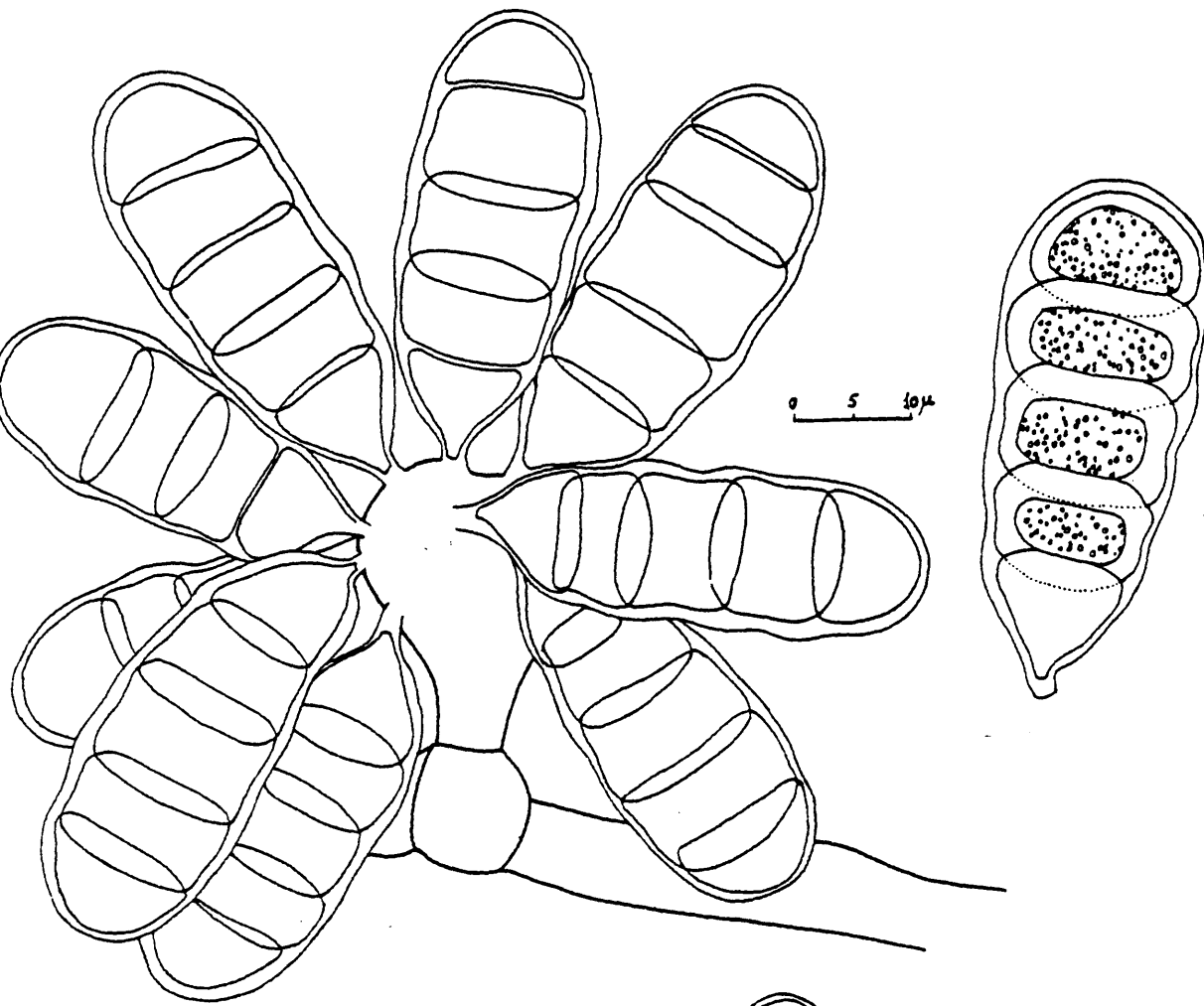
Hifas vegetativas hialinas a oscuramente pigmentadas.

Conidióforos ausentes.

Conidios nacidos sobre hifas rastreras o sobre cortos dentículos como esterigmas: se trata de blastosporas, hialinas o pigmentadas, que dan lugar a series secundarias y terciarias de blastosporas, por gemación.



Aureobasidium pullulans (de Bary) Arnaud



Cephaliophora tropica Thaxter

La especie que hemos aislado, C. tropica, se caracteriza por la presencia de conidios grandes, de pared gruesa, septados, de color salmón a naranja pálido / observados en masa, nacidos simultáneamente en forma radiada desde una ampolla bulbosa, sobre dentículos.

Conidióforos cortos o ausentes. La célula esporógena puede ser sésil o nacer de un pedicelo delgado más o menos corto.

Colonias densamente aterciopeladas, poco exuberantes, de color verde intenso a verde grisáceo oscuro, con reverso negro.

Micelio bien desarrollado, con hifas hialinas de pared delgada y células alargadas que se vuelven marronáceas, de pared gruesa y células cortas e hinchadas.

Estructuras de esporulación muy frágiles, / constituidas por conidióforos generalmente largos, frecuentemente ramificados o en racimos, pigmentados, generalmente erectos, de pared gruesa, septados, a menudo / más o menos nudoso-geniculados en su parte distal, y que producen cadenas ramificadas de blastosporas que dan lugar a cabezas conidiales con apariencia de árbol.

Cabezas conidiales muy frágiles que se fracionan prontamente en unidades. Esta fragmentación en la madurez involucra frecuentemente a las ramas, dejando sólo muñones desnudos de conidióforos enteros.

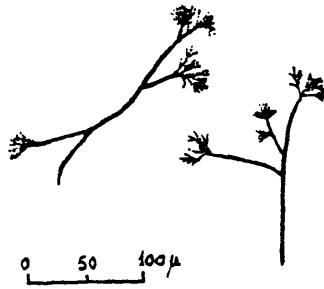
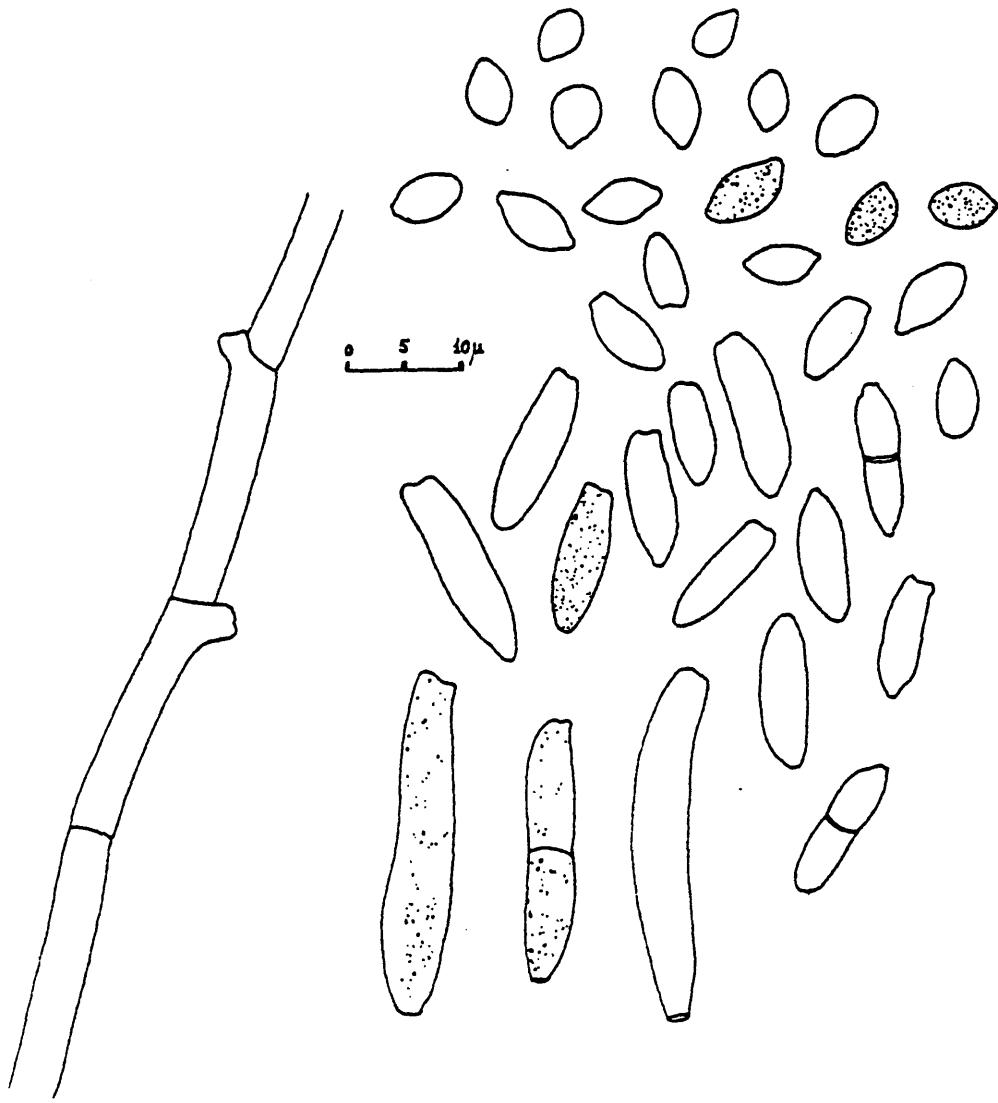
Conidios producidos en sucesión acropétala / por gemación apical, subhialinos a marrón oscuro, aislados o en cadenas simples a ramificadas, polimorfos, generalmente uni o bicelulares, lisos a finamente verrugosos o ásperos.

Las cepas de Cladosporium identificadas en este estudio son: Cl. cladosporioides y Cl. herbarum.

Colonias planas sobre Agar Malta, onduladas o umbonadas, con una cantidad variable de micelio aéreo, usualmente cubierto por estructuras conidiales, algunas / veces produciendo sinemas. Color verdoso de tonalidad variada. Reverso negro-oliváceo.

Conidióforos sin hinchamientos que producen / cabezas conidiales densamente ramificadas.

Conidios lisos, usualmente unicelulares aun-- que también se observan numerosos conidios bicelulares y polimorfos. Lisos a muy finamente espinosos.



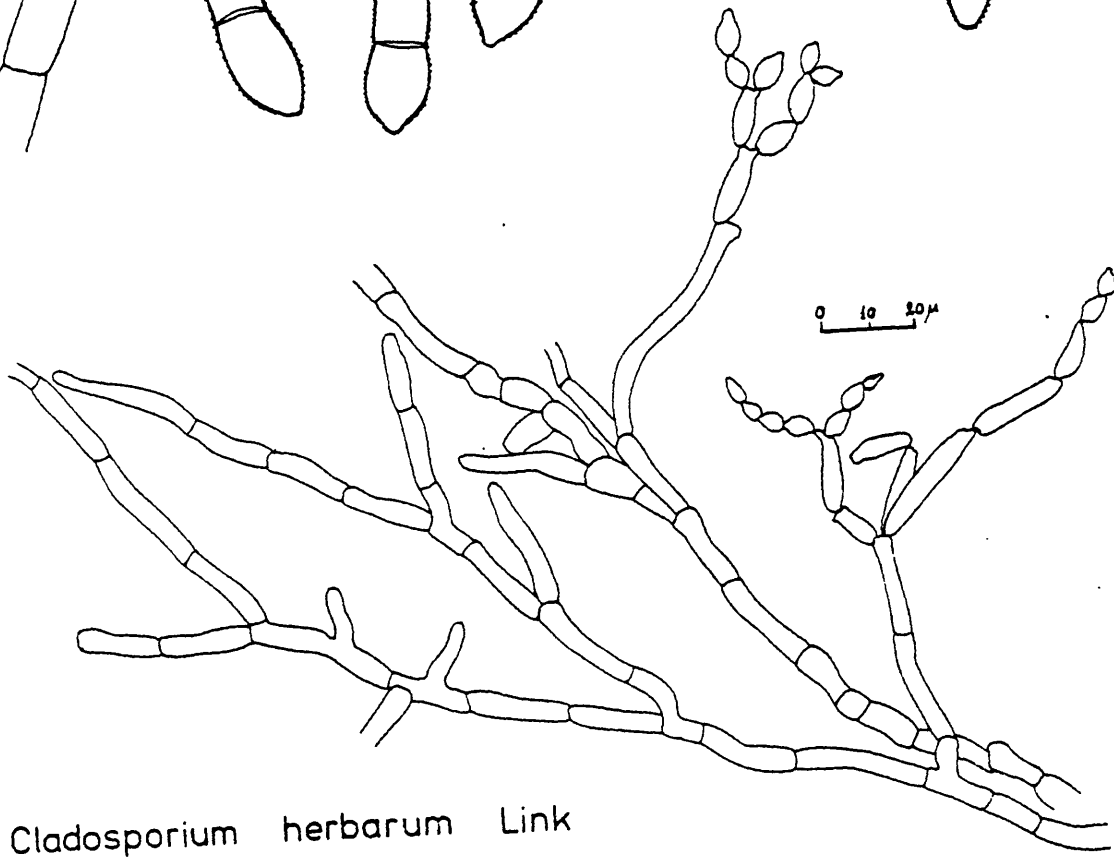
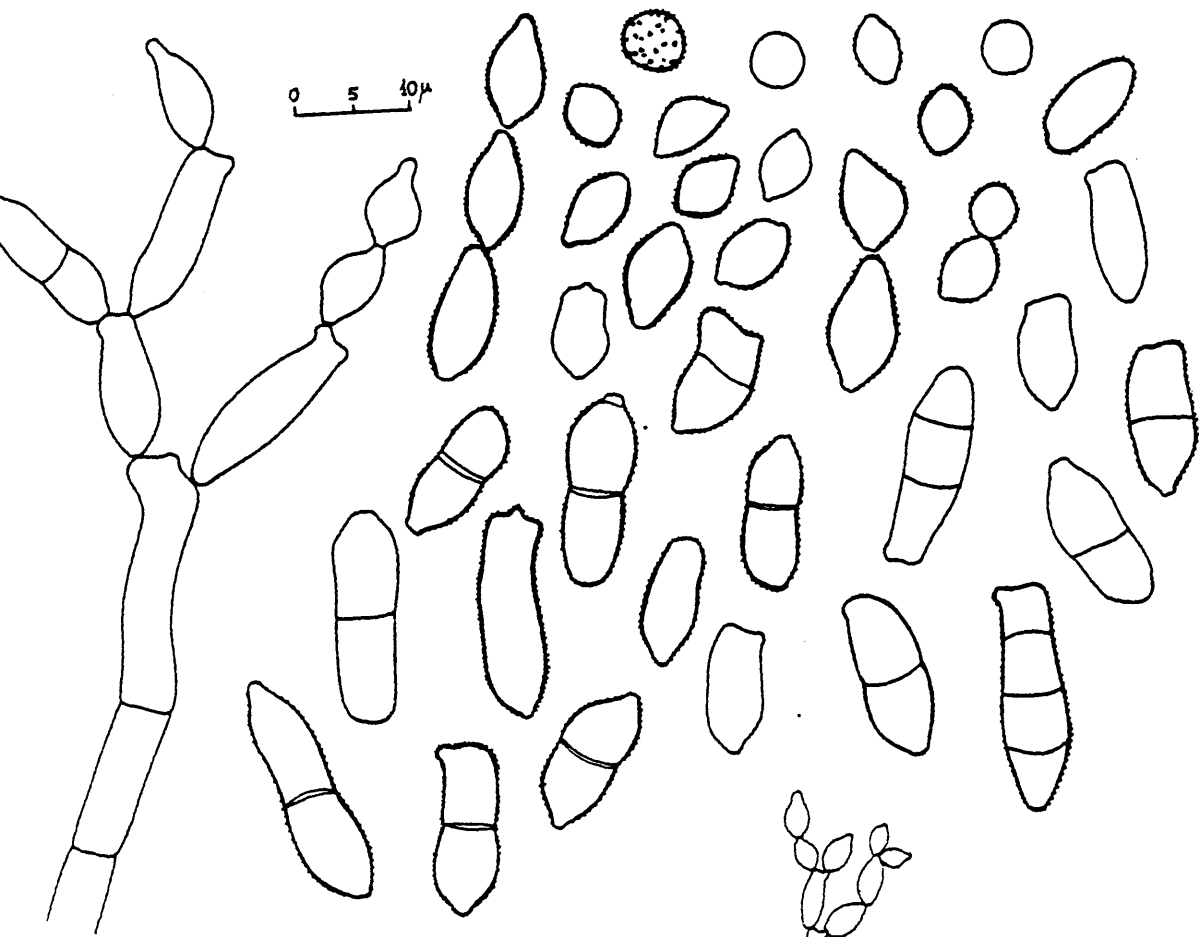
Cladosporium cladosporioides Fresenius

Colonias de color gris a verde grisáceo o verde oscuro sobre Agar Malta, de aspecto polvoriento, localmente sin micelio aéreo. Reverso negro azulado a negro verdoso.

Conidióforos con hinchamientos en el lugar / donde surgen las cabezas conidiales.

Cabezas conidiales usualmente menos ramificadas, de menor diámetro, que Cl. cladosporioides, y con / menor número de conidios por cabeza conidial.

Conidios verrugosos, proporcionalmente más / gruesos que los de Cl. cladosporioides, y con mayor frecuencia de conidios de dos o más células.



Cladosporium herbarum Link

Conidióforos
Colonias sumamente variables, en general flo-
cosas, blanquecinas o pigmentadas en tonalidades claras,
frecuentemente rosáceas.

Los cuerpos fructíferos, cuando están presen-
tes, son esporodoquios; en muchas ocasiones faltan tales
cuerpos fructíferos y las células esporógenas surgen di-
rectamente de las hifas vegetativas o de los conidiófo-
ros.

Conidióforos solitarios y simples o agregados
y con ramificaciones complejas.

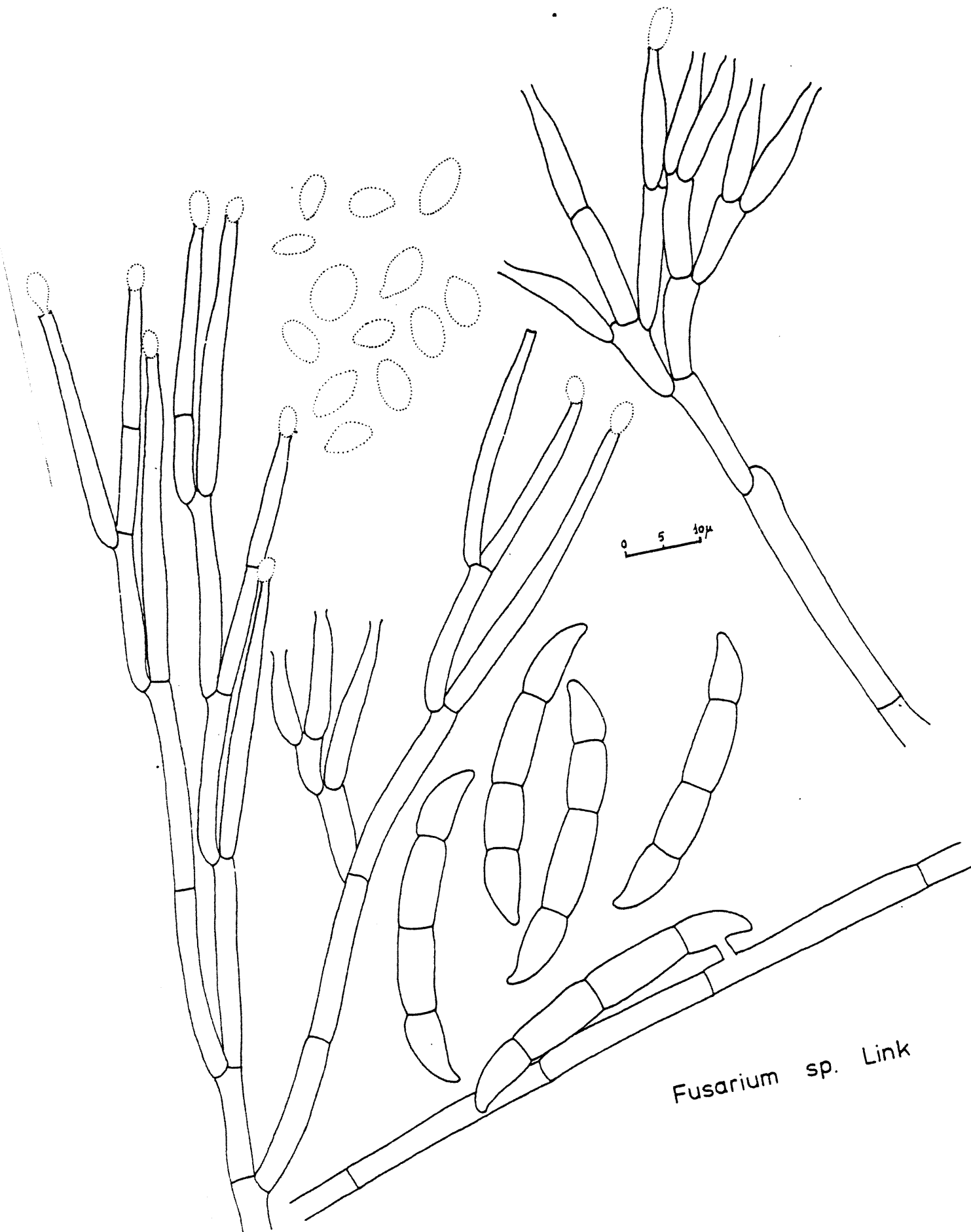
Las células esporógenas son fiálides ahusadas
en su porción distal, a veces con collarete apical.

Fialosporas frecuentemente de dos tipos: gran-
des macrosporas con uno o varios septos, formando alarga-
das fragmosporas, hialinas, cilíndricas o curvadas, fre-
cuentemente con forma de barco, con una célula de pié /
bien marcada, y que confieren al género uno de sus carac-
teres más claramente distintivos; por otro lado, micros-
poras más pequeñas, no septadas o con un solo septo, cor-
tamente cilíndricas a ovoides, reunidas en cortas cade-
nas o más comunmente en masas que adoptan formas esféri-
cas.

Fusarium es uno de los géneros de micromice-
tos más ampliamente reconocido como productor de micoto-

existe un amplio abanico de sustancias con acción tóxica que se han aislado a partir de cultivos de diferentes especies del género: toxina T-2, toxina HT-2, neosolaniol monoacetato, acetyl T-2 toxina, 7 α -hidroxidiacetoxiescirpenol, 7 α ,8 α -dihidroxidiacetoxiescirpenol, 4-acetoxiescirpenol, triacetoxiescirpenol, nivalenol, deoxinivalenol (= toxina Rd = vomitoxina), deoxinivalenol monoacetato, fusarenona X, nivalenol diacetato, tricotecolona, moniliformina, butenolido, zearalenona, hidroxizearalena.

-----0-----



Fusarium sp. Link

Colonias de color variable (blanco, rosa, li-
la, pardo amarillento, ...), nunca verde, de textura /
suelta, flocosa o aterciopelada en casos.

El género Paecilomyces suele identificarse fá-
cilmente por sus células esporógenas: fiálides aisladas,
en pares, verticilos o cabezas peniciladas, divergentes,
usualmente hinchadas en la base y anusadas gradualmente
hacia el ápice hasta formar un tubo estrecho.

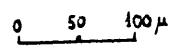
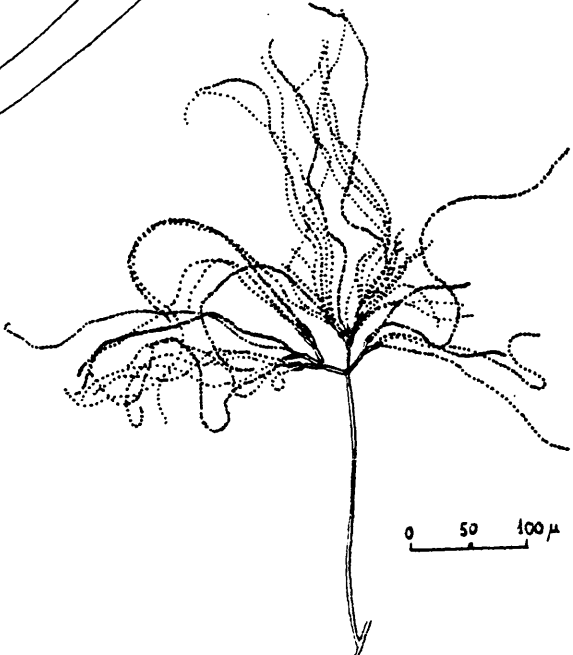
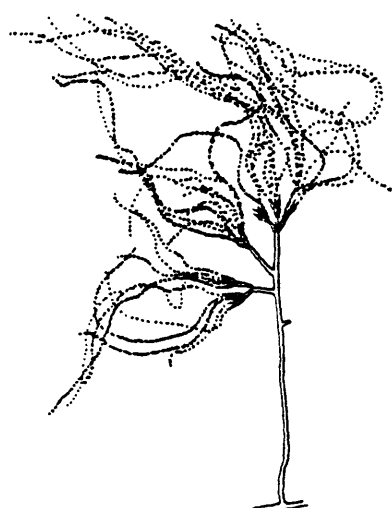
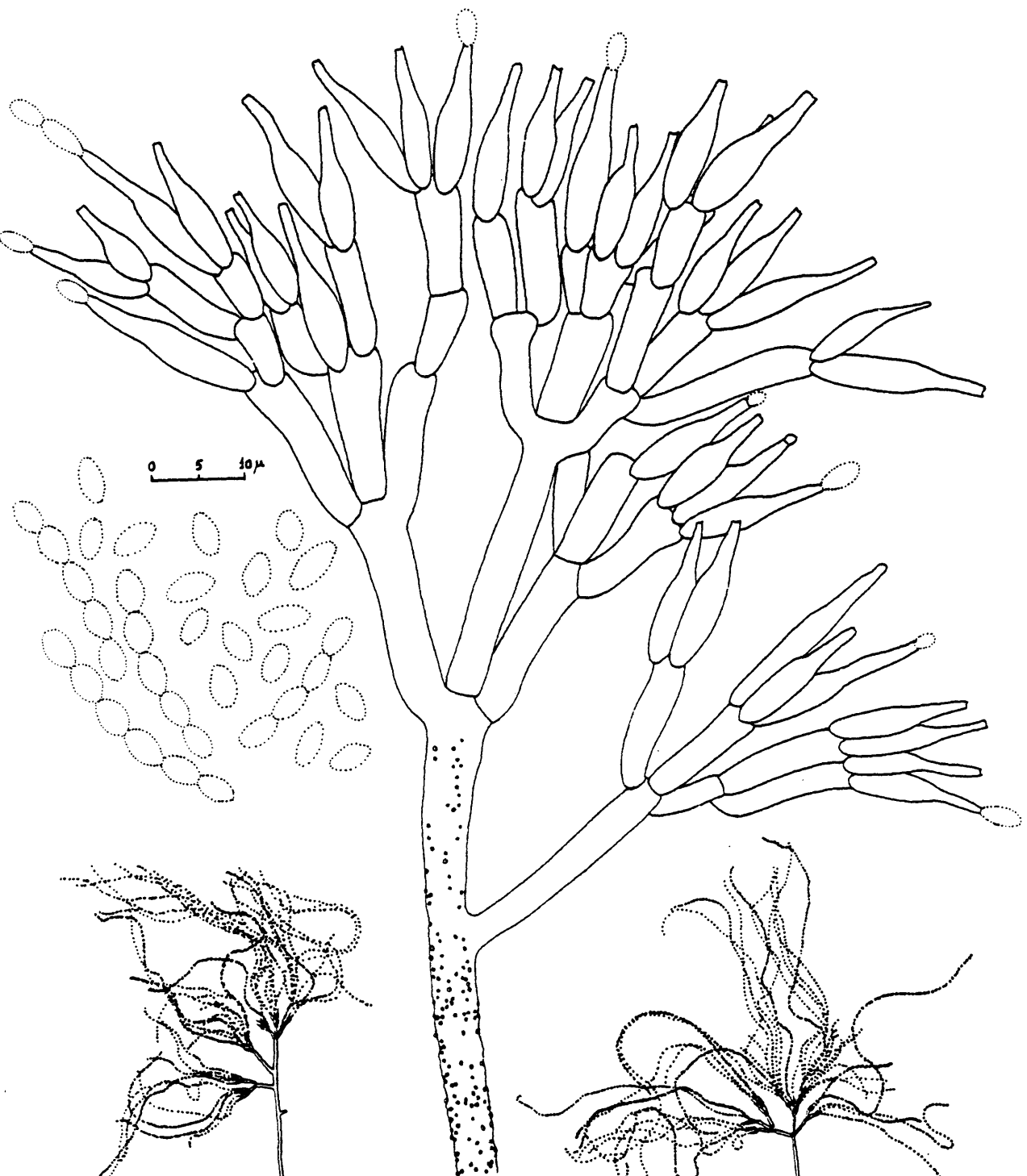
Las fiálides portan largas cadenas de esporas
ovoides a fusiformes, unicelulares, hialinas a oscuramen-
te pigmentadas, lisas a rugosas.

La especie que hemos aislado e identificado /
en el presente estudio es P. varioti.

P. varioti.-

Colonias que varían de tonalidad entre pardo
pálido mate y pardo amarillento, de textura flocosa a fu-
niculosa.

Las células conidiógenas son fiálides con for-
ma típica de botella y porción apical sumamente estrecha
da en un largo cuello. Se presentan emergiendo en peque-
ños grupos de cordones de hifas o reunidas en cabezas pe-
niciladas. Dan origen a cadenas de esporas sumamente lar-
gas y enmarañadas. Conidios ovales a elípticos.



Paecilomyces varioti Bainier

Este género fué creado por Link en 1.809, incluyendo en él a aquellos mohos que produjeran estructuras de esporulación asexual semejantes a pinceles.

Se caracteriza, pues, por la presencia de largas cadenas de fialosporas nacidas a partir de fiálides, sobre cabezas con forma de pincel (penicilos).

Conidióforos usualmente de sarrollados, más o menos erectos, sin ramificar o ramificados cerca del ápice, dando lugar a la existencia de ramas divergentes o / paralelas.

Las fiálides se sustentan, en grupos, bien directamente en el ápice del conidióforo (monoverticilados), bien sobre métulas que surgen sobre las ramas primarias o secundarias (biverticilados),

Fiálides típicamente con forma de botella a / lanceoladas, hialinas.

Conidios hialinos a pigmentados, globosos, ovoides, elípticos o cilíndricos, lisos, rugosos o espinosos.

Algunas especies producen esclerocios.

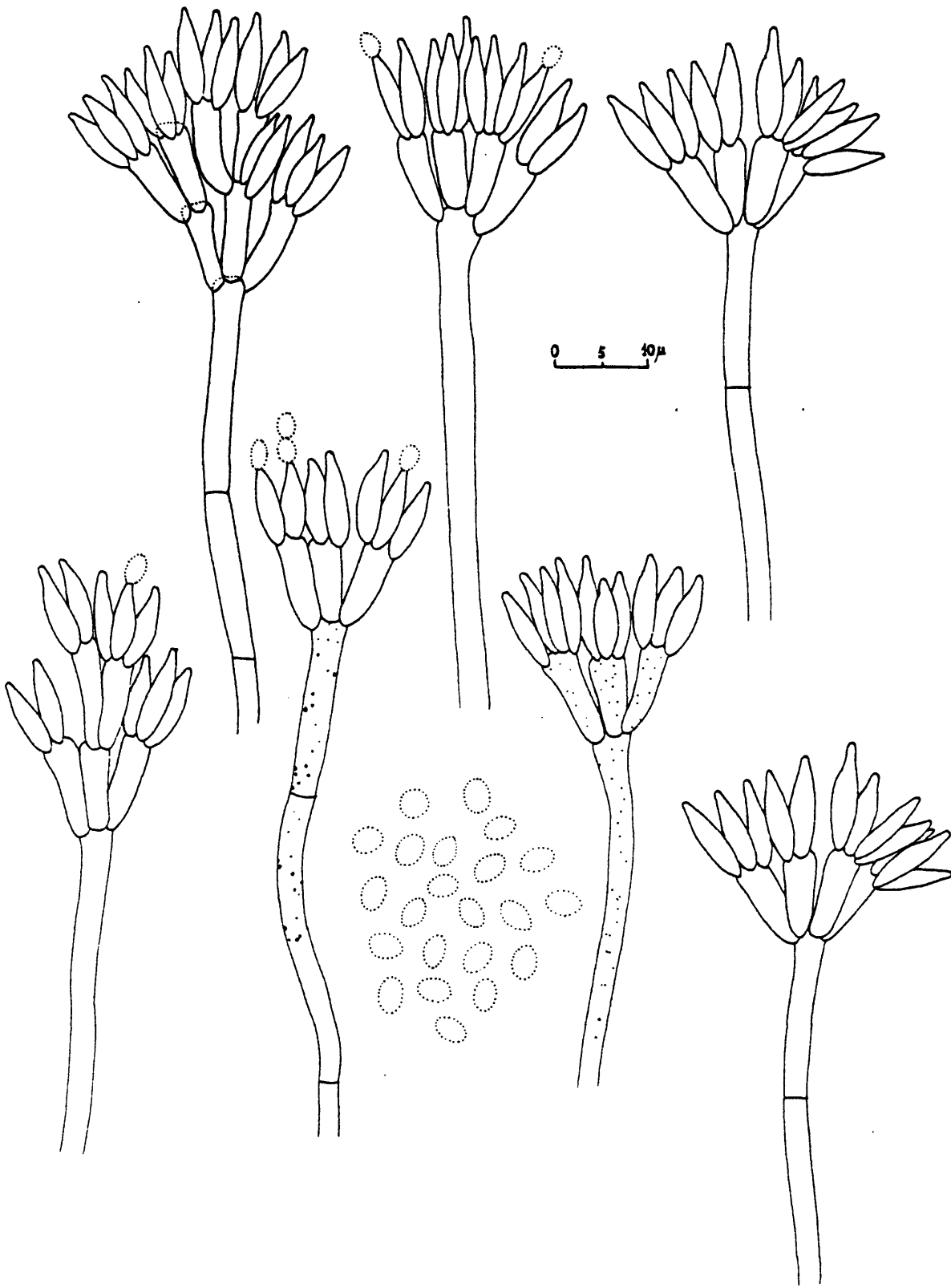
Se trata de un género muy numeroso en especies y muchas de ellas están conceptuadas como productoras de micotoxinas.

En el presente estudio hemos aislado las espe

pactum, P. citreo-virens, P. citrinum, P. corylophilum,
P. chrysogenum, P. expansum, P. frequentans, P. grancana
riae, P. griseo-fulvum, P. janthinellum, P. jensenii, P.
mickzynskii, P. oxalicum, P. paxilli, P. purpurescens, /
P. raistrickii, P. roqueforti, P. simplicissimum, P. /
steckii, P. velutinum, P. verrucosum var. corymbiferum,
P. verrucosum var. cyclopium, P. verrucosum var. melano-
chlorum, P. verrucosum var. verrucosum.

Incluída entre los Biverticillata-Simétrica, serie del P. purpurogenum, esta especie presenta colonias de crecimiento restringido (20 a 30 mm. de diámetro) sobre Agar Solución de Czapek, a los 14 d. a 25° C, aterciopeladas, planas, con área central levantada y área submarginal surcada radialmente, fuertemente esporuladas en tonos azul-verde y cubiertas superficialmente / por hifas incrustadas de cristales rojizos, lo que le / confiere tal tonalidad a las colonias. Reverso en tonos rojo-púrpura. Exudado coloreado.

Microscópicamente, entre sus características más notorias destacan penicilos simétricos, apretados, / en abanico, de estípites cortos (alrededor de 100 μ m. de longitud) y erectos; fiálides lanceoladas, de 8 a 12 μ m. de longitud; conidios ovoides, lisos, de 3 a 4 μ m. de diámetro.

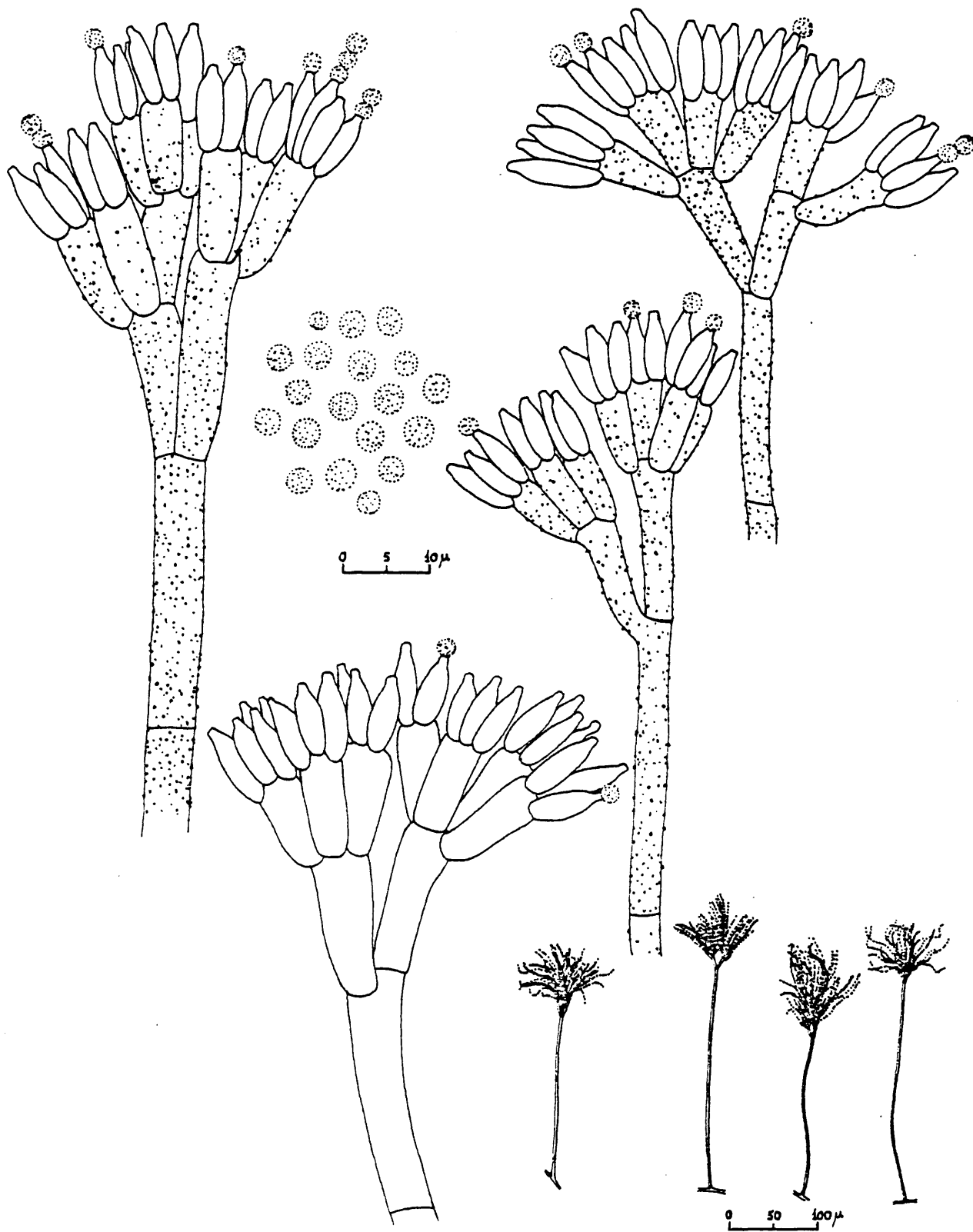


Penicillium aurantio-flammiferum Ramirez, Berenguer et Martinez

Incluída entre los Biverticillata-Asimétrica, esta especie presenta colonias de crecimiento muy restringido (15 a 20 mm. de diámetro) sobre Agar Solución / de Czapek, a los 14 d. a 25^o C, aterciopeladas, fuertemente esporuladas en tonos azul-verde. Reverso en tonos cremas a rosados.

Microscópicamente, presenta conidióforos típicamente ramificados por debajo del nivel de las mótulas, con mótulas y fiálides fuertemente apretadas. Estípites de paredes rugosas. Mótulas comparativamente cortas y anchas (10 a 15 $\mu\text{m.}$ x 4 a 6 $\mu\text{m.}$). Fiálides de 8 a 13 $\mu\text{m.}$ / Conidios globosos, de 2.5 a 3.5 y hasta 4 $\mu\text{m.}$ de diámetro, finamente espinosos.

En la recopilación llevada a cabo por Cole y Cox (1.981) sobre metabolitos fúngicos tóxicos, P. brevi compactum se cita como productor de ác. micofenólico.

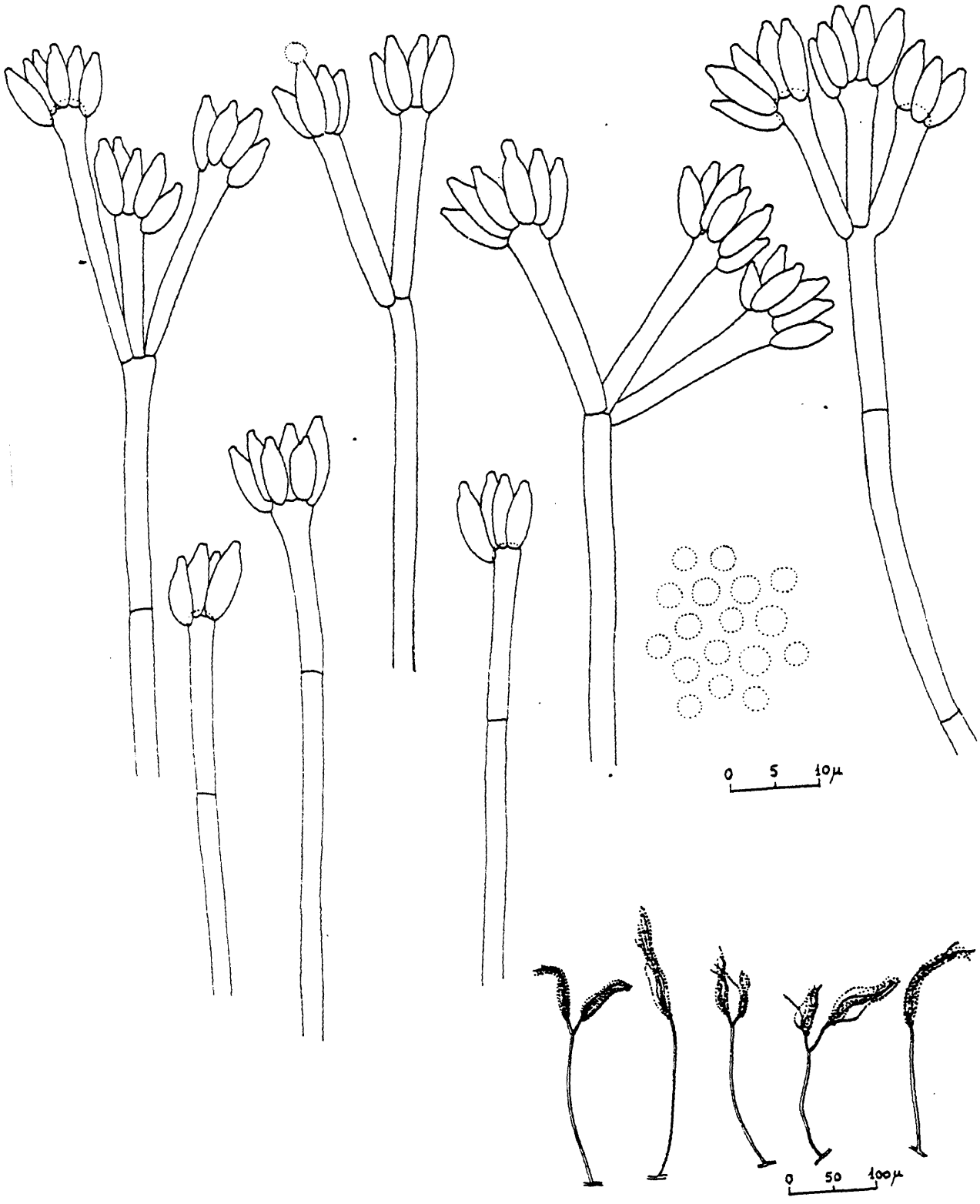


Penicillium brevi-compactum Dierckx

Dentro de los Asimetrica-Divaricata, esta especie, perteneciente a la serie del P. godlewskii, presenta colonias desarrolladas (30 a 40 mm. de diámetro) / sobre Agar Solución de Czapek, a los 14 d. a 25° C, aterciopeladas, con zona central levantada, surcadas radialmente y esporuladas en tonos del verde claro.

Microscópicamente, presenta conidióforos lisos, con métulas divergentes (2-3 por verticilo) de 15 a 30 μ m. de longitud; fiálides de 7 a 9 μ m. de longitud; / conidios globosos de 3 a 3.5 μ m. de diámetro, lisos.

Sobre Agar-Malta-Glucosa-Peptona, las colonias se desarrollan aterciopeladas, destacando su reverso en tonos crema, que pasa a verde oscuro en la zona central de la colonia.

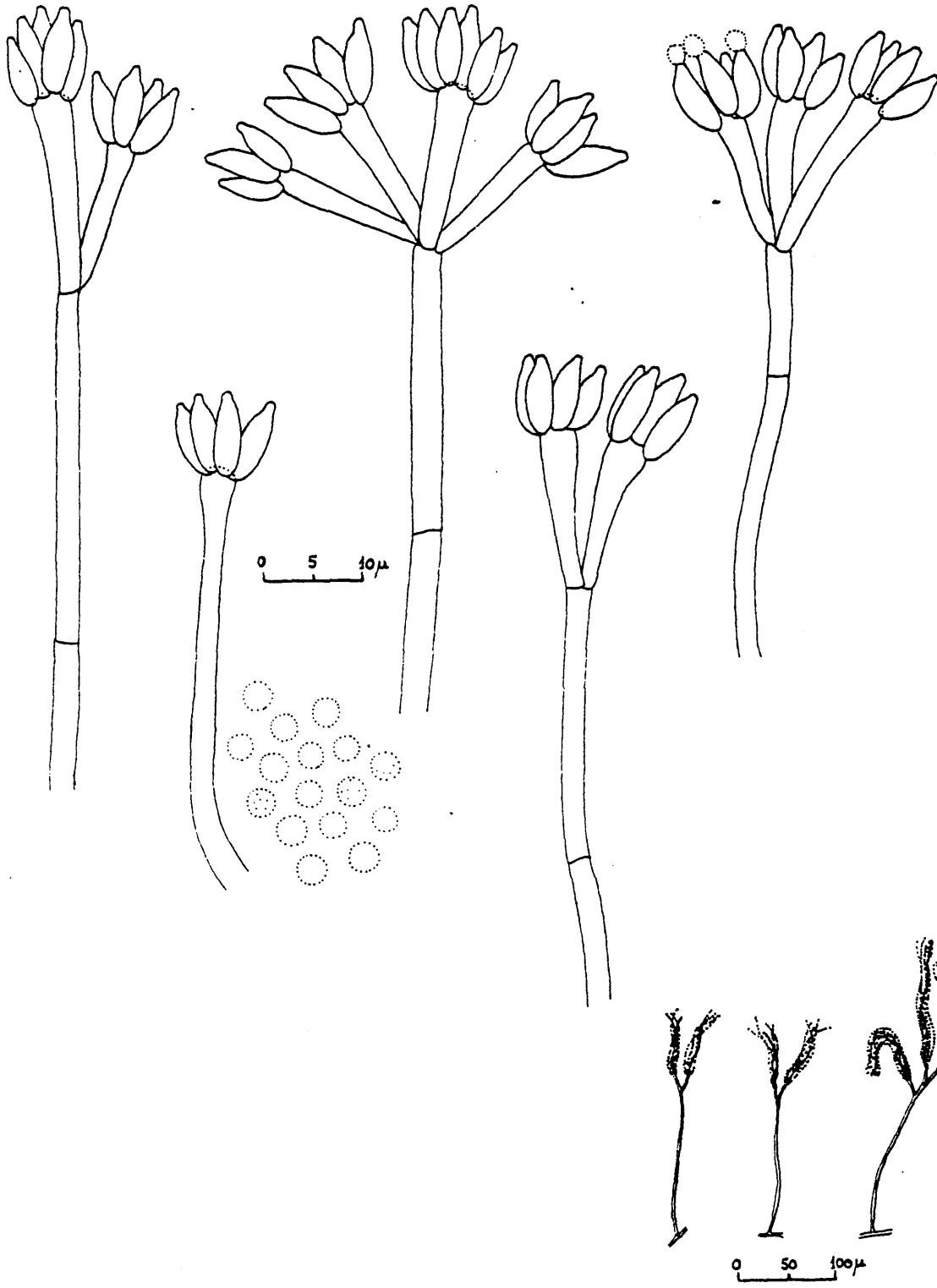


Penicillium citreo-virens Abe ex Ramirez

Incluída en la Subsección Asimétrica-Velutina, esta especie presenta, como características más notables, colonias sobre Agar Solución de Czapek de crecimiento / restringido (20 a 30 mm. de diámetro a los 14 d. de cultivo a 25° C), aterciopeladas, surcadas radialmente y / con aspecto crateriforme. La intensidad de la esporulación depende de la cepa y en muchas de ellas origina una zonación concéntrica evidente, en tonos que van del azul verde al gris verde con la edad del cultivo. El reverso de las colonias desarrolla tonos de color que van del amarillo brillante al naranja-rosado. Asimismo, las colonias producen un pigmento amarillo anaranjado que se difunde en el agar circundante.

Microscópicamente, presenta penicilios raramente ramificados por debajo del nivel de las mótulas. / Conidióforos de pared lisa que presentan verticilos de 3 a 5 mótulas divergentes, de longitud variable (generalmente entre 13 y 25 μm .). Fiálides en racimos apiñados, que originan cadenas conidiales que se adhieren formando columnas bien definidas. Conidios globosos, de 3 a 3.5 / μm . de diámetro, lisos.

P. citrinum ha sido citado repetidas veces como productor de citrinina y ác. kójico.

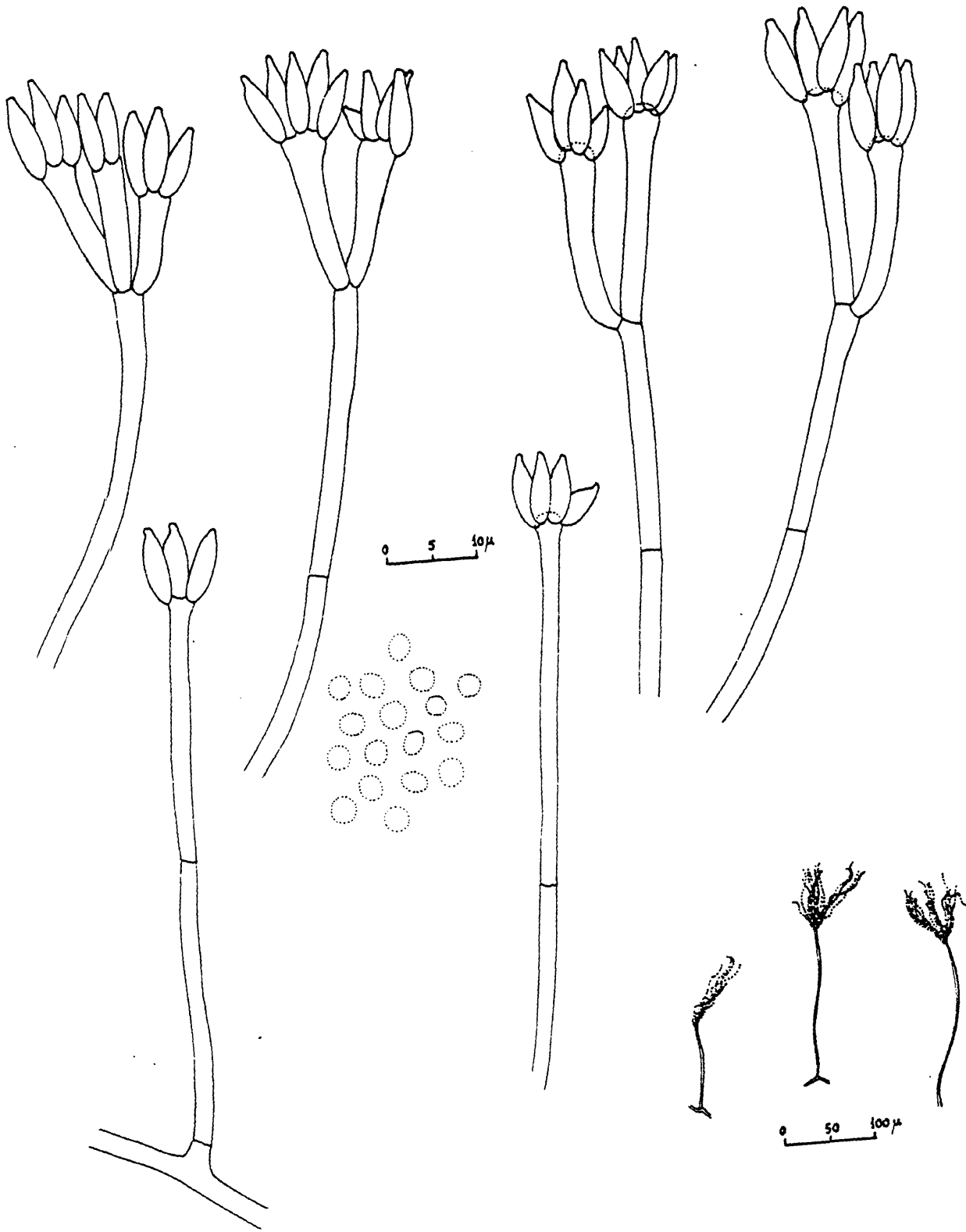


Penicillium citrinum Thom

Incluída en la Subsección Asimétrica-Velutina, esta especie origina colonias de crecimiento notable (alrededor de 40 mm. de diámetro) sobre Agar Solución de Czapek, en 14 d. a 25° C, aterciopeladas, profunda e intensamente surcadas radialmente, esporuladas en tonos azul-verde y zonadas debido al diferente grado de madurez de las zonas conidiales. Producen un pigmento coloreado, generalmente en tonos ámbar, que se difunde en el agar circundante. El reverso de las colonias desarrolla colores marrón claro a rojo-marrón e incluso tonos más oscuros, casi negros, en algunas áreas localizadas.

Microscópicamente, se aprecian penicilios variables, desde típicamente biverticilados asimétricos a monoverticilados. Los conidióforos presentan paredes lisas; las méticas se disponen típicamente en verticilos de 2-3 elementos, a menudo de desigual longitud; las filiales producen cadenas de conidios desde débilmente adheridas a enredadas entre si; conidios elípticos a subglobosos, de 3-4 μ m. de diámetro, lisos.

P. corylophilum ha sido citado como productor de gliotoxina (Cole y Cox, 1.981).

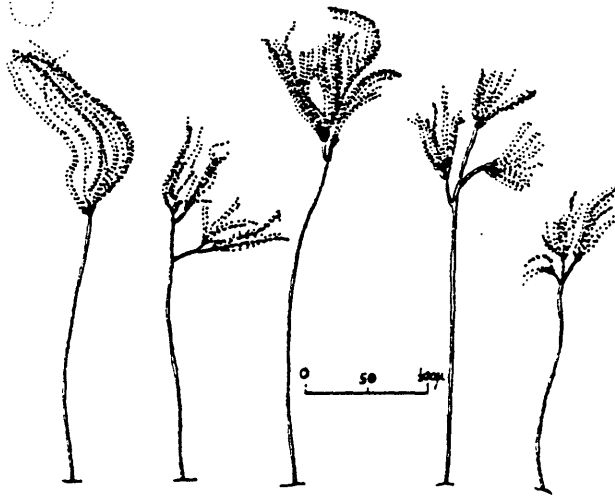
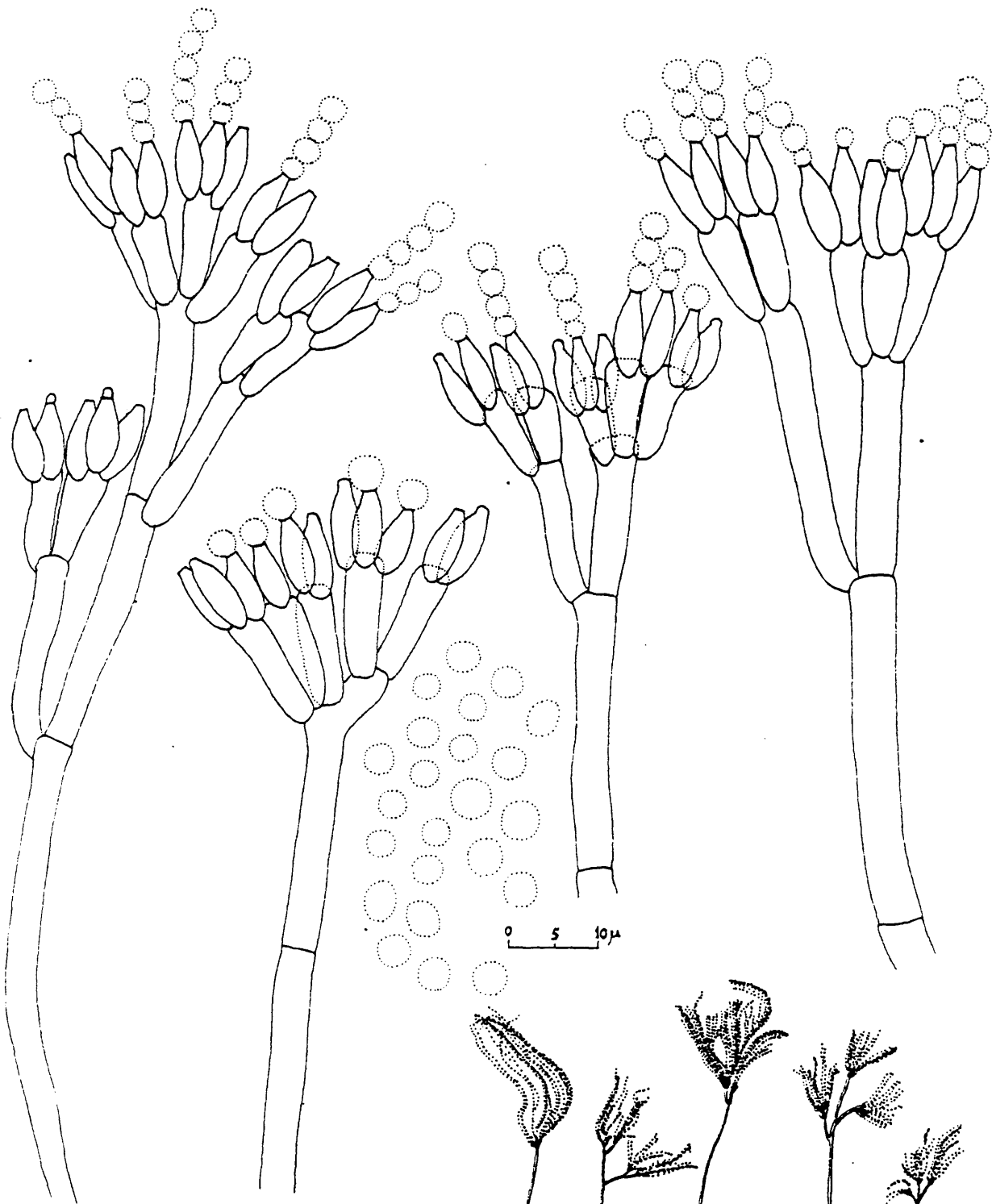


Penicillium corylophilum Dierckx

Incluída en la Subsección Asimétrica-Velutina, esta especie presenta colonias de crecimiento rápido (45 a 60 mm. de diámetro) sobre Agar Solución de Czapek, en cultivos de 14 d. a 25^o C, generalmente aterciopeladas, surcadas radialmente (sobre todo en Agar Solución de Czapek adicionado de extracto de levadura), esporuladas en tonos azul-verdosos. Muchas cepas presentan exudado abundante, en forma de gotas de color amarillo-oro. Reverso de las colonias coloreado brillantemente en tonos amarillos. En muchos casos producen un pigmento amarillo que difunde por el agar circundante de la colonia.

Microscópicamente, presenta penicilos largos, con los elementos (ramas, mótulas y fiálides) sueltamente dispuestos y a menudo algo divergentes. Conidióforos lisos. Mótulas generalmente de 9 a 14 μm . de longitud. / Fiálides con forma típica de botella, de 8 a 10 μm . de / longitud. Cadenas conidiales a menudo adheridas y formando columnas bien definidas. Conidios elípticos a subglobosos, menores de 5 μm . en su eje mayor (generalmente de 3 a 4 μm .), lisos.

Según datos recopilados por Cole y Cox, 1.981, P. chrysogenum ha sido citado como productor de micotoxinas, concretamente ác. penicílico, investigándose su posible potencial productor de patulina y citrinina.



Penicillium chrysogenum Thom

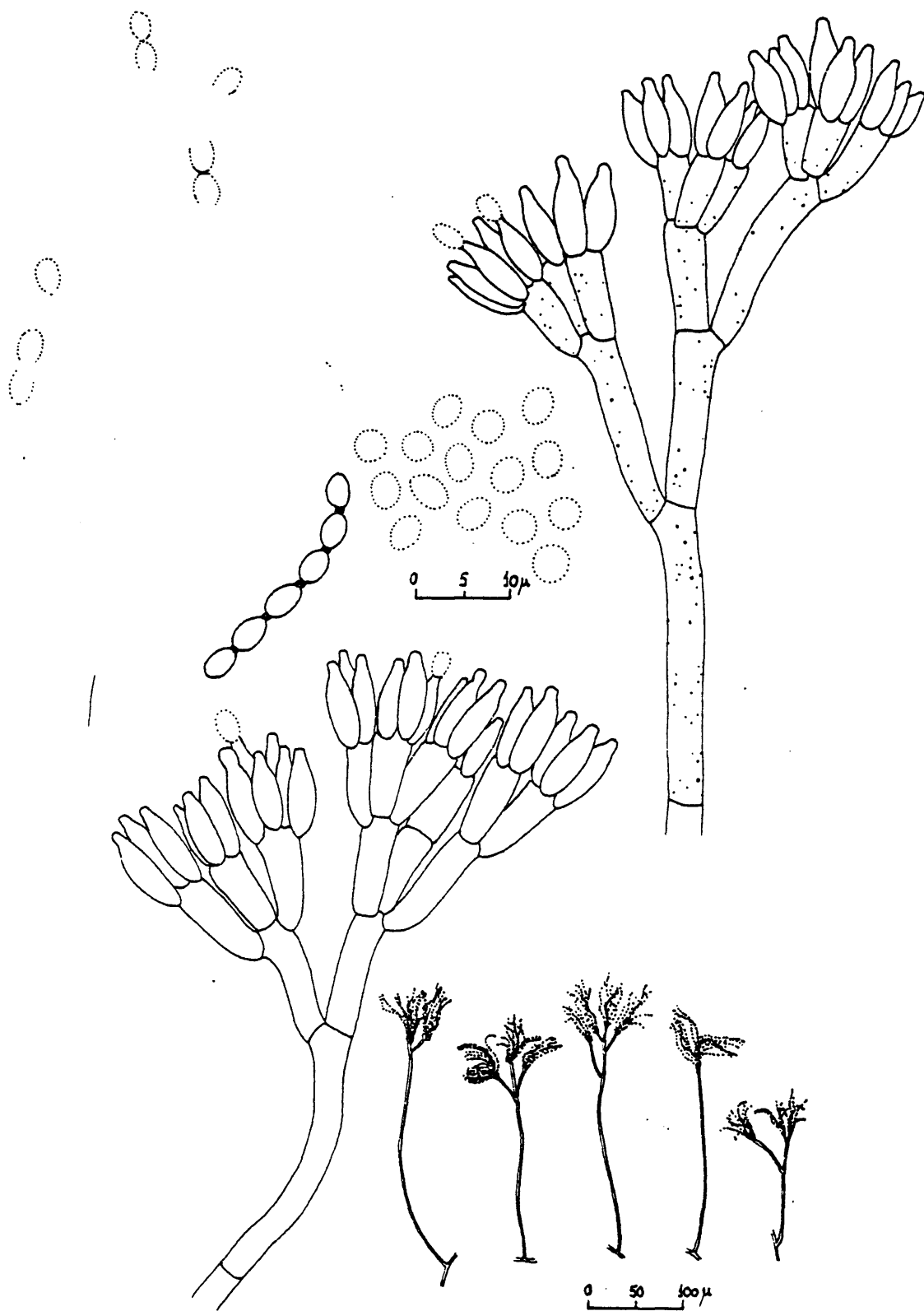
Incluída en la Subsección Asimétrica-Fasciculata, esta especie presenta, sobre Agar Solución de Czapek, colonias de crecimiento notorio (alrededor de 50 mm. de diámetro en 14 d. a 25^o C), intensamente esporuladas en tonos del verde-pardo al azul-verdoso, con reverso generalmente en tonos rojizos-anaranjados. Producen un pigmento ámbar que difunde por el agar que rodea a la colonia, y un intenso y característico olor de manzanas en putrefacción, alteración que, por otra parte, produce típica y rápidamente este hongo sobre frutas pomáceas.

Conidióforos abundantes que, usualmente, se agrupan en sinemas que dan a la superficie de la colonia un característico aspecto granular y una zonación intensa en anillos concéntricos de sinemas alternando con estructuras conidiales mononematosas.

Al microscopio presenta penicilos largos, asimétricos, varias veces ramificados por debajo del nivel de las méticas. Estípites lisos o casi. Ramas largas (20 a 60 μm). Méticas de 10 a 20 μm . Fiálides largas (8 a / 12 μm), finalizadas en un cuello corto y estrecho. Conidios elípticos en el momento de su formación, permaneciendo así o tornándose subglobosos, de 3 a 4 μm de diámetro en su eje mayor, lisos.

Según datos recopilados por Cole y Cox (1.961)

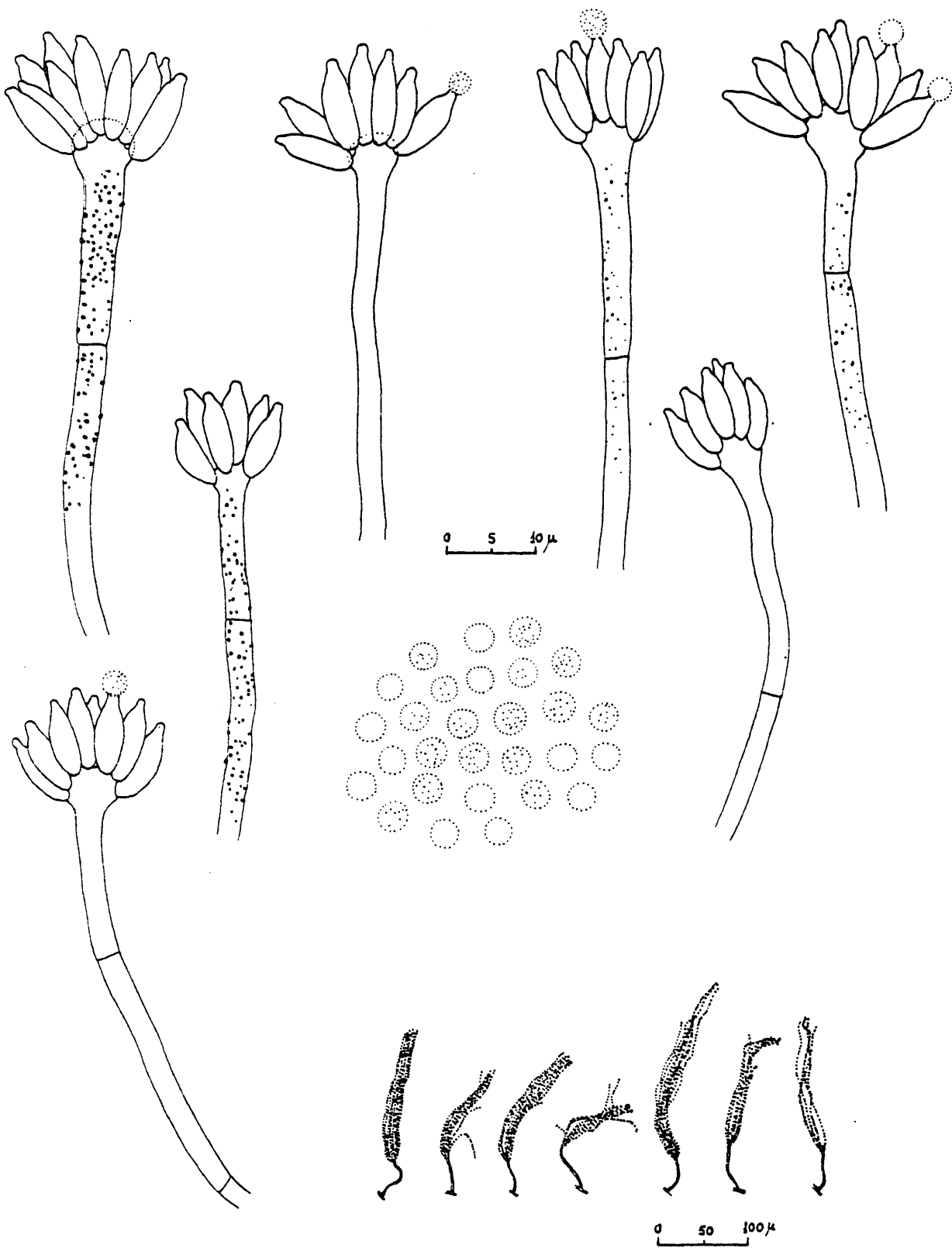
cotoxinas: rugulosina, citrinina y, sobre todo, patulina. Esta última micotoxina parece ser constantemente producida por la mayoría de las cepas de este hongo, tanto en / cultivos de laboratorio como en experiencias de inoculación en frutas pomáceas en las que provoca típicas lesiones.



Penicillium expansum Link ex Gray emend. Thom

Incluída en la Sección Monoverticillata, esta especie presenta, sobre Agar Solución de Czapek, colonias de crecimiento rápido, que alcanzan 50 a 60 mm. de diámetro a los 14 d. de cultivo a 25^o C, aterciopeladas a algo floccosas, fuertemente esporuladas en tonos que van del / verde al verde grisáceo con la edad del cultivo. Reverso en tonos marrón-anaranjado a púrpura-rojizo.

Conidióforos que surgen del sustrato, cortos, con estípites de hasta 200 μm . de longitud, de paredes finamente rugosas a lisas, no ramificados, estrictamente monoverticilados, ensanchados en una vesícula apical de aproximadamente 5-6 μm . de diámetro, que sustenta un apretado verticilo de 10, 12 o más fiálides, de 8 a 12 μm . de longitud. Los conidios, producidos en cadenas, se adhieren generalmente formando una columna bien definida de / hasta 150 μm . de longitud; conidios globosos a subglobo--sos, de 2.5 a 3.5 μm . de diámetro (generalmente, entre 3 y 3.5 μm .), lisos a muy finamente rugosos.



Penicillium frequentans Westling

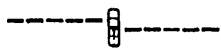
Incluída en la Sección Monoverticillata, esta especie presenta, sobre Agar Solución de Czapek, colonias que alcanzan alrededor de 40 mm. en 14 d. a 25° C, aterciopeladas, esporuladas en tonos gris-verde, con estructuras conidiales que se entremezclan con un crecimiento superficial de micelio estéril blanquecino. Reverso en tonos crema.

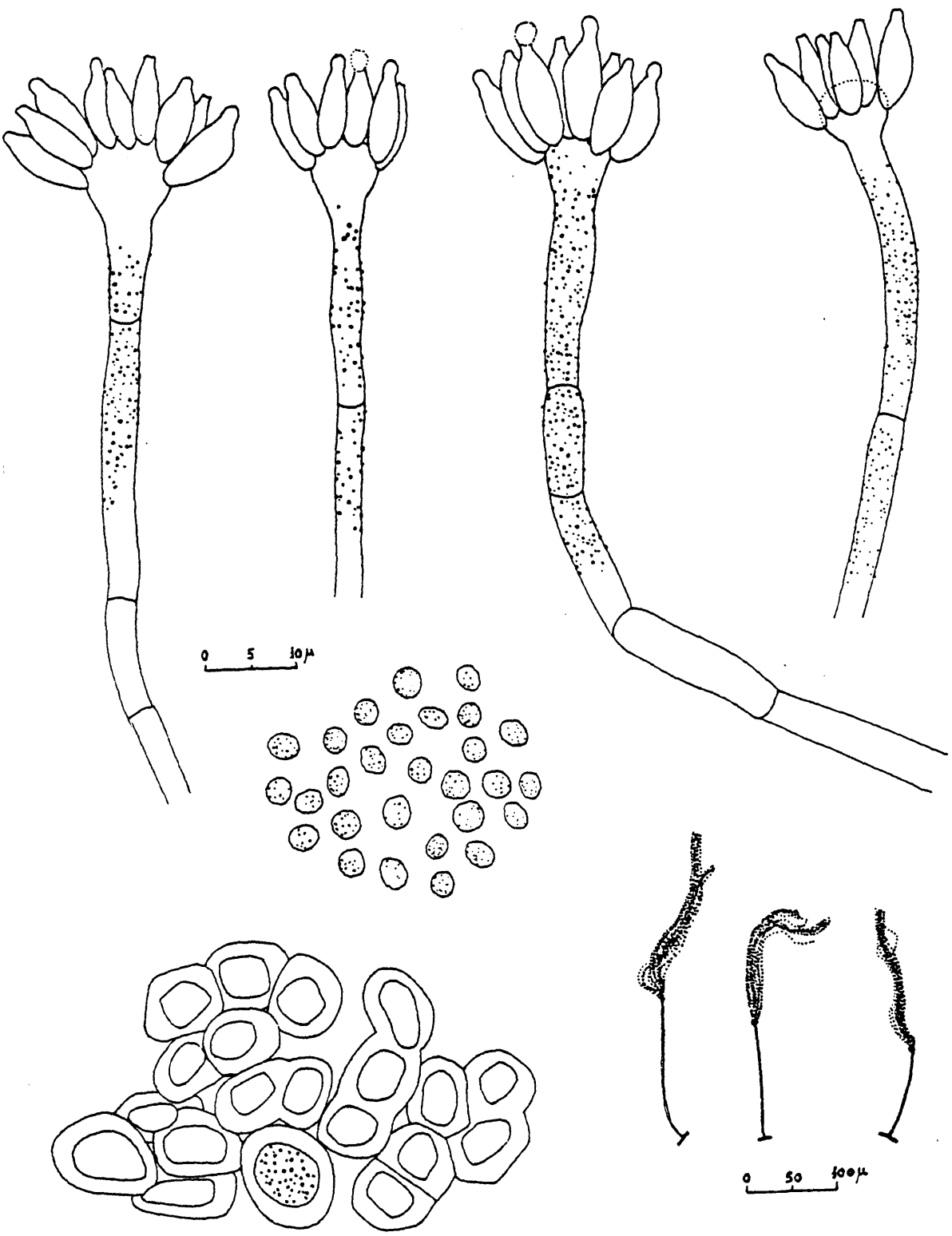
Conidióforos simples que surgen del sustrato; estípites cortos (90-150 μm . de longitud), de paredes rugosas, ensanchados en una vesícula apical de 6 a 9 μm . / de diámetro, que sustenta un apretado verticilo de 8-12 fiálides.

Fiálides de 8 a 12 μm . de longitud.

Conidios producidos en cadenas que se adhieren formando una columna bien definida de hasta 200 μm . de longitud. Conidios elípticos a subglobosos, de 2.5 a 3.5 μm . de diámetro, rugosos.

No se han observado, sobre Agar Solución de / Czapek, estructuras semejantes a esclerocios, pero sobre Agar-Extracto de malta-Glucosa-Peptona se pueden apreciar unos cuerpos blandos, semejantes a esclerocios, con paredes constituídas por células poliédricas pseudoparequimatosas.



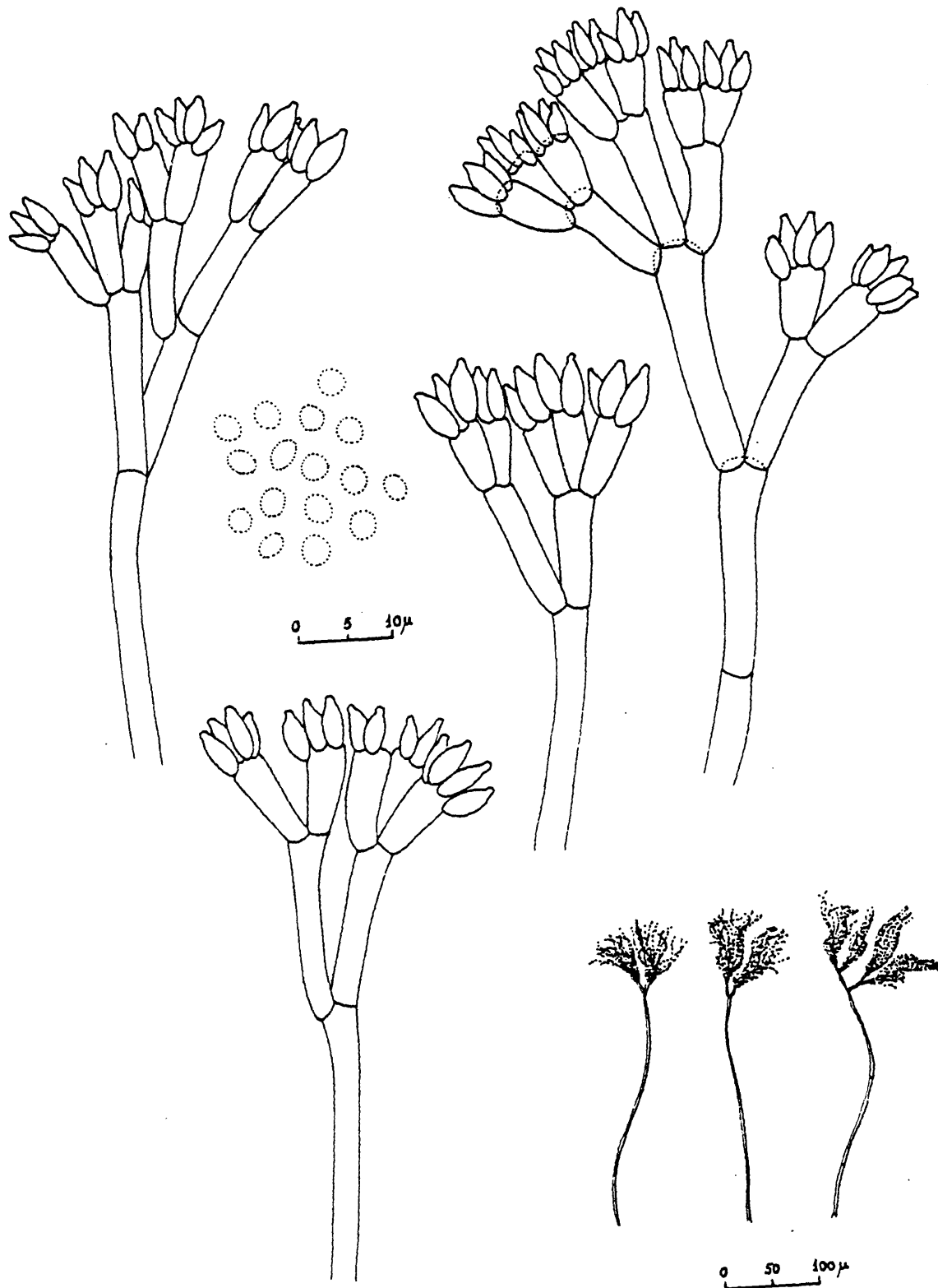


Penicillium grancanariae Ramirez, Martinez et Ferrer

Incluída en la Subsección Asimétrica-Fasciculata, esta especie presenta, sobre Agar Solución de Czapek, colonias que alcanzan alrededor de 25-30 mm. de diámetro en 14 d. a 25° C, de aspecto crateriforme y con sinemas distinguibles al menos en las áreas marginales. Es poruladas en tonos verde-grisáceo o azul-grisáceo. Reverso en tonos crema a marrón-rojizo.

Conidióforos mononematosos o sinematosos. Penicilos con ramas divergentes de 15 a 25 μm . de longitud. Estípites de paredes lisas sobre Agar Solución de / Czapek y sobre Agar Extracto de malta-Glucosa-Peptona. / Métulas cortas, de 6 a 9 μm . de longitud. Fiálides muy / cortas, de 4 a 6 μm . de longitud, con un cuello muy corto. Conidios ovales a subglobosos, de 2.5 a 3 μm . de diámetro, lisos.

Según datos recopilados por Cole y Cox (1.981) P. griseo-fulvum es capaz de producir diversas sustancias que se han conceptualizado como micotoxinas: Patulina, ác. kójico, griseofulvina, isopatulina, declorogriseofulvina.



Penicillium griseo-fulvum Dierckx

Incluído en la Subsección Asimétrica-Divaricata, P. janthinellum constituye la especie tipo de una de las series que constituyen dicha Subsección. Presenta, / sobre Agar Solución de Czapek, colonias de crecimiento / variable, generalmente algo restringido, que alcanzan un diámetro de 30 a 35 mm. en 14 d. a 25^o C, arrugadas en / su zona central y surcadas radialmente en las áreas marginales, esporuladas tardíamente en tonos de gris a gris azulado. Reverso coloreado en tonos anaranjado a rojizo.

Conidióforos que surgen del sustrato o que nacen sobre ramas cortas de hifas aéreas.

Penicilos característicamente divaricados, en ocasiones con apariencia monoverticilada.

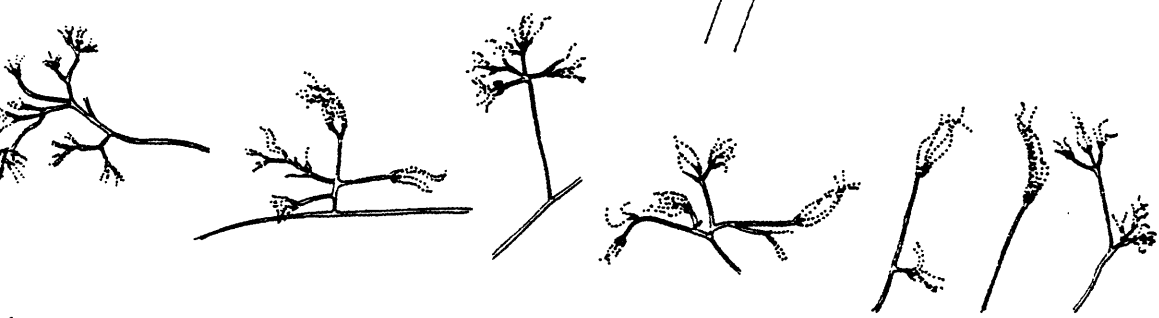
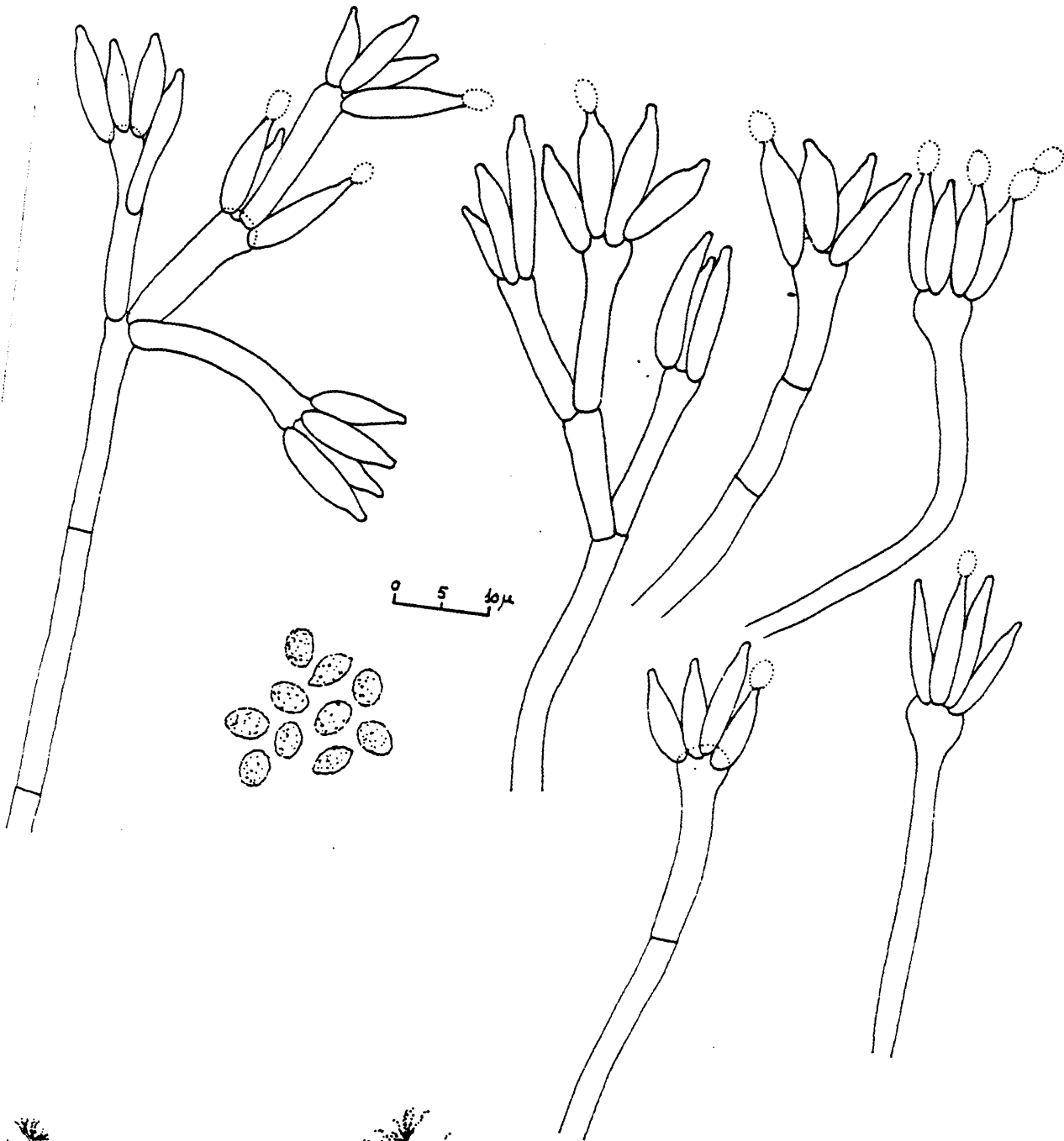
Estípites de paredes lisas.

Métulas de hasta 20 μ m. de longitud, usualmente con el ápice algo ensanchado.

Fiálides de 8 a 15 μ m. de longitud, bruscamente apuntadas hacia un cuello estrecho y largo, siendo ésta una característica distintiva de la serie.

Conidios originados en cadenas divergentes, elípticos, de unas 4 μ m. de diámetro mayor, rugosos.

Según los datos recopilados por Cole y Cox, / (1.981), P. janthinellum es capaz de producir micotoxi--nas: verruculógeno, ác. penicílico.



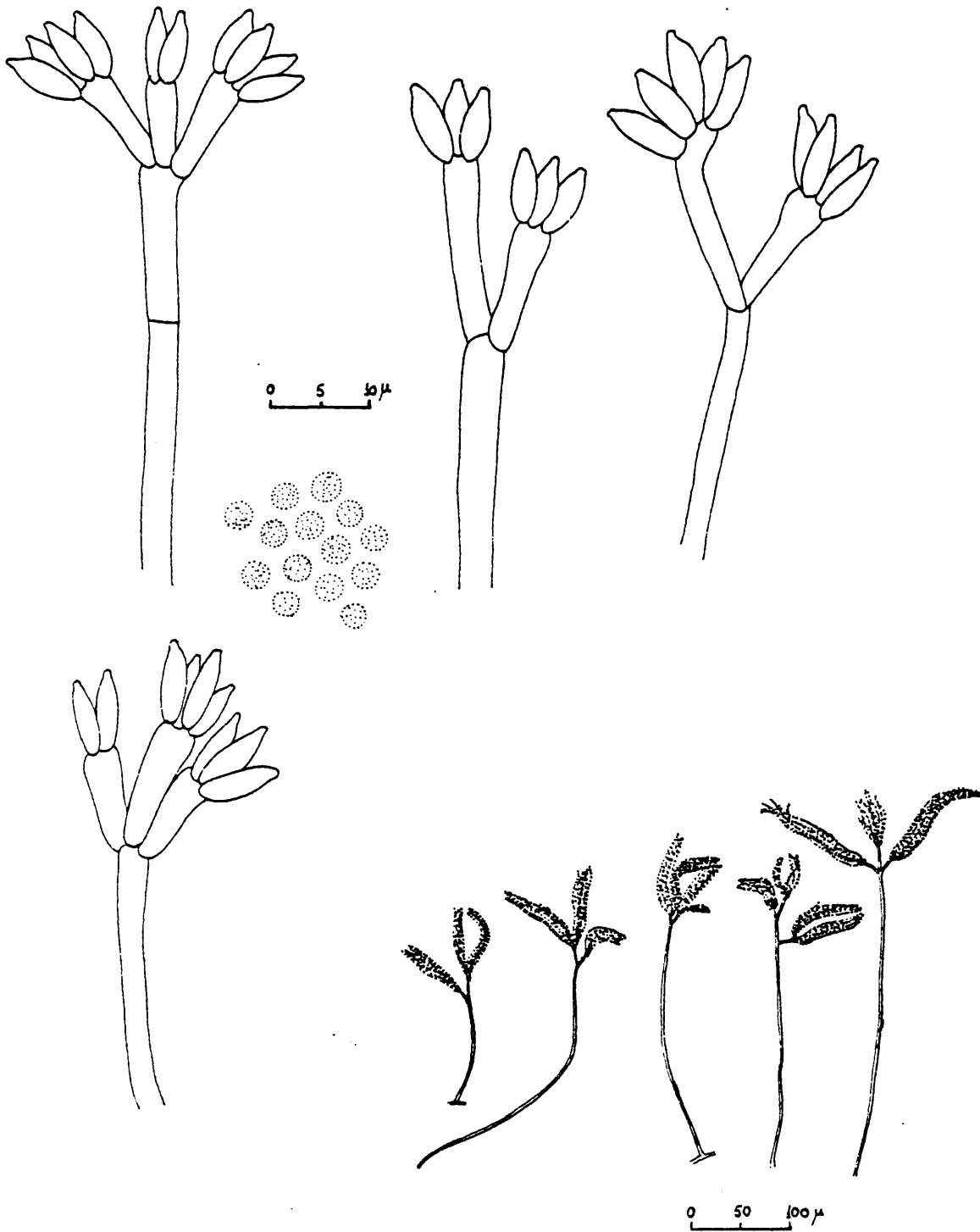
Microcillium janthinellum Biourge

Incluido en la Subsección Asimétrica-Divari-
ta, serie del P. canescens, P. jensenii presenta colo-
nias de crecimiento restringido sobre Agar Solución de /
Czapek (alrededor de 30 mm. de diámetro en 14 d. a 25°C),
de apariencia algo lanosa, con los bordes levantados y /
la superficie surcada radialmente. Esporulación no dema-
siado abundante, en tonos de color verde, entremezclán-
dose las estructuras conidiales con micelio blanco esté-
ril, lo que le proporciona la apariencia lanosa a las co-
lonias. Reverso en tonos anaranjado a rojizo, no desarro-
llando colores oscuros. Pigmento en tonos semejantes que
difunde por el agar circundante.

Conidióforos con estípites de paredes usual-
mente lisas, surgiendo desde el sustrato o desde hifas /
aéreas. Penicilos divaricados compuestos generalmente /
por grupos terminales de 2 a 3 mótulas divergentes, de 9
a 20 μm . de longitud, que sustentan fiálidas de 7 a 10 /
 μm . de longitud.

Los conidios se originan en largas cadenas /
que se adhieren entre si formando columnas divergentes.
Conidios globosos, de 2.5 a 3 μm . de diámetro, rugosos.

Según Cole y Cox (1.981), P. jensenii ha sido
citado como productor de citrinina.



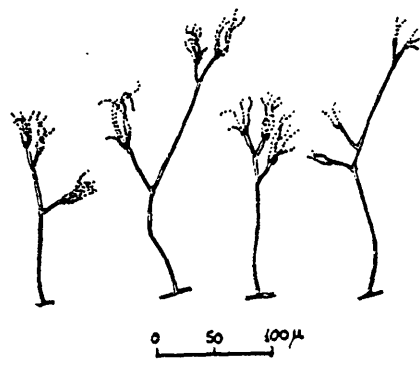
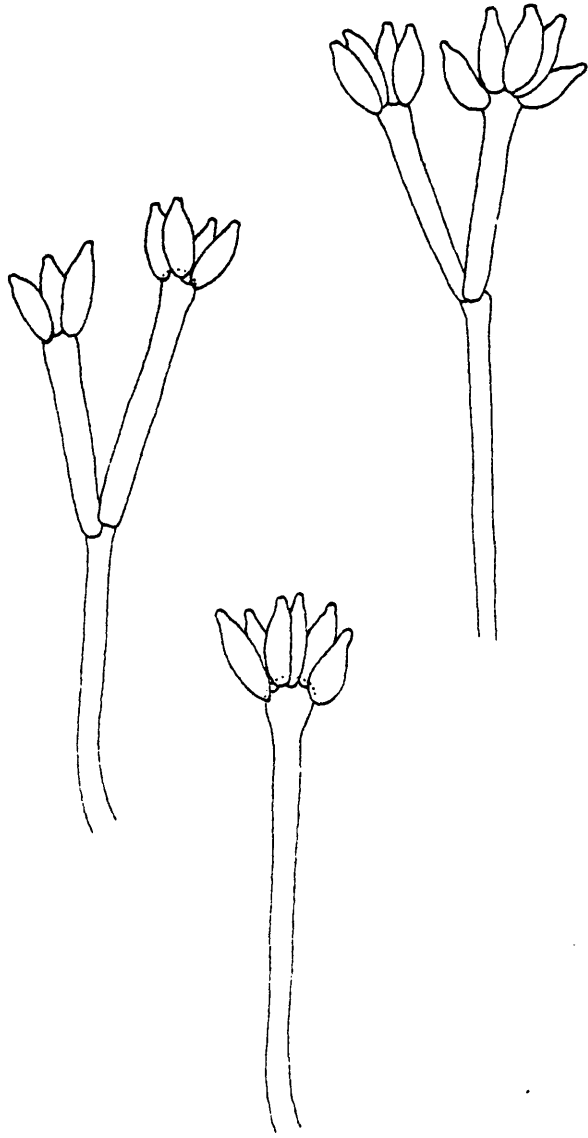
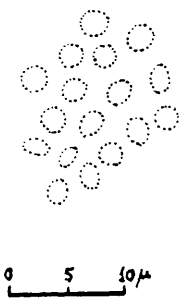
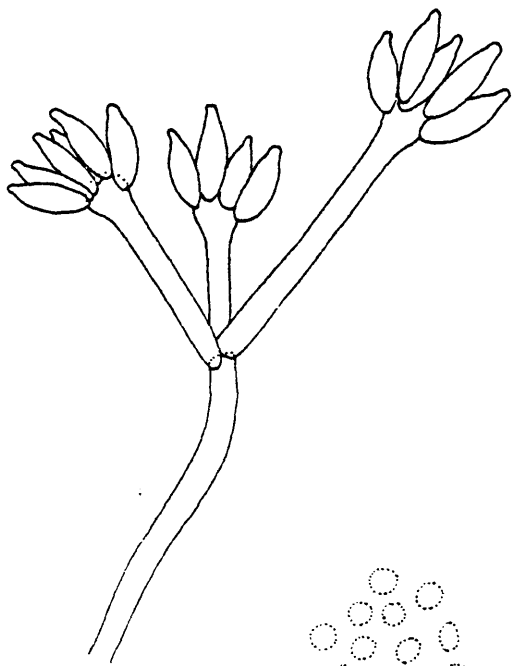
Penicillium jensenii Zaleski

Incluído en la Subsección Asimétrica-Divarica
ta, serie del P. janthinellum, P. miczynskii presenta, /
sobre Agar Solución de Czapek, colonias que alcanzan hasta
40 mm. de diámetro en 14 d. a 25^o C, aterciopeladas,
de aspecto cerebriforme, esporuladas en tonos azulados /
(azul grisáceo a azul verdoso). Reverso en tonos anaranjados.

Penicilos fuertemente divaricados (aunque se
observan algunas estructuras conidiales monoverticiladas)
que constan por lo general de 2-3 métulas de longitud de
sigual en el ápice de un estípite de paredes lisas.

Fiálides menores de 10 μ m. de longitud, usualmente
entre 7 y 9.

Conidios pequeños, de hasta 2.5 μ m. de diáme-
tro, ovales, lisos.



Penicillium miczynskii Zaleski

Incluída en la Subsección Asimétrica-Velutina, esta especie presenta, sobre Agar Solución de Czapek, colonias de crecimiento rápido que alcanzan 50 a 60 mm. de diámetro en 14 d. a 25° C, planas, aterciopeladas, fuertemente esporuladas en tonos verde-azulados. Reverso desde incoloro a tonos de marrón oscuro o rosados. Pueden producir pigmento difusible en el agar circundante, en tonos ámbar-anaranjado.

Penicilos típicamente ramificados por debajo del nivel de las métulas, asimétricos.

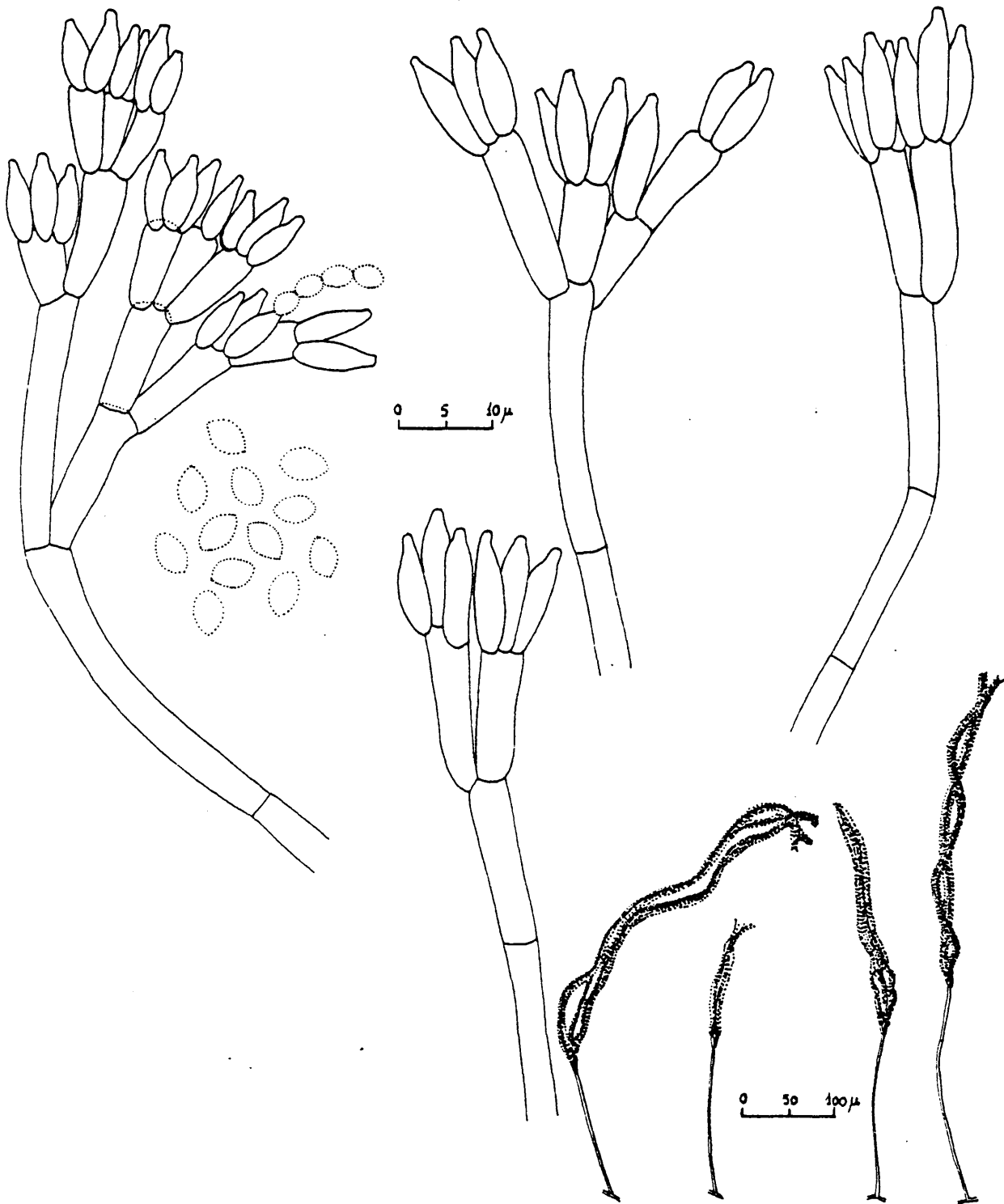
Estípites que oscilan entre 150 y 250 μm . de longitud, de paredes lisas, que nacen desde el sustrato.

Métulas generalmente de hasta 20 μm . de longitud.

Fiálides de 8 a 15 μm . de longitud, que originan cadenas de conidios que se adhieren formando sueltas columnas de gran longitud (que incluso superan las 350 / μm .), de apariencia sedosa.

Conidios fuertemente elípticos, usualmente de unas 5 μm . de diámetro mayor, lisos.

Según Cole y Cox (1.981), P. oxalicum ha sido citado como productor de ác. secalónico D.



Penicillium oxalicum Currie et Thom

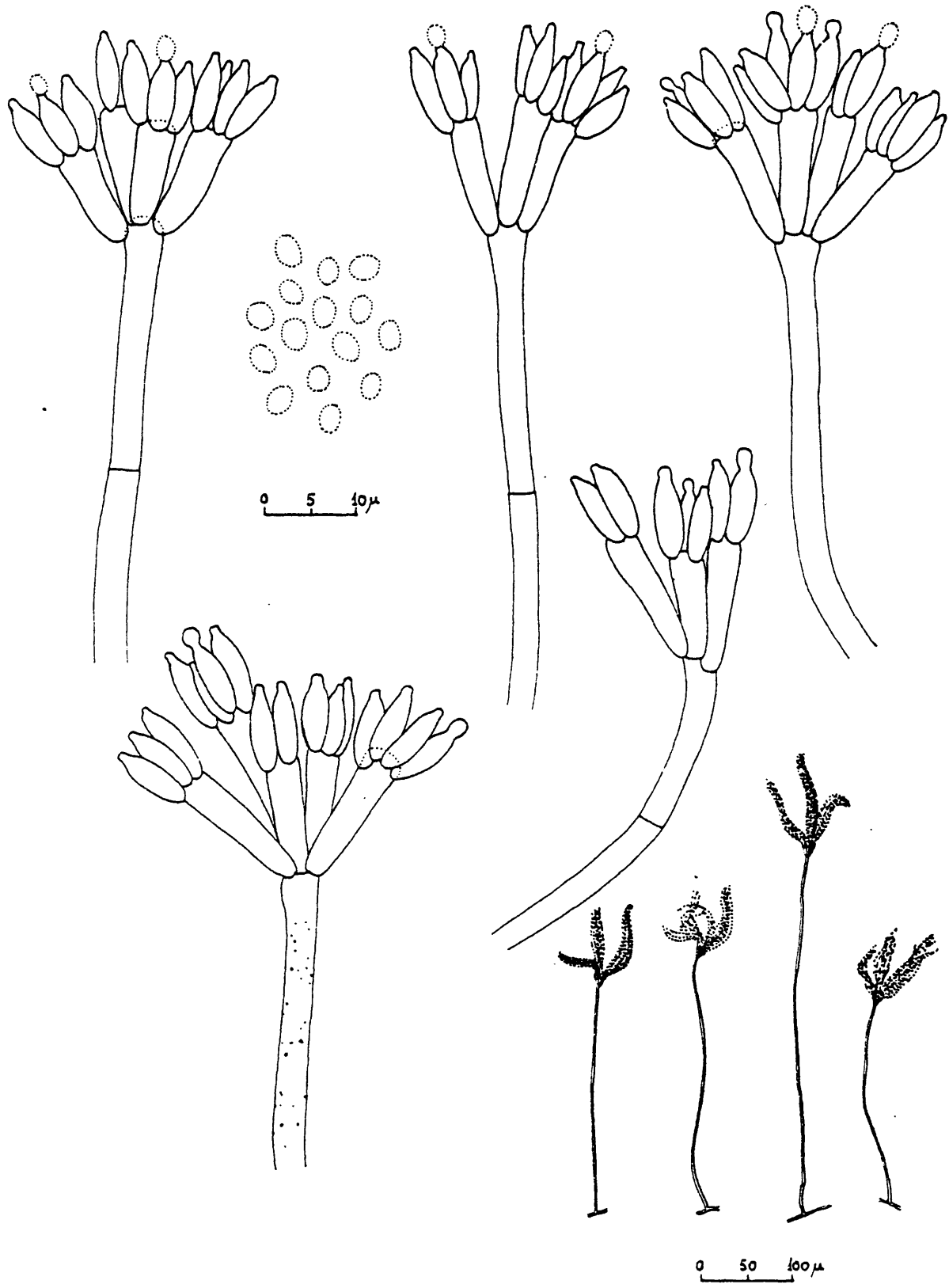
Incluído en la Subsección Asimétrica-Velutina, P. paxilli puede ser situado en las series del P. citrinum o del P. brevi-compactum, debido a sus características micromorfológicas. Sobre Agar Solución de Czapek origina colonias de hasta 40-50 mm. de diámetro en 14 d. a 25° C, aterciopeladas o de superficie levemente lanosa, esporuladas en tonos crema a azul-verde. Reverso en suaves tonos crema a canela.

Penicilos típicamente biverticilados, constituidos por un verticilo terminal de 5-8 mótulas apretadas, de 11 a 15 (20) μm . de longitud, que sustentan fiálides de 7 a 10 μm . de longitud.

Conidióforos que surgen principalmente del / sustrato, con estípites de paredes lisas.

Conidios ovales, de 3 a 3.5 μm . de diámetro / mayor, lisos o casi.

Según Cole y Cox (1.981), P. paxilli ha sido citado como productor de paxillina, sustancia conceptualizada como micotoxina.

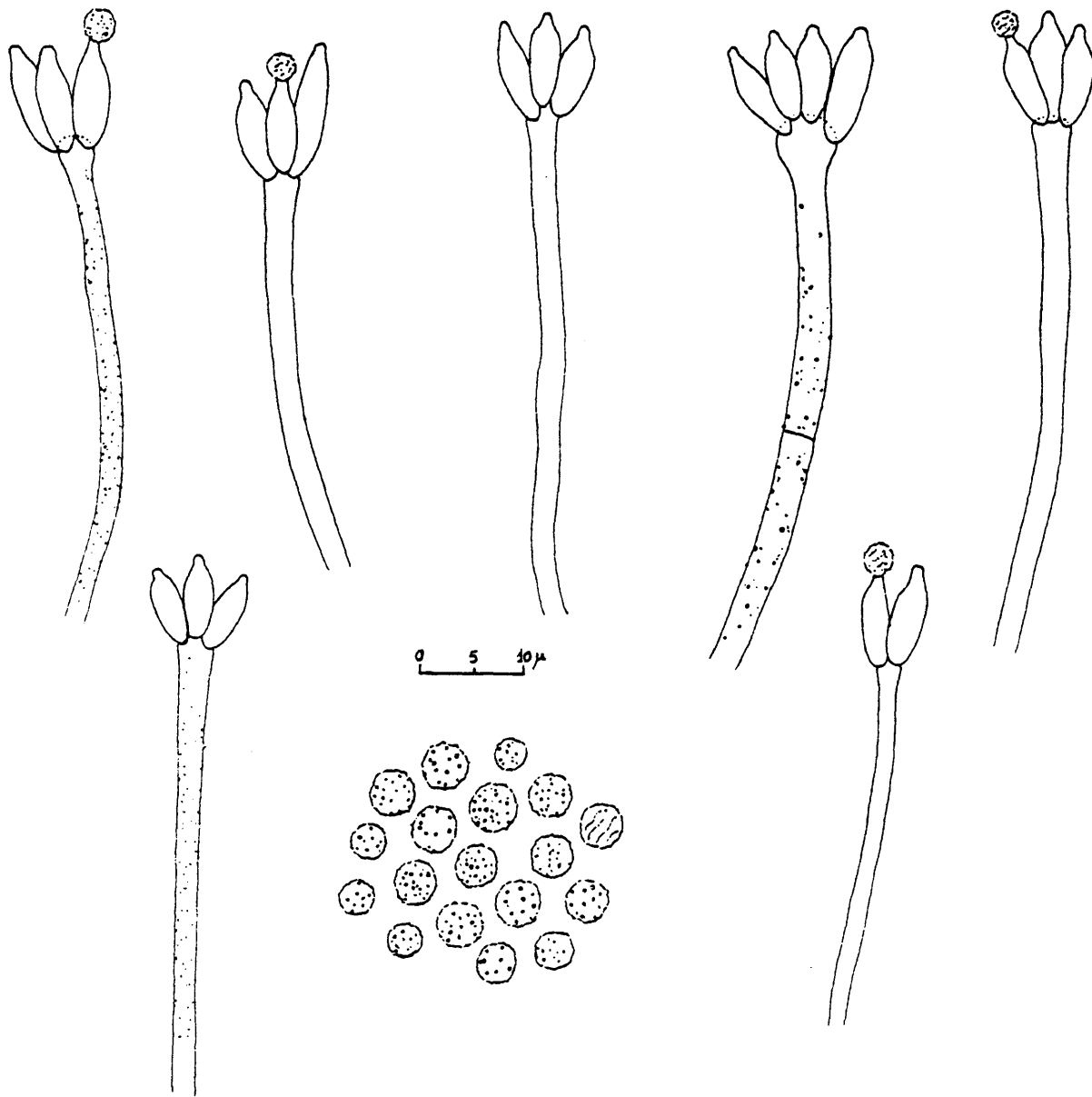


Penicillium paxilli Bainier

Perteneiente a la Sección Monoverticillata, e incluido en la serie del P. frequentans, P. purpurescens origina, sobre Agar Solución de Czapek, colonias de crecimiento rápido y extenso, que alcanzan 35-40 mm. de diámetro en 14 d. a 25° C (algo menos que el P. frequentans), aterciopeladas, fuertemente esporuladas en tonos de azul-verde oscuro. Reverso que desarrolla tonos del / púrpura rojizo o marrón. Pigmento coloreado en tonos semejantes que difunde por el agar circundante.

Penicilos estrictamente simples, monoverticillados, con estípites que surgen del sustrato, cortos (generalmente de longitud inferior a 100 μm .), de paredes / lisas a finamente rugosas, y ensanchados en una vesícula apical de 3.5 a 6 μm . de diámetro, que sustenta un apretado verticilo de 3 a 10 (o más) fiálides, de 7 a 10 (13) μm . de longitud.

Los conidios, producidos en cadenas, se adhieren en sueltas columnas de incluso más de 150 μm . de longitud. Conidios globosos a subglobosos, normalmente de / 3.5 a 4.5 μm . de diámetro, muy rugosos y de paredes / gruesas. Las características de los conidios constituyen importantes diferencias micromorfológicas que ayudan a / distinguir entre P. purpurescens y P. frequentans.



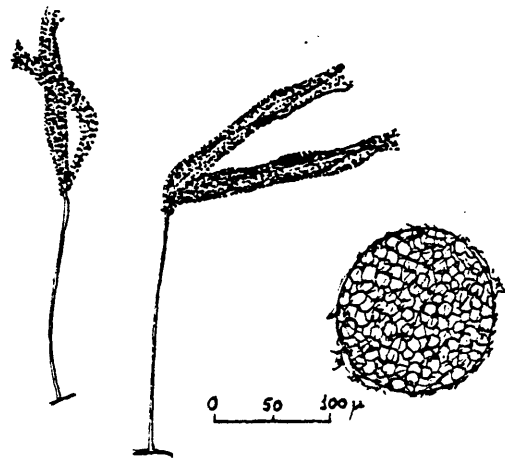
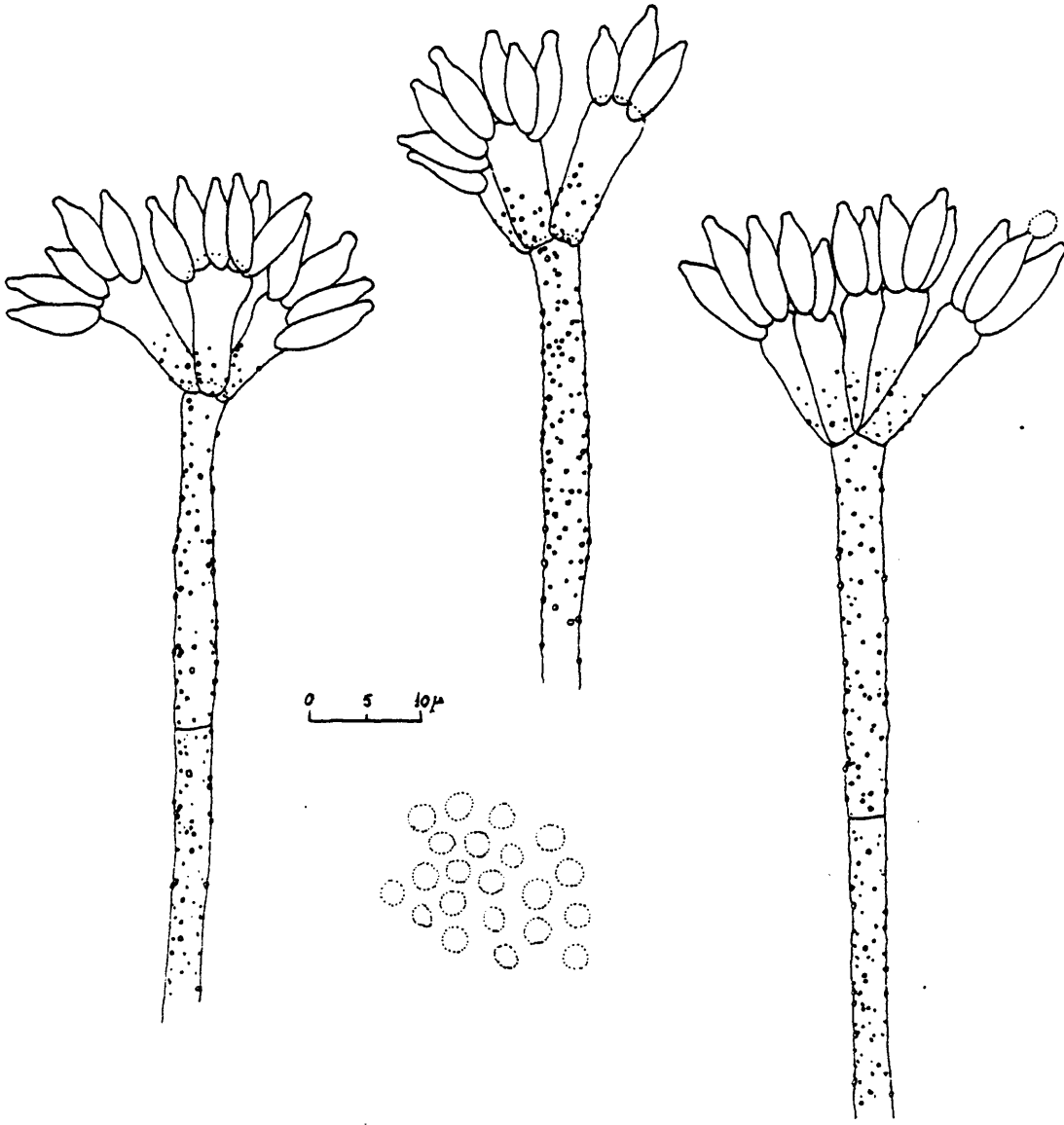
Penicillium purpurescens (Sopp) Raper et Thom

Incluída en la Subsección Asimétrica-Divariada, esta especie se caracteriza por originar, sobre Agar Solución de Czapek, colonias que producen esclerocios / subglobosos, bien desarrollados, pétreos, de unas 150 μm . de diámetro y de color blanco a rosa pálido. Son colonias aterciopeladas, que alcanzan un diámetro de 35 a 50 mm. en 14 d. a 25^o C, fuertemente esporuladas en tonos / verde-azulado a verde-grisáceo. Reverso en tonos crema-anaranjado.

Conidióforos que surgen del sustrato, con estípites rugosos y penicilos compuestos por un verticilo de 3 a 5 mótulas divergentes, claviformes, de 11 a 15 μm . de longitud, rugosas, que portan fiálides de 7 a 10 μm . de longitud.

Conidios producidos en largas cadenas que se adhieren en columnas divergentes de hasta 200 μm . de longitud. Conidios ovales a subglobosos, de 2 a 2.5 μm . de diámetro, lisos.

P. raistrickii ha sido citado como productor de ciertas sustancias conceptuadas como micotoxinas: terreína, griseofulvina. (Datos recopilados por Cole y Cox, 1.981).



Penicillium raistrickii Smith

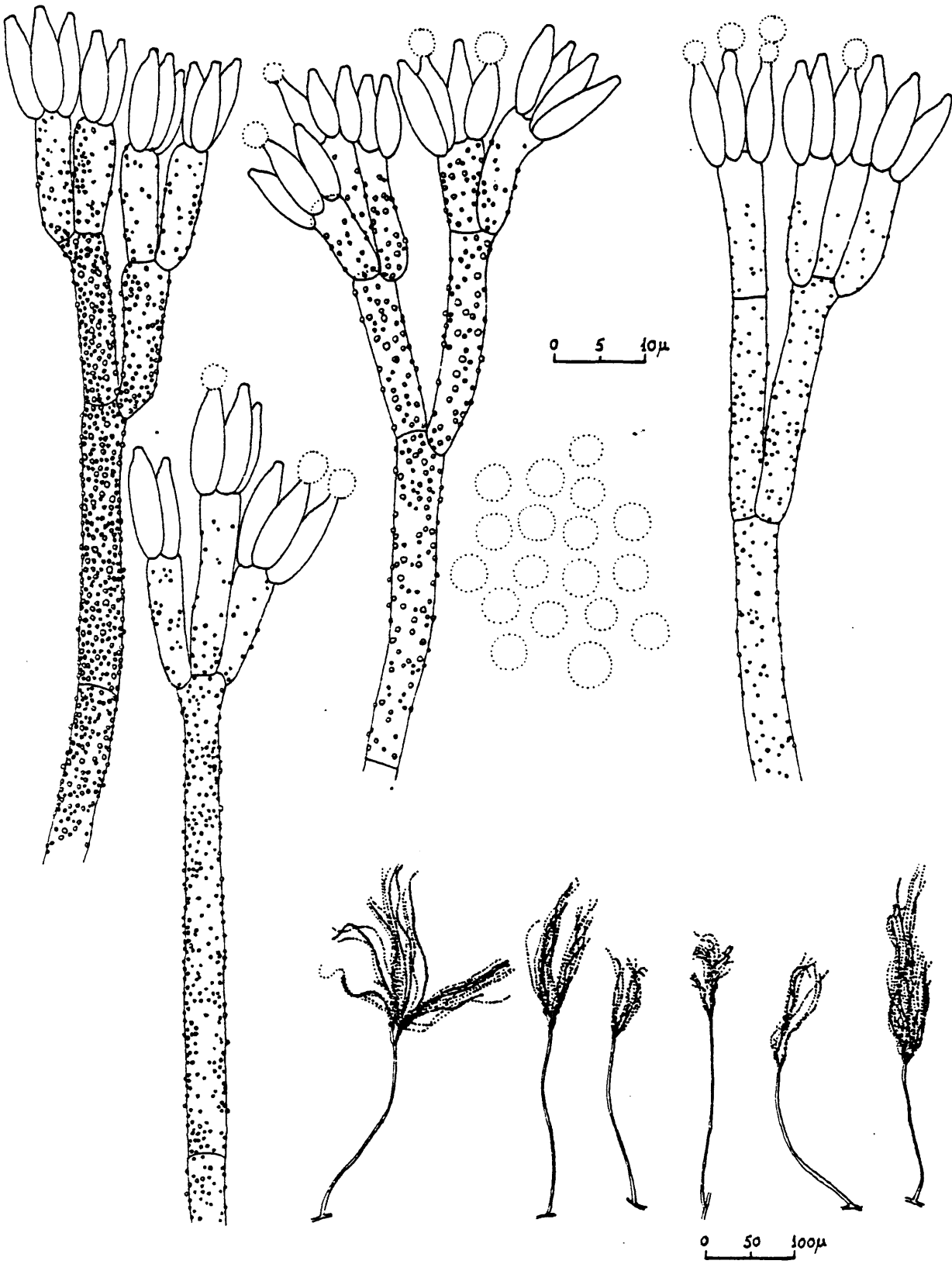
Incluído en la Subsección Asimétrica-Velutina, P. roqueforti produce, sobre Agar Solución de Czapek, co-
lonias de crecimiento rápido y esparcido, de hasta 50-60
mm. de diámetro en 14 d. a 25^o C, planas, aterciopeladas,
- intensamente esporuladas por toda su superficie en tonos
verde azulado a verde oscuro. Reverso que desarrolla co-
lores verdosos a marrón oscuro, casi negro.

Conidióforos que salen del sustrato, muy rugo-
sos, en ocasiones con apariencia verrugosa.

Penicilos largos, típicamente biverticilados
asimétricos, con ramas de 17 a 28 μm . de longitud y métu-
las de 10 a 20 μm ., ambas de paredes rugosas a verrugo--
sas. Fiálides generalmente de 9 a 13 μm . de longitud.

Conidios globosos, grandes (de hasta 6 μm . de
diámetro), habitualmente entre 4 y 5 μm . de diámetro, li-
sos.

A partir de cultivos de P. roqueforti se han
aislado diversas sustancias que se han conceptuado como
micotoxinas: toxina PR, roquefortinas A, B y C, patulina,
eremofortinas A, B y C, ác. penicílico. (Cole y Cox, /
1.981).



Penicillium roqueforti Thom

Incluido en la Subsección Asimétrica-Divari-
ca, serie del P. janthinellum, P. simplicissimum presen-
ta, sobre Agar Solución de Czapek, colonias que alcanzan
40 a 50 mm. de diámetro en 14 d. a 25° C, aterciopeladas,
surcadas radialmente, esporuladas intensamente en tonos
azulados a azul-verdosos. Reverso en tonos crema a ana--
ranjado.

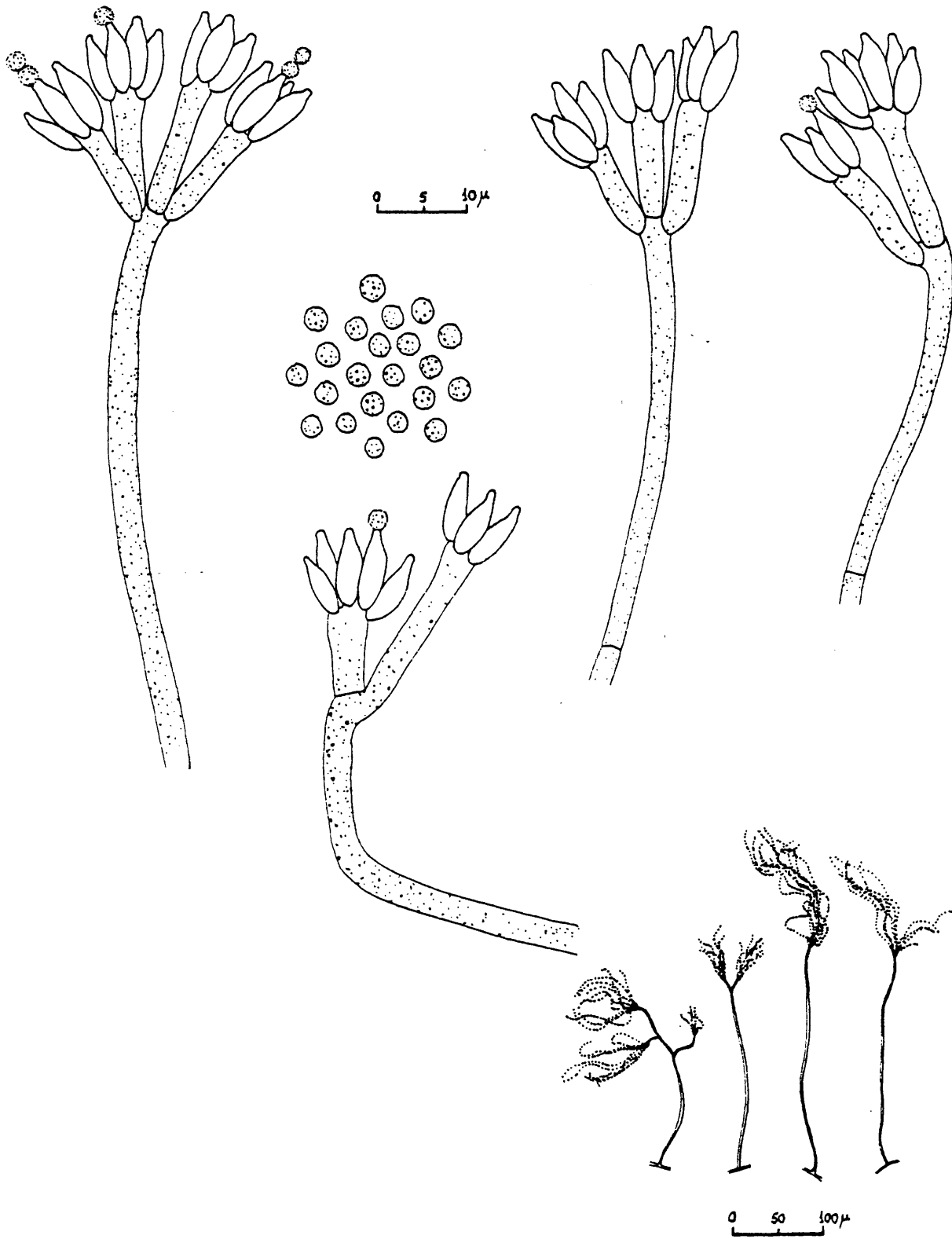
Conidióforos que salen del sustrato, con estí-
pites delicadamente rugosos, de longitud variable.

Penicilos que constan usualmente de un verti-
cilo terminal de 2 a 4 métulas divergentes, de 10 a 20 /
 μm . de longitud, finamente rugosas.

Fiálides generalmente entre 8 y 10 μm . de lon-
gitud, que producen cadenas de conidios paralelas a enma-
rañadas.

Conidios subglobosos, habitualmente entre 2.5
y 3 μm . de diámetro, rugosos.

Según Cole y Cox, P. simplicissimum ha sido /
citado como productor de ác. penicílico y decumbina.



Penicillium simplicissimum (Oudemans) Thom

Incluído en la Subsección Asimétrica-Velutina, serie del P. citrinum, P. steckii presenta, sobre Agar / Solución de Czapek, colonias de crecimiento restringido que alcanzan 30 mm. de diámetro en 14 d. a 25° C, aterciopeladas, surcadas radialmente, de esporulación usualmente zonada en círculos concéntricos y tonos de azul- / verde. Reverso en tonos amarillento, crema o anaranjado.

Conidióforos que surgen del sustrato, con estípites lisos.

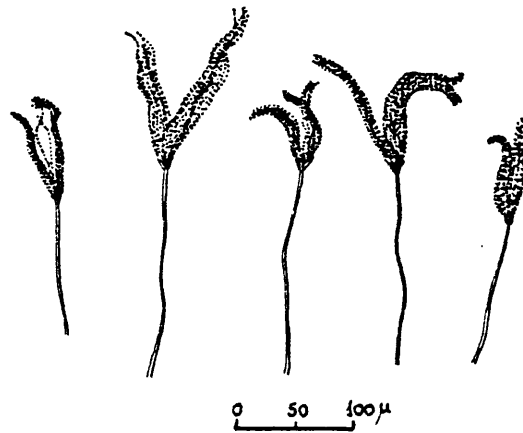
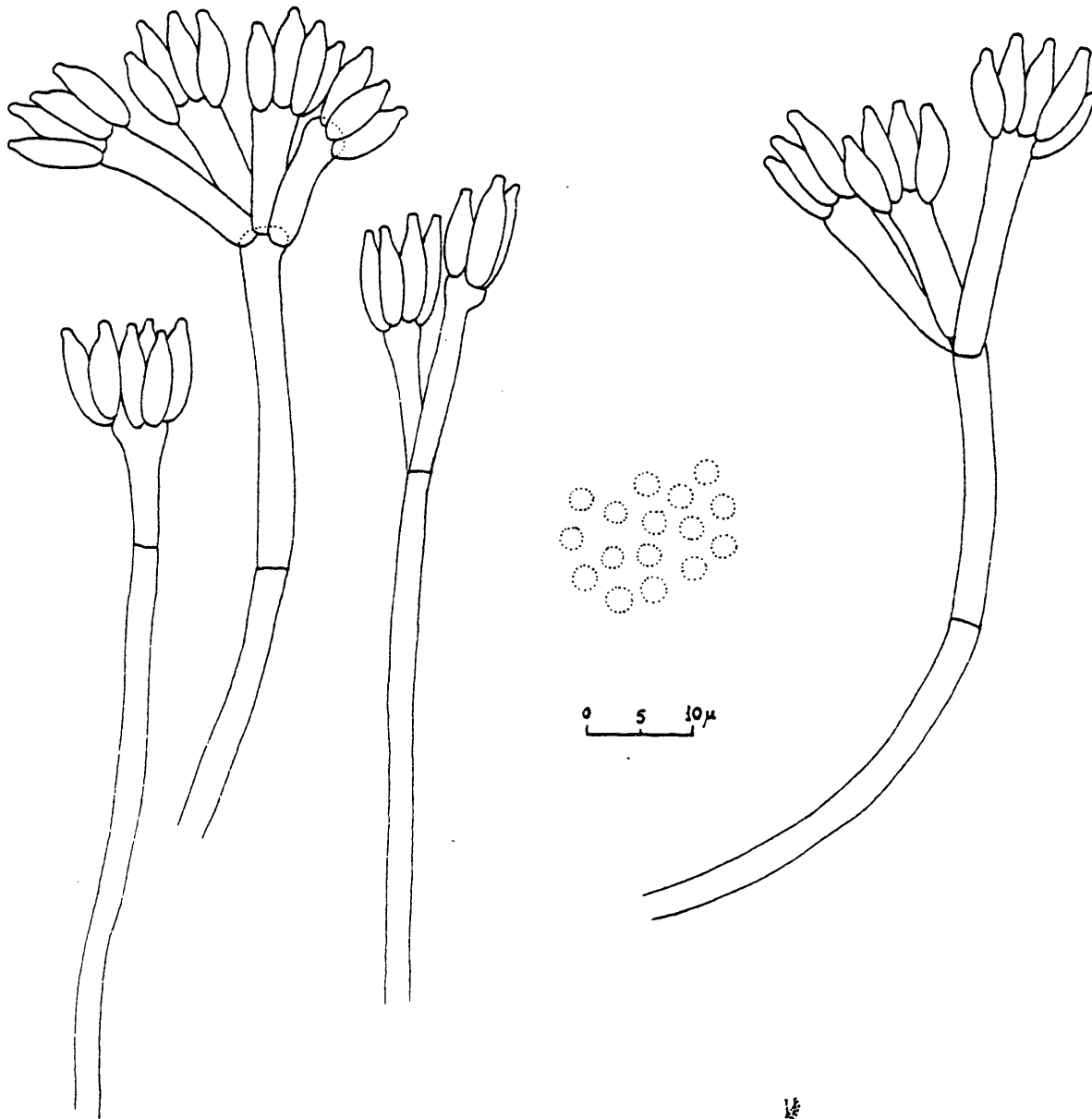
Penicilos raramente ramificados por debajo / del nivel de las méticas, usualmente constituidos por un verticilo terminal de 3 a 5 méticas; en ocasiones, aparecen penicilos monoverticilados.

Méticas entre 12 y 20 μ m. de longitud.

Fiálides en racimos apretados, generalmente / de 9 a 11 μ m. de longitud.

Conidios globosos, de 2 a 2.5 μ m. de diámetro, lisos. Cadenas conidiales usualmente adheridas entre sí formando columnas bastante definidas.

Según Cole y Cox (1.981), P. steckii ha sido citado como productor de citrinina.

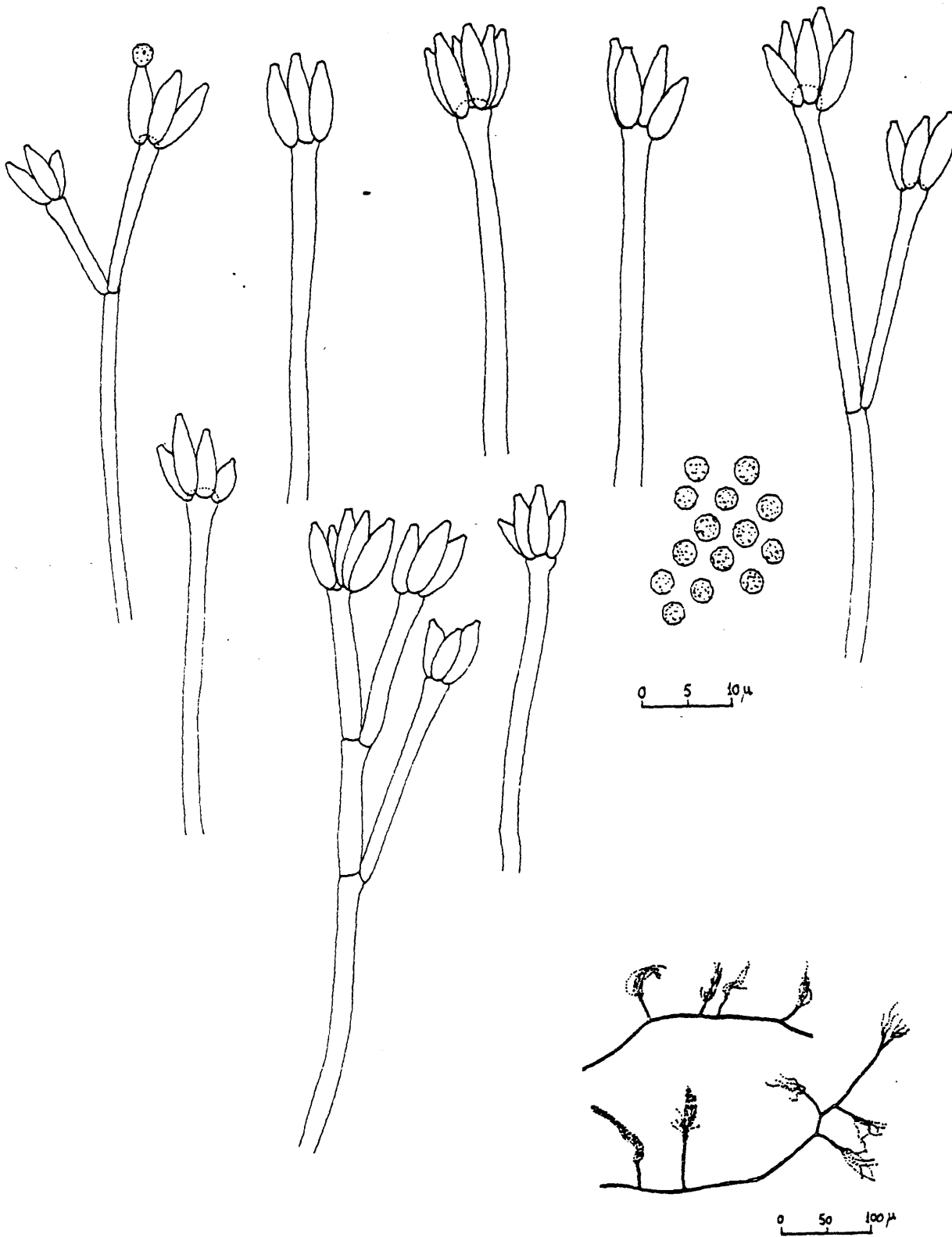


Penicillium steckii Zaleski

Incluido en la Sección Monoverticillata, serie Ramigena, P. velutinum presenta, sobre Agar Solución de Czapek, colonias de crecimiento rápido que alcanzan / 40 a 50 mm. de diámetro en 14 d. a 25° C, lanosas, esporuladas intensamente en tonos verdes por toda la superficie de la colonia, aunque la zona central aparece blanquecina como consecuencia del crecimiento superficial de micelio estéril. Reverso en tonos crema que pueden derivar a marrón rojizo con la edad del cultivo.

Estípites lisos que portan penicilos por lo / general ramificados irregularmente (en ocasiones, simples, monoverticilados), una o dos veces, cada rama (de longitudes desiguales) sustentando un penicilo terminal simple, de apariencia monoverticilada, con su parte apical ligeramente ensanchada en una vesícula de 3.5 a 4 μm . de diámetro. Sobre esta vesícula se distribuye un apretado racimo de fiálides, de 6 a 10 μm . de longitud.

Conidios subglobosos, generalmente de 3 a 3.5 μm . de diámetro, rugosos a levemente espinosos.



Penicillium velutinum van Beyma

P. verrucosum var. corymbiferum.-

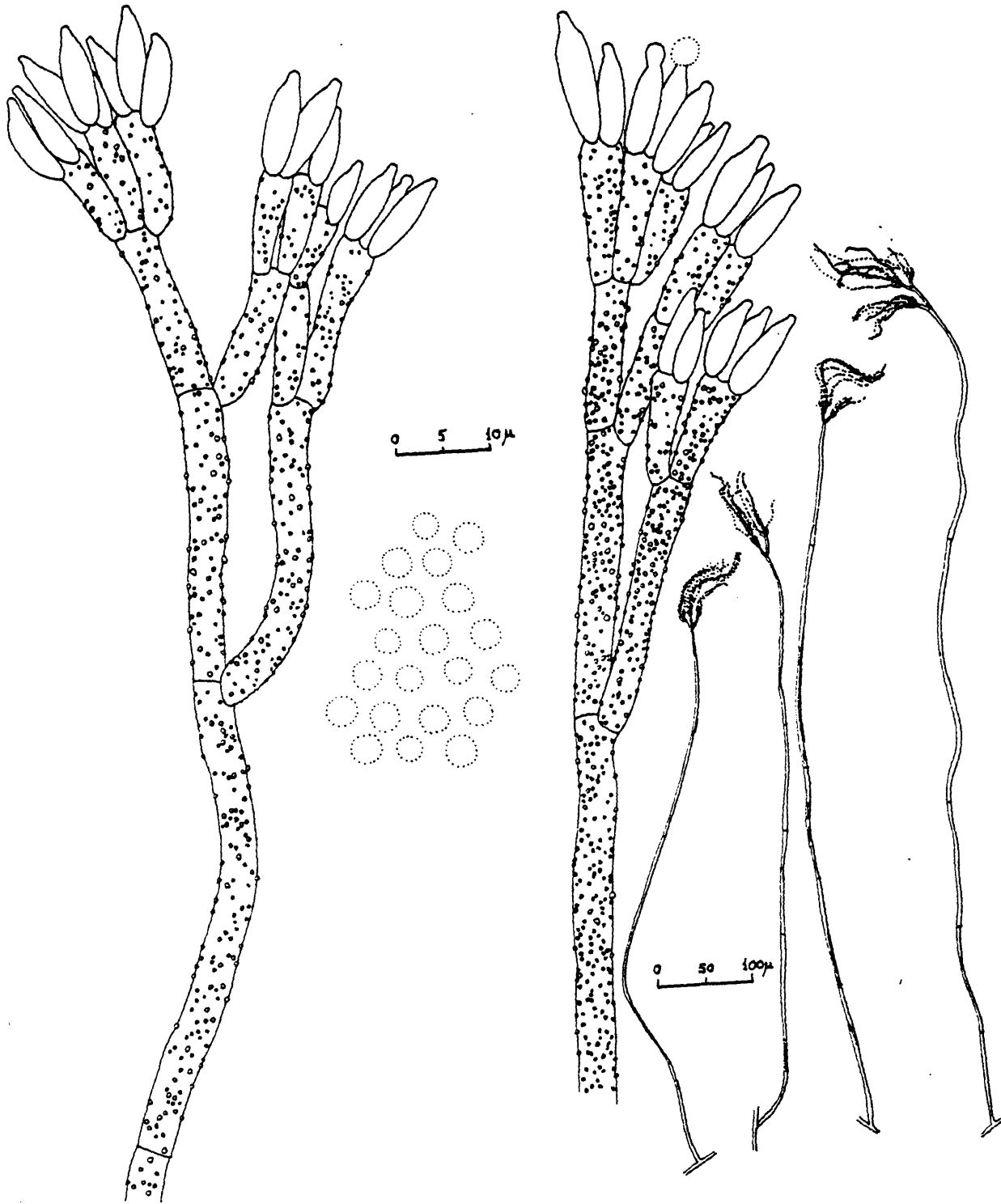
Incluído en la Subsección Asimétrica-Fasciculata, P. verrucosum var. corymbiferum presenta, sobre Agar Solución de Czapek, colonias de crecimiento rápido / que alcanzan 50-60 mm. de diámetro en 14 d. a 25° C, / fuertemente esporuladas por toda su superficie en tonos amarillo a verde-azul o verde-gris e incluso tonos canela con la madurez del cultivo. Estructuras conidiales monematosas y sinematosas, predominando estas últimas en los aislamientos recientes. Micelio amarillo. Exudado en forma de gotitas de color ámbar a marrón. Reverso de las colonias en tonos púrpura- anaranjado a marrón. Pigmento en tonos ámbar a anaranjado que difunde por el agar circundante.

Conidióforos de hasta 1000 μ m. de longitud, / con estípites muy rugosos.

Penicilos largos, típicamente biverticilados asimétricos, con ramas y mótulas de paredes rugosas.

Ramas de longitud variable, generalmente entre 30 y 35 μ m. Mótulas de 10 a 20 μ m. de longitud. Fiálides comparativamente grandes, de 10 a 15 μ m. de longitud.

Conidios globosos, de 3 a 3.5 μ m. de diámetro.



Penicillium verrucosum Dierckx var. *corymbiferum*
(Westling) Samson et al.

Incluído en la Subsección Asimétrica-Fasciculata, P. verrucosum var. cyclopium presenta, sobre Agar Solución de Czapek, colonias de aspecto sumamente variable, desde prácticamente aterciopeladas, con conidióforos mononematosos, hasta colonias ampliamente sinematosas, con todas las gradaciones intermedias. Habitualmente se trata de colonias de apariencia granular, de crecimiento amplio (35-50 mm. de diámetro en 14 d. a 25° C), con sinemas principalmente en las áreas marginales y esporuladas intensamente por toda la superficie en tonos / que van del verde-azulado al verde-gris, incluso tonos ocreos, pardos a marrón claro con la madurez de los conidios (sobre todo en las áreas centrales y submarginales de las colonias, manteniéndose los tonos azul-verdosos / en las zonas inmediatas a la zona marginal periférica, / de color blanco). Olor intenso, tratándose en muchas ocasiones de aromas afrutados (manzana e incluso piña). Reverso en tonos marrón anaranjado más o menos oscuros. Muchas cepas producen un pigmento amarillo a ámbar que difunde por el medio de agar, y se oscurece con la edad / del cultivo.

Conidióforos que surgen del sustrato.

Penicilos variables, en ocasiones ramificados por debajo del nivel de las métulas y, en otras, consti-

culos por un verrucio terminal de 3-4 metulias.

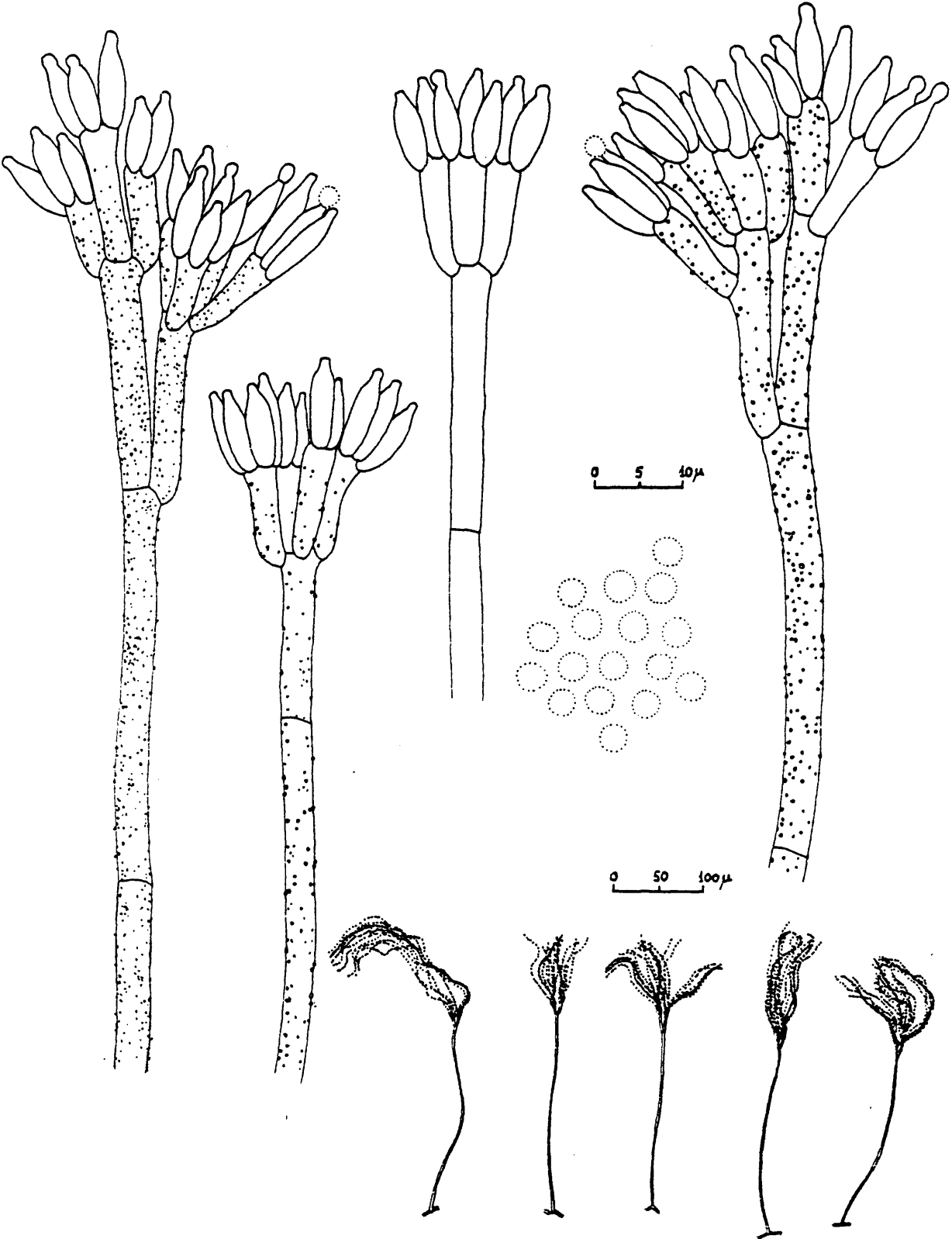
Estípites que pueden presentar paredes prácticam_e lisas (como ocurre por ejemplo en la cepa ananas olens) hasta francamente rugosas.

Métulas usualmente de 12 a 15 μm . de longitud.

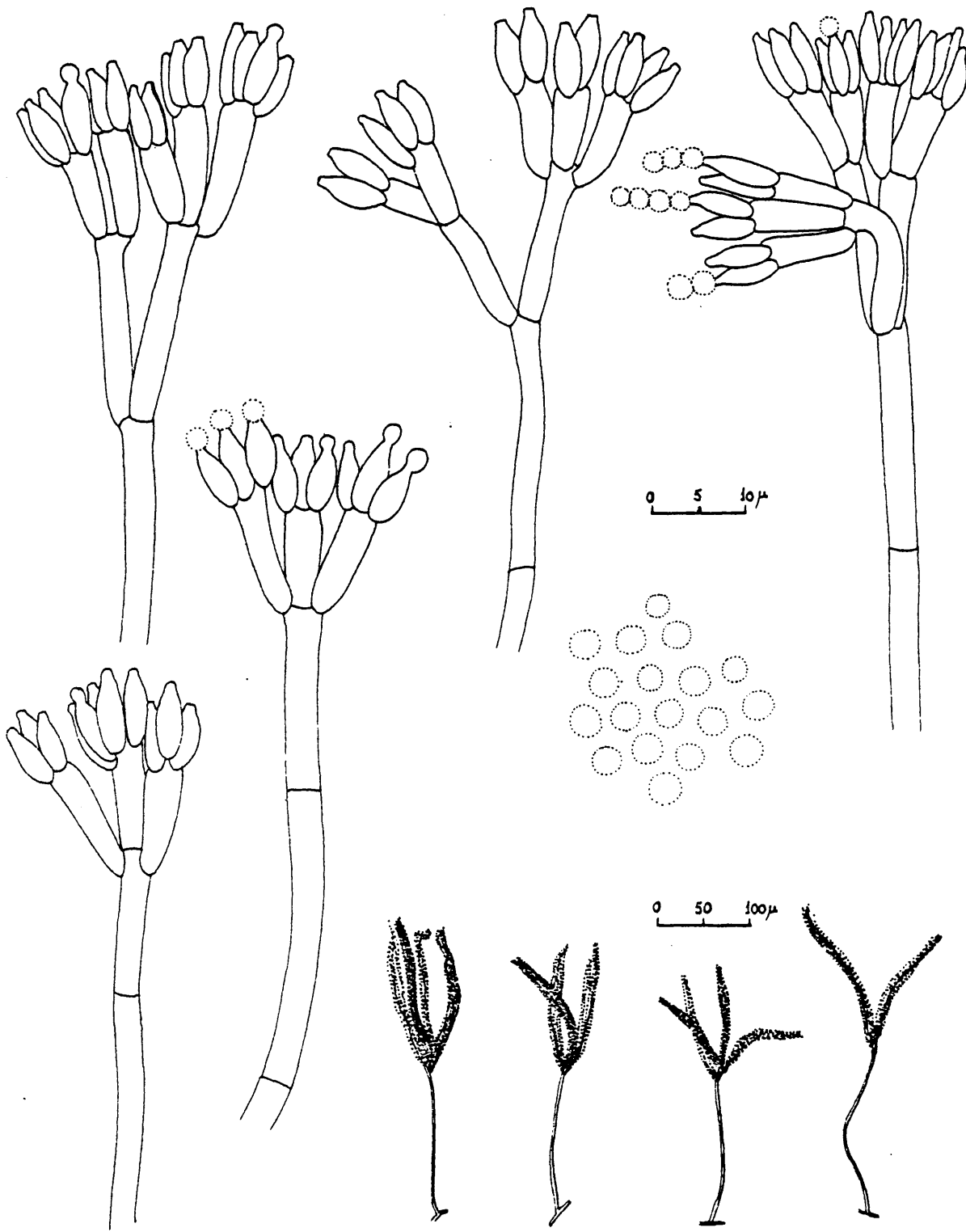
Fiálides con forma típica de botella, de cuello corto, entre 8 y 10 μm . de longitud.

Cadenas conidiales desde enmarañadas hasta / sueltamente paralelas e incluso en ocasiones dando origen a columnas divergentes. Conidios globosos, generalmente de 3 a 4 μm . de diámetro, lisos.

Según Cole y Cox (1.981), P. verrucosum var. cyclopium ha sido citado como productor de diversas sustancias conceptuadas como micotoxinas: ác. ciclopiazonico, ác. bissecodehidrociclopiazonico, imina del ác. ciclopiazonico, cicloopenina, cicloopenol, ác. penicílico, / penitrem A, patulina, griseofulvina.



Penicillium verrucosum Dierckx, var. *cyclopium* (Westling) Samson et al.



Penicillium verrucosum Dierckx var. *cyclopium*
 (Westling) Samson et al. (cepa ananas-olens Ramirez.)

P. verrucosum var. melanochlorum.-

Incluído en la Subsección Asimétrica-Fasciculata, P. verrucosum var. melanochlorum presenta, sobre Agar Solución de Czapek, colonias de crecimiento rápido / que superan los 40 mm. de diámetro en 14 d. a 25^o C, con estructuras conidiales producidas densamente por toda su superficie, predominantemente mononematosas, en ocasiones con sinemas en áreas submarginales. Colonias en tonos de verde oscuro, con el área central frecuentemente cubierta por hifas blancas. Olor intenso, aromático. Reverso incoloro a tonos crema. Pigmento de color ámbar / que difunde por el agar circundante.

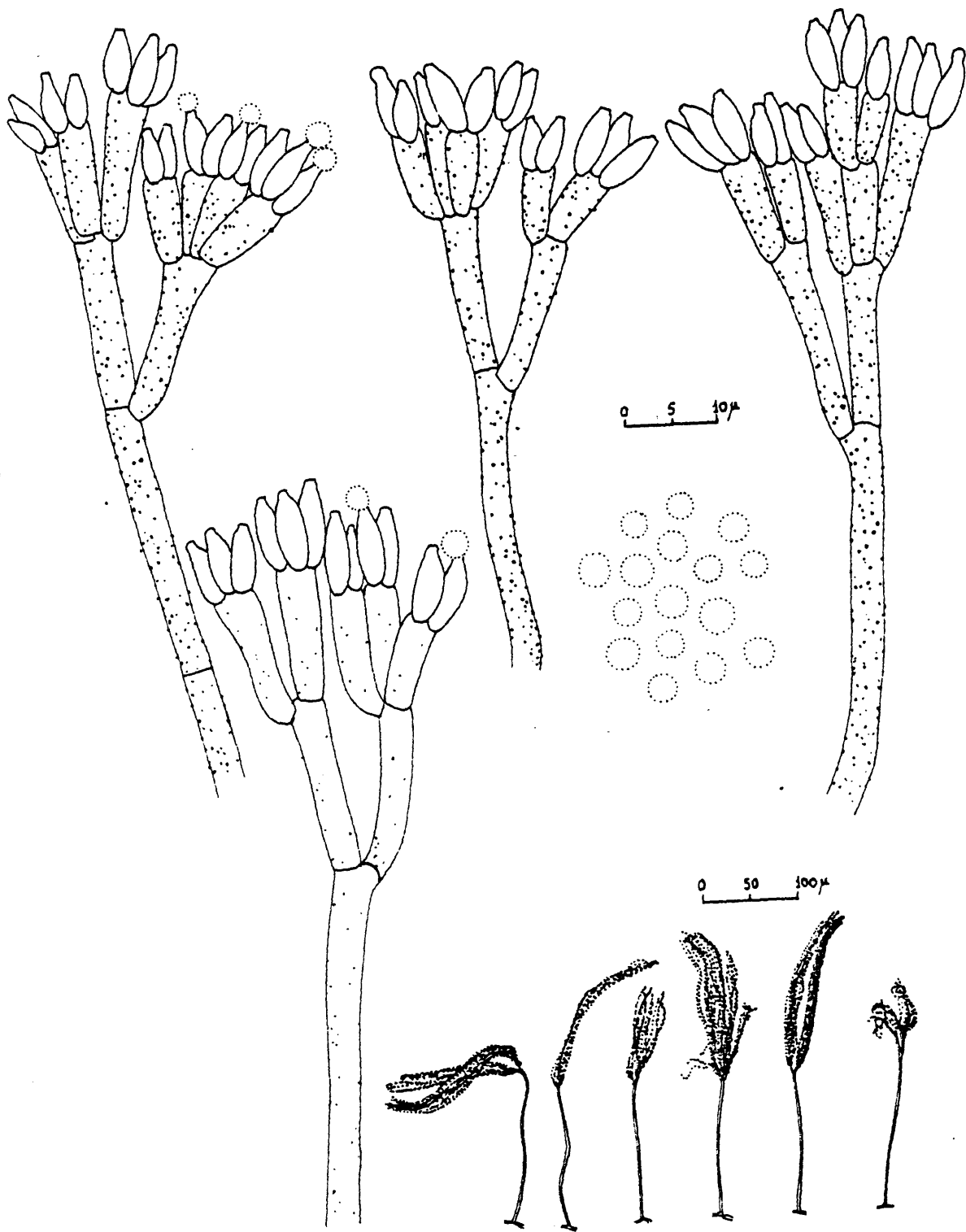
Penicilos biverticilados asimétricos, con ramas de 16 a 20 μm . de longitud, que portan mótulas en / verticilos de 3-4 elementos, de 10 a 15 μm . de longitud.

Estípites rugosos, como ramas y mótulas.

Fiálides generalmente de 7-8 μm . de longitud.

Conidios globosos, de 3-3.5 μm . de diámetro, lisos.

P. verrucosum var. melanochlorum ha sido citado como productor de penitrem A y B y ác. penicílico.



Penicillium verrucosum Dierckx var. *melanochlorum* Samson et al.

P. verrucosum var. verrucosum.
Incluido en la Subsección Asimétrica-Fasciculata, P. verrucosum var. verrucosum presenta, sobre Agar Solución de Czapek, colonias de crecimiento algo restringido que alcanzan alrededor de 30-35 mm. de diámetro en 14 d. a 25° C, fuertemente esporuladas en tonos verde amarillento a verde azulado. Reverso incoloro, amarillo o anaranjado claro. Olor intenso a tierra húmeda.

Penicilos biverticilados asimétricos, generalmente cortos, comprimidos, con ramas de 15 a 20 (25) μm . de longitud, que portan m \acute{e} tulas de 10 a 13 μm . de longitud, producidas en verticilos de 3-4, habitualmente a diferentes niveles.

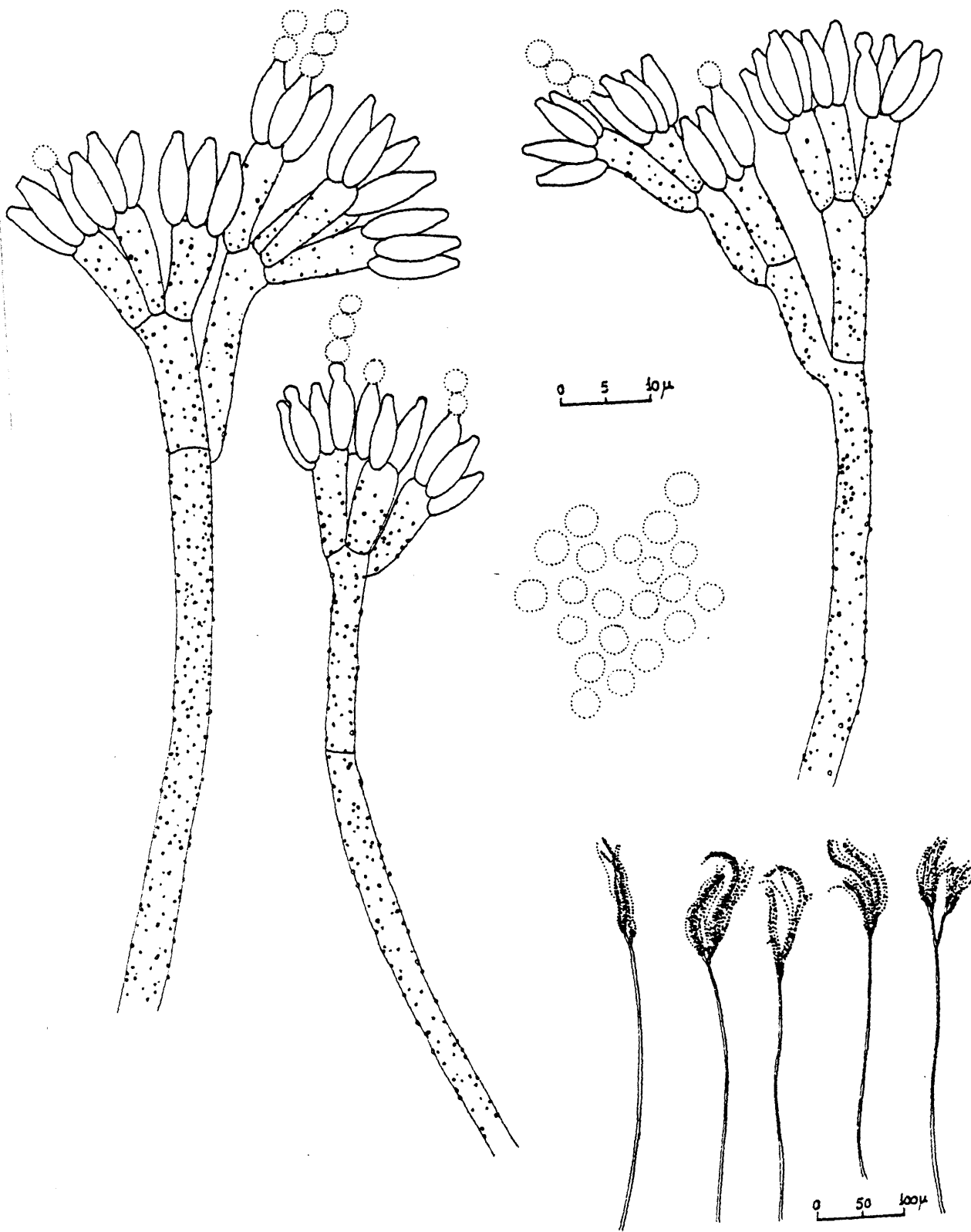
Estípites, ramas y m \acute{e} tulas fina pero densamente rugosos.

Fiálides de 3-9 (10) μm . de longitud.

Conidios globosos, de hasta 5 μm . de diámetro, lisos.

Según datos recopilados por Cole y Cox (1.981)

P. verrucosum var. verrucosum es capaz de producir diversas sustancias que se han conceptualizado como micotoxinas: rugulovasina A, ocratoxina A, 4-hidroxiocratoxina A, ác. penicílico, xantomegnina, viomelleina, rubrosulfina, viopurpurina, citrinina, viridicatina, ciclopenina, ciclopenol, toxina viridicatum.



Penicillium verrucosum Dierckx var. *verrucosum* Samson et al.

Colonias de aspecto variable (blancas, pardas, grises, ...) que producen estructuras reproductoras que van desde conidióforos cortos con ramificaciones más o / menos peniciladas hasta anélides (= anelóforas) aisladas, sésiles sobre hifas aéreas.

Conidios en cadenas, generalmente globosos a piriformes, truncados basalmente.

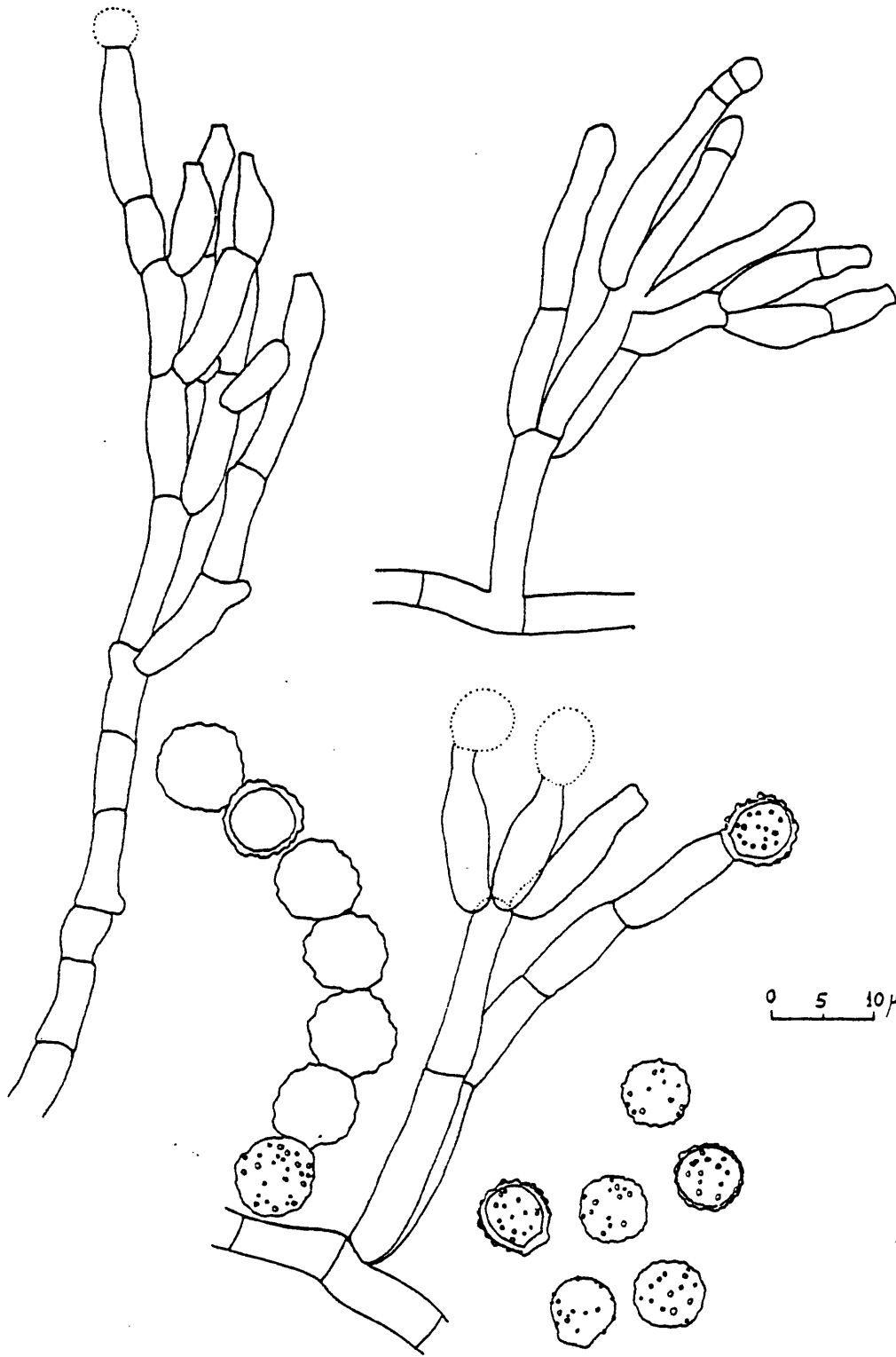
La especie que hemos aislado e identificado / en nuestro estudio se corresponde con S. brevicaulis.

S. brevicaulis.-

Colonias inicialmente blanquecinas que progresivamente van pasando a tonalidades blanco-grisáceas a / pardas.

Conidióforos cortos.

Células esporógenas anélides aisladas o en / grupos que adoptan formas peniciladas. Estas anélides, / con forma cilíndrica o de botella, originan largas cadenas de conidios globosos, subglobosos, ovalados o piri--formes, frecuentemente truncados en el punto de inser---ción a la anélide, lisos a fuertemente rugosos, unicelulares, hialinos a oscuramente pigmentados.



Scopulariopsis brevicaulis (Sacc.) Bainier

Al igual que Alternaria y Ulocladium, el género Stemphylium se caracteriza por producir dictiosporas sobre conidióforos bien diferenciados, si bien se distingue notablemente de ambos géneros citados en su forma de proliferación: los conidióforos presentan un hinchamiento apical, más o menos acusado pero perceptible, que rodea a un poro terminal a través del cual se produce, como un crecimiento protoplásmico hacia el exterior, un conidio solitario; a continuación, el conidióforo proliferará a través del poro terminal que ha dado origen al conidio y forma un segundo hinchamiento que, a su vez, presenta un poro terminal que da origen a otro conidio. Las proliferaciones sucesivas según un proceso análogo dan lugar a que el conidióforo resultante adquiera una apariencia nudosa, y de aquí que el género Stemphylium se caracterice por la existencia de conidióforos con hinchamientos intercalares, oscuros, que portan dictiosporas.

La especie que hemos aislado en nuestro estudio se corresponde con S. botryosum.

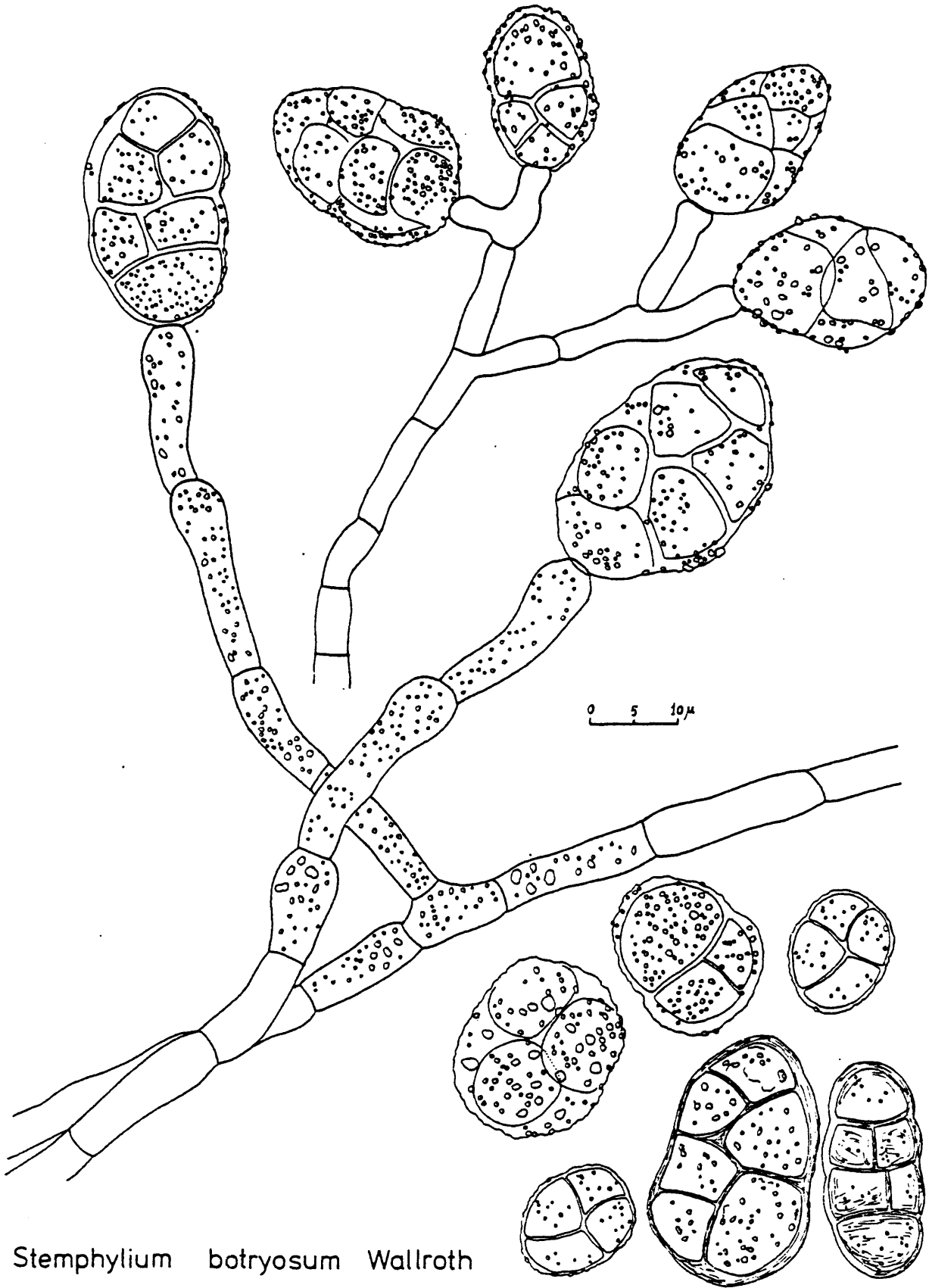
S. botryosum.-

Colonias de crecimiento extenso, colores oscuros y cubiertas en ocasiones por un micelio blanquecino, floccoso, usualmente estéril, que se distribuye irregular

Conidióforos simples o escasamente ramifica--
dos, pigmentados en tonos marrón, septados y con las ca-
racterísticas típicas anteriormente descritas.

Dictiosporas oscuramente pigmentadas, lisas a
rugosas, frecuentemente con una marcada constricción en
el septo central, y de tamaño variable.

-----0-----



Stemphylium botryosum Wallroth

Colonias flocosas a compactas, de crecimiento rápido, blancas, amarillo-verdosas a verde brillante.

Conidióforos hialinos sumamente ramificados, de contorno cónico o piramidal, con ramificaciones en ángulo recto con el eje central. La longitud de las ramas laterales de la rama principal de cada conidióforo se incrementa regular y proporcionalmente con la distancia entre dichas ramas laterales y el ápice del conidióforo.

Las células esporógenas son fiálides, generalmente con forma de botella, nacidas en solitario o en racimo, hialinas, ligeramente más estrechas en la base que en el centro y ahusadas hacia el ápice.

Masas conidiales verdes o blancas, formando / pústulas constituidas por fialosporas verdes o hialinas, unicelulares, que permanecen agrupadas formando masas / globosas en el ápice de las fiálides.

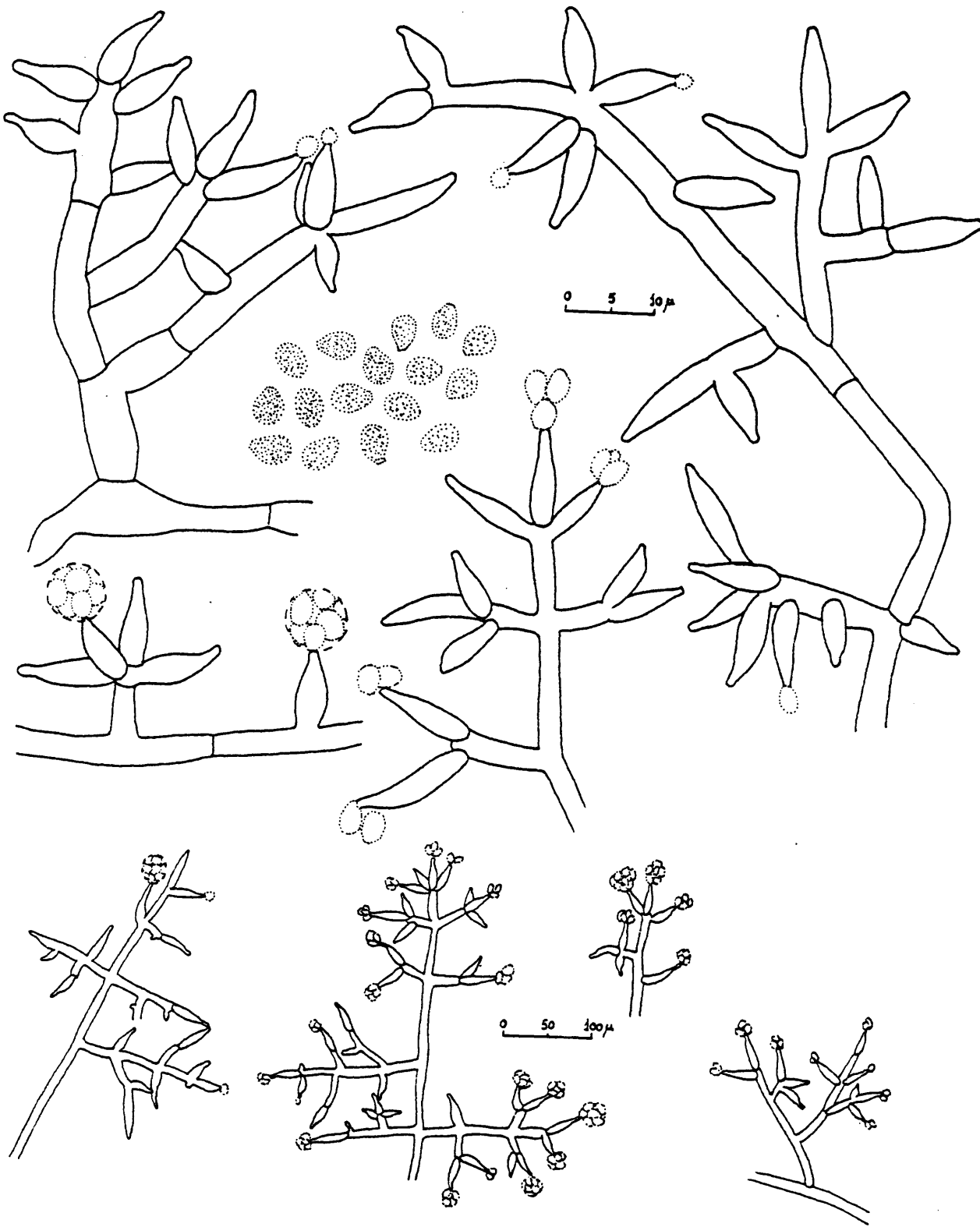
Las cepas de Trichoderma que hemos aislado e identificado en el presente estudio pertenecen a las especies: I. aureoviride, I. pseudokoningii y I. viride.

Colonias de crecimiento extendido, compacto, con superficie flocosa, en tonos blancos a verde-amari--llento y reverso amarillo-verdoso.

Conidióforos y ramas laterales largos y delgados, sin prolongaciones terminales de hifas estériles, y con un sistema de ramificación dendroide.

Fiálides verticiladas, dispuestas con bastante regularidad.

Fialosporas obovoides, con base truncada, lisas.



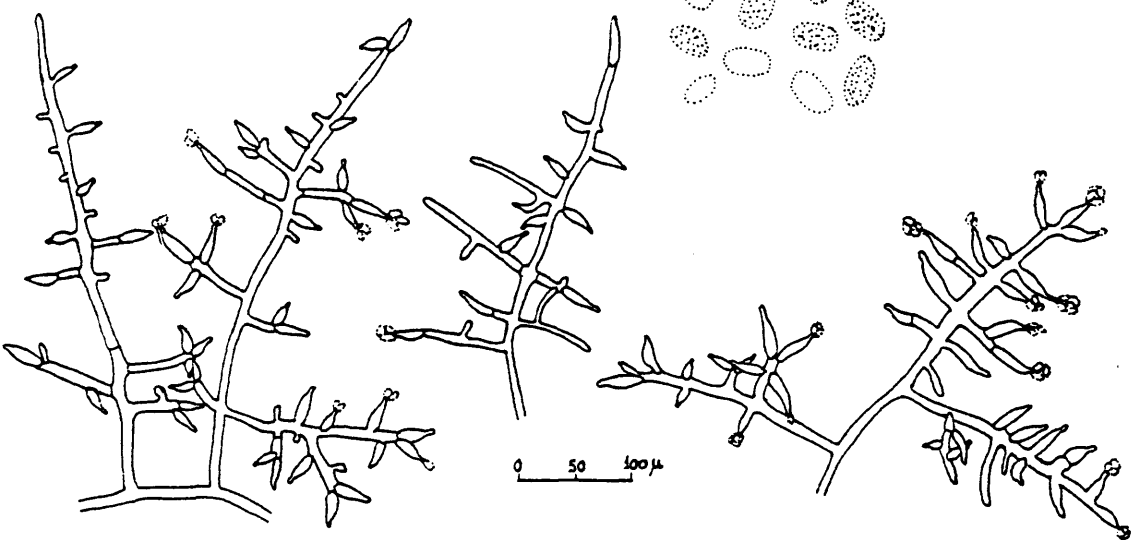
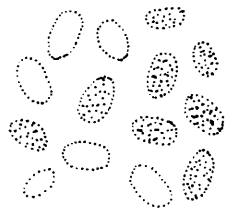
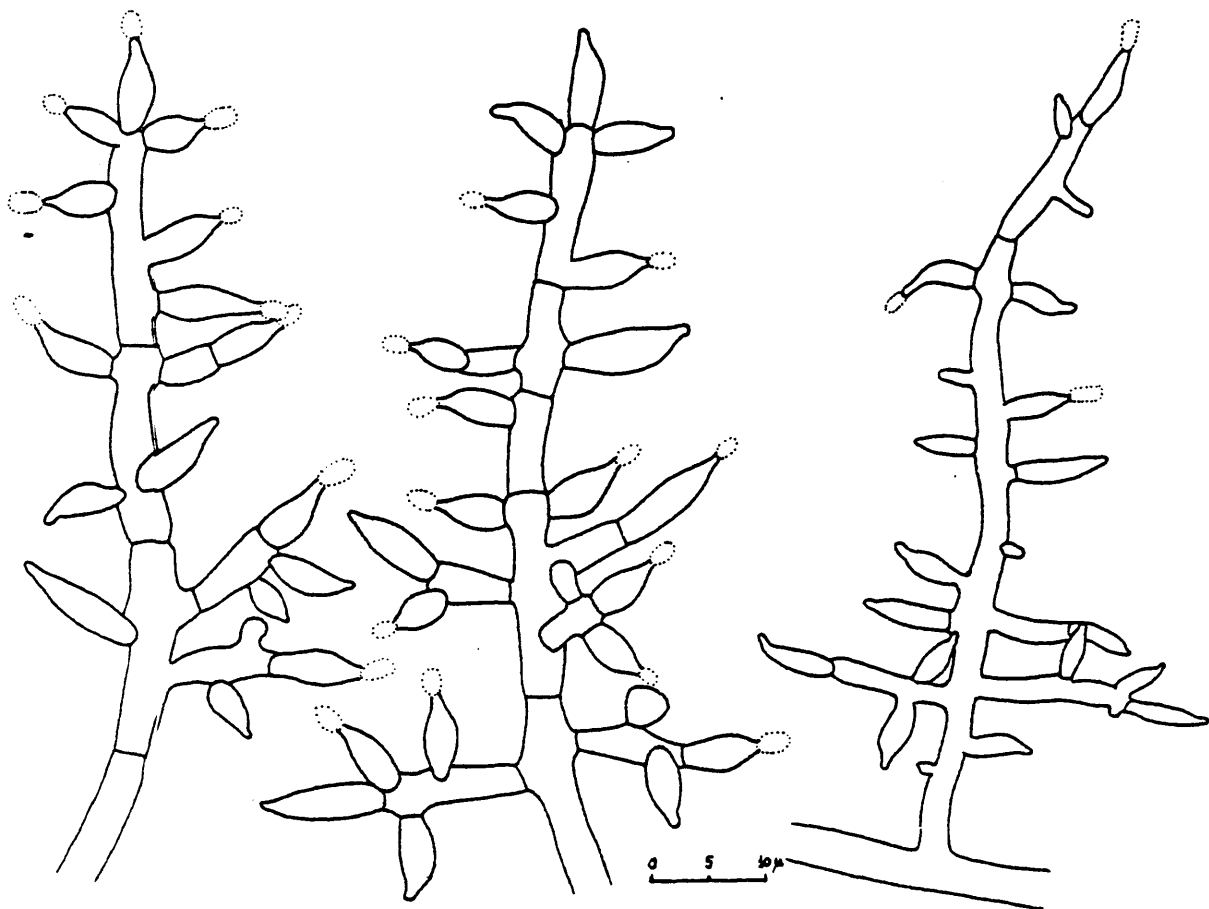
Trichoderma aureoviride Rifai

I. aureoviride.
Colonias inicialmente blancas que progresivamente adoptan tonalidades verdes hasta verde brillante, con reverso amarillento.

Conidióforos largos y delgados, al igual que las ramas laterales, sin prolongaciones terminales de hifas estériles y con un sistema de ramificación más simple que el observado en I. aureoviride.

Fiálides dispuestas irregularmente, en ocasiones surgiendo aisladas y muchas veces claramente atenuadas en la base.

Fialosporas generalmente elipsoidales, lisas, pequeñas (de 2.5 a 5 μ m. de longitud).



Trichoderma pseudokoningii Rifai

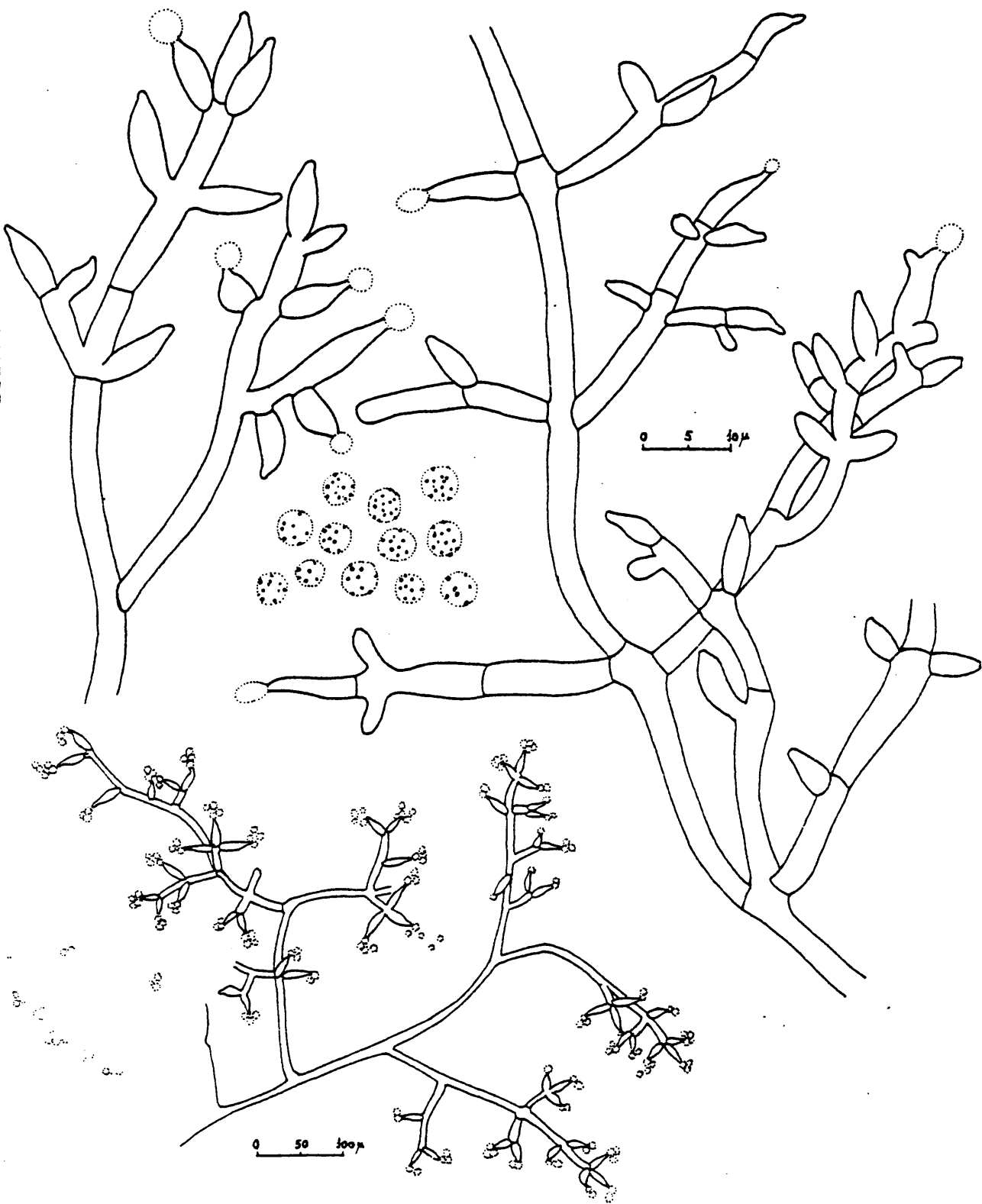
Colonias en tonos de verde oscuro, con el reverso incoloro.

Conidióforos largos y delgados, al igual que las ramas laterales, sin prolongaciones terminales de hifas estériles.

Fialosporas rugosas.

Casi todas las cepas aisladas con fialosporas rugosas se ha apreciado que emiten un característico olor a "coco" en la madurez. Este carácter es bastante útil / para reconocer I. viride, especialmente si falla la esporulación de las colonias.

I. viride ha sido citado como productor de micotoxinas como tricodermina, gliotoxina y viridiol (Cole y Cox, 1.981).



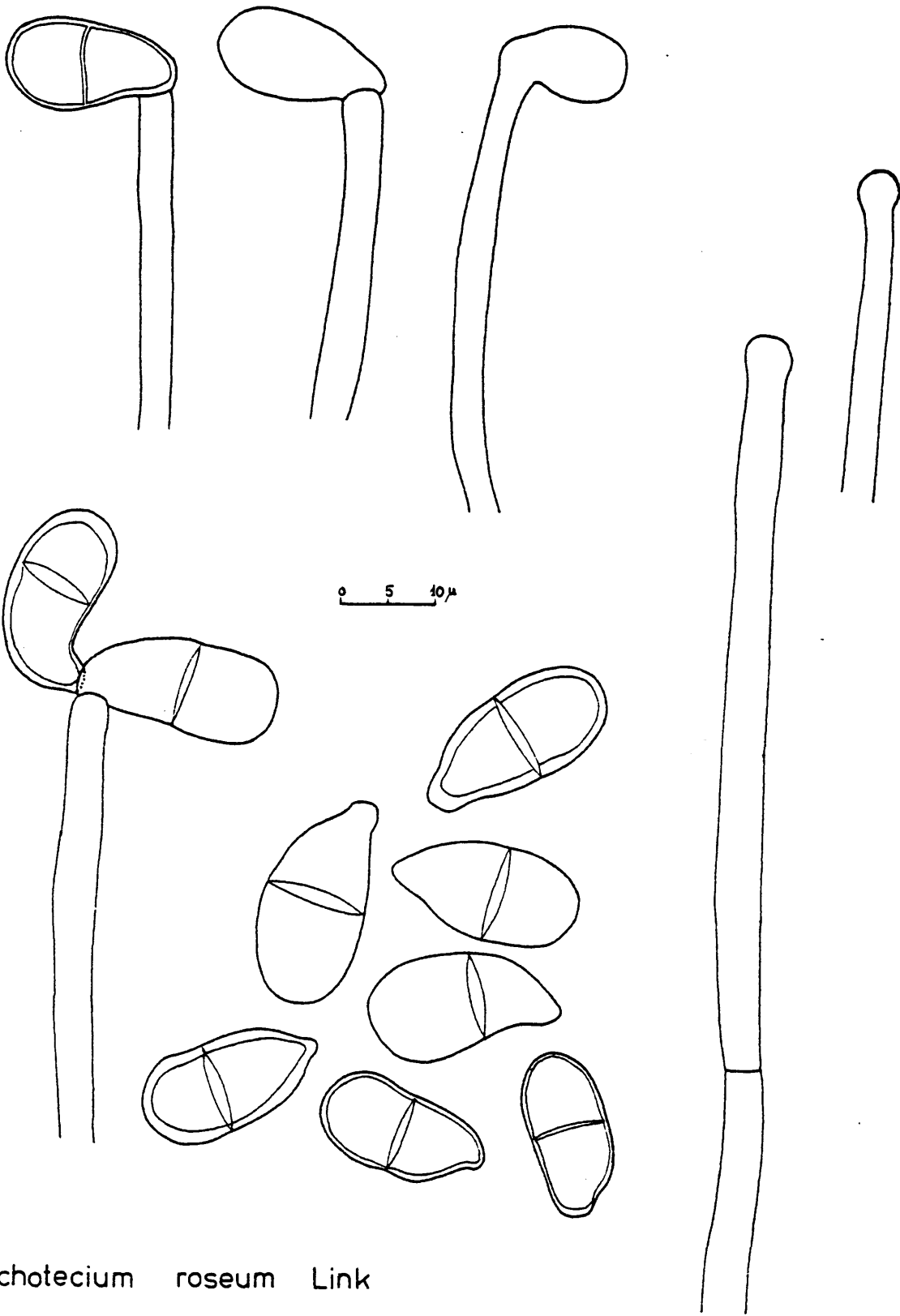
Trichoderma viride Pers. ex Gray

La especie aislada en nuestro estudio, T. roseum, presenta colonias muy extendidas, delgadas, inicialmente blancas y luego adoptando tonos rosados.

Conidióforos erectos, hialinos, septados, cortos e indiferenciados.

Conidios hialinos, bicelulares, de tamaño relativamente grande, producidos en sucesión basipétala y que permanecen unidos por una sustancia mucosa dando origen a cadenas cortas y frágiles.

Cole y Cox (1.981) han recopilado diversos datos sobre ciertas sustancias conceptuadas como micotoxinas producidas por T. roseum: crotocina (antibiótico T), crotocol, tricotecolona, tricoteceno, tricotecina, roseo toxina B.



Trichotecium roseum Link

Bajo este nombre genérico se agrupan todos aquellos hongos de micelio ausente o reducido, que se encuentran habitualmente en forma unicelular.

Según von Arx (1.981), todas las levaduras se incluyen en la Clase Endomycetes, junto a aquellos otros hongos de aspecto semejante a las levaduras y, también, hongos parásitos de plantas. Se trata, por otra parte, / de hongos hasta ahora incluídos en Ascomycetes, Basidio- mycetes y Deuteromycetes que no presentan cuerpos fructí- feros o himenios distinguibles, producen blastosporas, / artrosporas, células de fisión o, en casos, pseudomice- lio.

Entre las especies que hemos aislado en nues- tro estudio, vamos a referirnos fundamentalmente a tres, debido a su mayor frecuencia de aislamiento (Rhodotorula y Saccharomyces) y a su potencial poder patógeno (Candi- da).

Saccharomyces cerevisiae.-

Células esferoidales a ovales, generalmente / aisladas, en parejas o, más raramente, en pequeñas cade- nas o racimos, de 5x4 μ m. a 9x6 μ m. No forman micelio / verdadero, ni velo precoz sobre extracto de malta. Su re

producción vegetativa es por gemación multilateral. Se reproducen sexualmente convirtiéndose las propias células vegetativas en ascas que, en la madurez, no se rompen fácilmente y que contienen generalmente de 1 a 4 ascosporas globosas por asca, raramente más.

En cuanto a las características fisiológicas más representativas, destacan las siguientes:

Fermentación de compuestos del carbono.-

Glucosa +	Melibiosa -
Galactosa +	Rafinosa + 1/3
Sacarosa +	Lactosa -
Maltosa +	Celobiosa -

Asimilación de compuestos del carbono.-

Glucosa +	Inulina -
Galactosa +	Almidón soluble -
L-Sorbosa -	D-Xilosa -
Sacarosa +	L-Arabinosa -
Maltosa +	D-Arabinosa -
Celobiosa -	D-Ribosa +
Trehalosa +	L-Rhamnosa -
Lactosa -	Etanol +
Melibiosa -	Glicerol +
Rafinosa +	Ac. cítrico -
Melecitosa + o -	Inositol -

Asimilación de compuestos del nitrógeno.-

Nitrato potásico -

Candida glabosa.-

Células ovales, generalmente de 4x3 µm. a 5x4 µm. Sobre Agar-harina de maíz se observa la formación de un pseudomicelio primitivo. El cultivo en estría no es pigmentado. La reproducción vegetativa es por gemación /

multilateral. No forman ascosporas. No fermentan los com-
puestos del C. La asimilación de compuestos del N (NO_3K)
es, asimismo, negativa.

Asimilación de compuestos del carbono.-

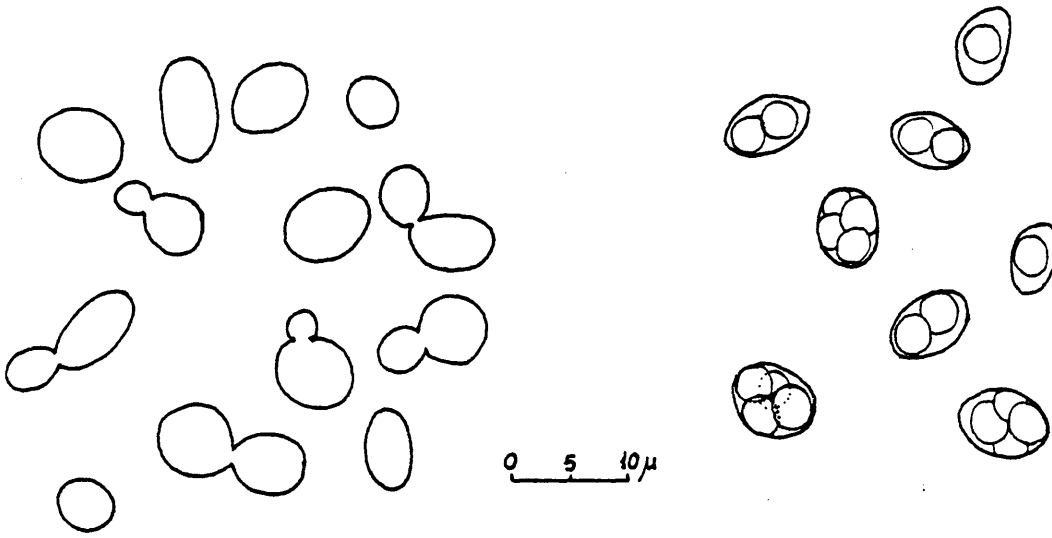
Glucosa +	Inulina -
Galactosa +	Almidón soluble +
L-Sorbosa +	D-Xilosa +
Sacarosa +	L-Arabinosa +
Maltosa +	D-Arabinosa +
Celobiosa +	D-Ribosa -
Trehalosa +	L-Rhamnosa -
Lactosa +	Etanol +
Melibiososa +	Glicerol +
Rafinosa +	Ac. cítrico +
Melecitososa -	Inositol -

Rhodotorula rubra.-

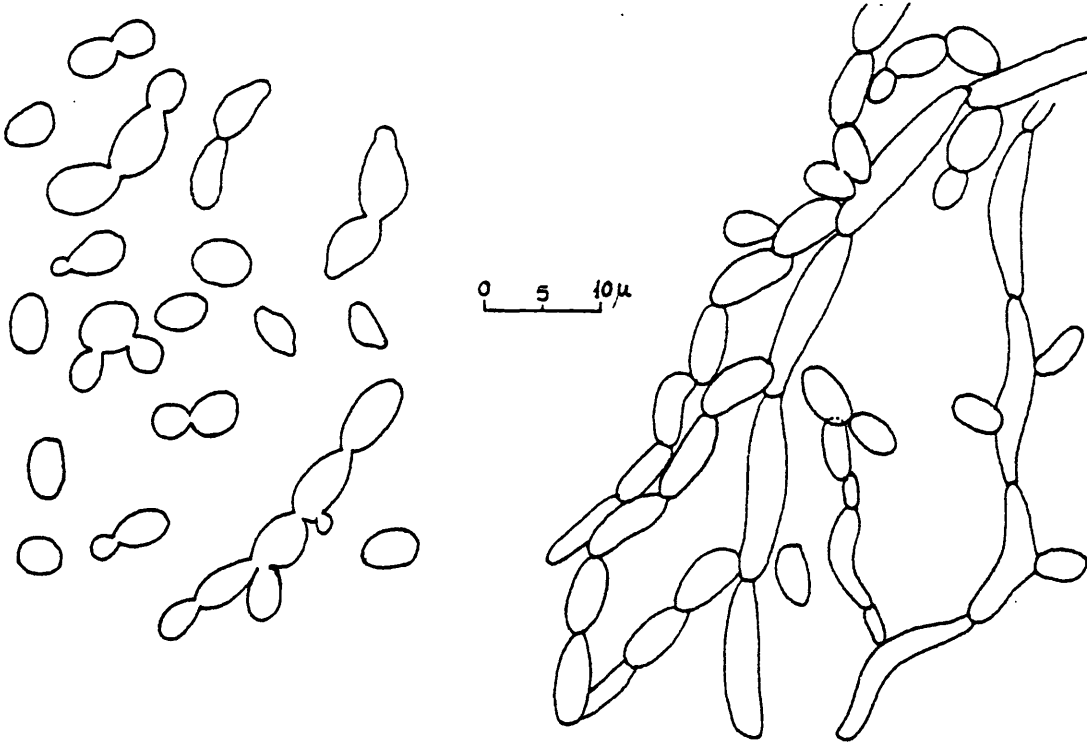
Células vegetativas ovales, aisladas, en pare-
jas o en cortas cadenas, de $4 \times 2.5 \mu\text{m}$. a $5 \times 4 \mu\text{m}$. El culti-
vo en estría exhibe típicamente una coloración rosa. La
reproducción vegetativa es por gemación multilateral. No
forman ascosporas. No fermentan los compuestos del C. La
asimilación de compuestos del N (NO_3K y NO_2K) es, asimis-
mo, negativa.

Asimilación de compuestos del Carbono.-

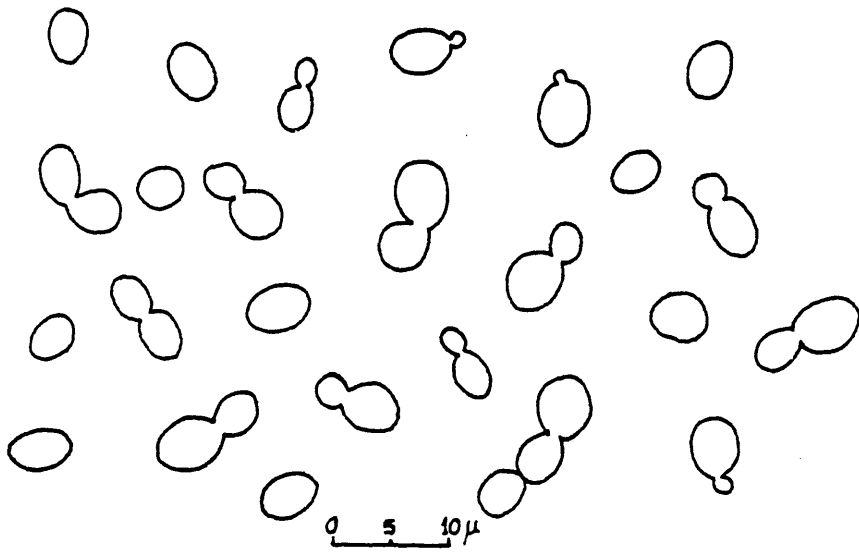
Glucosa +	Inulina -
Galactosa +	Almidón soluble -
L-Sorbosa +	D-Xilosa +
Sacarosa +	L-Arabinosa +
Maltosa +	D-Arabinosa +
Celobiosa +	D-Ribosa +
Trehalosa +	L-Rhamnosa -
Lactosa -	Etanol +
Melibiososa -	Glicerol +
Rafinosa +	Ac. cítrico +
Melecitososa +	Inositol -



Saccharomyces cerevisiae Meyen ex Hansen



Candida glabrosa Komagata et Nakase



Rhodotorula rubra (Demme) Lodder

Concretándonos a la flora fúngica hallada en el análisis de las 120 muestras de pimentón, la relación de hongos encontrados e identificados incluye un total / de 62 géneros y especies, comprendidos entre los descritos en el apartado 4.1.1, y es la siguiente:

Clase Zygomycetes

Orden Mucorales

Género Absidia

Especie: A. corymbifera.

Género Actinomucor

Especie: A. elegans.

Género Circinella

Especies: C. minor.

C. mucoroides.

Género Mucor

Especies: M. circinelloides.

M. hiemalis.

M. plumbeus.

M. racemosus.

Género Rhizopus

Especies: Rh. oryzae.

Rh. stolonifer.

Género Syncephalastrum

Especie: S. racemosum.

Orden Sphaeropsidales

Género Phoma.

Orden Moniliales (=Hyphomycetes)

Género Acremonium.

Género Alternaria

Especies: A. chartarum.

A. tenuis.

A. tenuissima.

Género Aspergillus

Especies: A. amstelodami.

A. awamori.

A. candidus.

A. clavatus.

A. chevalieri

A. ficuum.

A. flavus.

A. fumigatus.

A. nidulans.

A. niger.

A. ochraceus.

A. oryzae.

A. parasiticus.

A. phoenicis.

A. repens.

A. sydowi.

A. tamaris.

A. versicolor.

Género Aureobasidium

Especie: A. pullulans.

Género Cephalophora

Especie: C. tropica.

Género Cladosporium
Especies: C. cladosporioides.

C. herbarum.

Género Penicillium

Especies: P. aurantio-flammiferum.

P. brevi-compactum.

P. citrinum.

P. corylophilum.

P. chrysooenum.

P. frequentans.

P. expansum.

P. griseo-fulvum.

P. janthinellum.

P. miczynskii.

P. oxalicum.

P. paxilli.

P. raistrickii.

P. roqueforti.

P. simplicissimum.

P. steckii.

P. verrucosum var. cyclopium.

P. verrucosum var. verrucosum.

Género Scopulariopsis

Especie: S. brevicaulis.

Género Stemphylium

Especie: S. botryosum.

Género Trichotecium

Especie: T. roseum.

LEVADURAS:

Candida glabrosa.

Rhodotorula rubra.

Saccharomyces cerevisiae.

Una vez detallada la relación de géneros y especies hallados al estudiar la micoflora de las especias en general, y del pimentón en particular, pasamos a concretar las frecuencias de aparición de los diferentes / hongos identificados, con el fin de establecer la flora habitual y la flora esporádica hallada en los análisis / realizados.

4.1.3.1.- Porcentajes de aparición.-

Con los datos obtenidos al estudiar la asiduidad en la aparición de los géneros aislados e identificados en la totalidad de muestras de especias analizadas, hemos confeccionado la gráfica de frecuencias de aparición recogida en la FIGURA 2.

Concretándonos a los datos obtenidos al estudiar la asiduidad en la aparición de los géneros aislados e identificados exclusivamente en las muestras de pimentón, la gráfica de frecuencias de aparición adopta la disposición que se recoge en la FIGURA 3.

dominantes.-

A la vista de los resultados generales obtenidos, expresados en las FIGURAS 2 y 3, procedimos al estudio de las frecuencias de los géneros que aparecen con / mayor asiduidad al analizar, por un lado, la totalidad / de muestras de especias, y, por otro, las muestras de pimentón. Al hacerlo, hemos desglosado la distribución porcentual de las especies identificadas pertenecientes a / dichos géneros.

En el caso de la micoflora hallada en la totalidad de muestras de especias analizadas, los géneros / aislados con mayor frecuencia son Aspergillus y Penicillium: 80.45 % y 57.27 %, respectivamente. En las dos / gráficas siguientes (FIGURAS 4 y 5) se detallan las frecuencias de aparición de las especies identificadas pertenecientes a ambos géneros.

En el caso de la micoflora hallada en las / muestras de pimentón analizadas, nuevamente son los géneros Aspergillus y Penicillium los aislados con mayor frecuencia: 92.50 % y 61.66 %, respectivamente. En las dos gráficas siguientes (FIGURAS 6 y 7) se detallan las frecuencias de aparición de las especies identificadas pertenecientes a ambos géneros.

En la FIGURA 8 se establece la comparación entre las micofloras aisladas a partir de las muestras de pimentón procedentes de las dos zonas geográficas españolas mayoritariamente productoras de esta especia: Murcia (51 muestras) y Cáceres (69 muestras).

Para profundizar en el estudio comparativo entre la micoflora encontrada en las muestras de pimentón procedentes de ambas zonas productoras citadas, y debido a la significación de las especies implicadas, creemos de interés comparar, asimismo, las frecuencias de aparición de los géneros Aspergillus y Penicillium, como hicimos anteriormente, detallando las especies encontradas. Todo ello queda sintetizado en la FIGURA 9.

4.1.3.3.- Recuentos en muestras de pimentón.-
Histogramas.-

Ya mencionamos en el apartado 2.2 la dificultad, y a la vez la necesidad, de adoptar criterios microbiológicos para establecer la calidad higiénico-sanitaria de las especias. Citábamos allí el Criterio Microbiológico para Especias recomendado por la "International / Commission for Microbiological Specifications for Foods" (I.C.M.S.F., 1.974), y concretamente el establecido para el recuento en placas de mohos y levaduras.

(1.982) (a la vista de la disparidad de los resultados / que obtuvieron en su estudio sobre ciertas especias), ci tada en el apartado 2.2, y tras comprobar la disparidad obtenida en nuestro estudio en cuanto a ~~los~~ recuentos / fúngicos observados en las especias que hemos analizado (ver apartado 4.2.1.1 y las TABLAS IV y V), con el fin / de obtener una información adicional sobre la especia de mayor producción nacional, el pimentón, y poder contri-- buir al establecimiento futuro de un criterio microbioló gico fundamentado, hemos reunido los resultados que obtu vimos en lo que concierne a los recuentos fúngicos reali zados en las 120 muestras de pimentón analizadas.

Aunque, al igual que en el estudio de Schwab et al. (1.982), nuestro plan de muestreo no está diseña do sobre 5 unidades de muestra de un lote dado, como re- comienda la I.C.M.S.F., con el fin de obtener alguna in- dicación de las tasas de rechazo por comparación de los resultados de las unidades individuales de muestra con / los Criterios recomendados por la I.C.M.S.F. para el re- cuento en placas de mohos y levaduras, expresamos nues-- tros resultados en forma de histogramas sobre eje de co- ordenadas en el que se recoge, en ordenadas, el número / de muestras analizadas, y, en abcisas, el recuento en / placa obtenido en cada caso.

rios microbiológicos recomendados para especias por la /
I.C.M.S.F., basados en un programa de tres-clases, esta-
blecían para el recuento de mohos y levaduras que:

$$\underline{n}=5, \underline{c}=2, \underline{m}=10^2/\text{gr. y } \underline{M}=10^4/\text{gr.}$$

Estos valores conforman la calificación higié-
nico-sanitaria de cada muestra analizada: si el recuento
en placa de mohos y levaduras proporciona valores infe-
riores a 10^2 col./gr., la muestra en cuestión se incluye
dentro de la denominada "CALIDAD BUENA". Si el resultado
del recuento se encuentra entre 10^2 y 10^4 col./gr., la /
muestra se incluye en la denominada "CALIDAD MARGINAL".
Cuando el recuento es superior a 10^4 col./gr., la mues-
tra analizada se incluye en la denominada "CALIDAD DEFEC-
TUOSA".

Las FIGURAS X, XI y XII expresan los recuen-
tos obtenidos, respectivamente, para las 120 muestras to-
tales de pimentón, las 51 muestras de pimentón proceden-
tes de la zona de Murcia y las 69 muestras de pimentón /
procedentes de la zona de Cáceres.

De la comparación de los resultados individua-
les de los recuentos fúngicos obtenidos para las mues-
tras de pimentón, resumidos en forma de HISTOGRAMAS /
(FIGURAS X, XI y XII), con los criterios de la I.C.M.S.F.
se obtienen unas hipotéticas "tasas de rechazo" del /

25.69 % para las muestras de pimentón, del 15.69 % para las muestras de pimentón procedentes de la zona de Murcia y del 33.33 % para las muestras de pimentón procedentes de la zona de Cáceres. Además, es resaltable el hecho de que otro 67.50 %, en el caso de las 120 / muestras totales, entraría en la denominada calidad marginal, así como un 74.51 % y un 62.32 % de las muestras procedentes, respectivamente, de las zonas de Murcia y Cáceres.

El resumen de estos resultados comparativos es está expresado en las TABLAS XI, XII y XIII.

Con el fin de tratar de obtener una información más detallada, hemos procedido a la comparación entre sí de los tres tipos de pimentón producidos en nuestro territorio nacional: dulce, picante y ocal.

De pimentón dulce, producido tanto en la zona de Murcia como en la de Cáceres, hemos analizado un total de 76 muestras. De pimentón picante y ocal, producidos / prácticamente en su totalidad en la zona de Cáceres, hemos analizado, respectivamente, 29 y 15 muestras. Los resultados de los recuentos fúngicos establecidos se expresan en las FIGURAS XIII, XIV y XV, y la comparación de es tos resultados con los criterios de la I.C.M.S.F. se resu men en las TABLAS XIV, XV y XVI. En ellas se observa que,

establecería en el 22.37 % (calidad defectuosa), mientras que otro 71.05 % de las muestras analizadas se incluiría en calidad marginal. En el caso del pimentón picante, la "tasa de rechazo" sería de un 20.69 % y otro / 68.97 % se incluiría en calidad marginal. En el caso del pimentón ocal, los resultados son más extremos (tal vez por el menor número de muestras analizadas) y la "tasa de rechazo" alcanzaría el 53.33 %, mientras que en la calidad marginal se incluiría el 46.67 % restante de las / muestras analizadas.

De las 76 muestras de pimentón dulce analizadas, 51 procedían de la zona productora de Murcia y 25 / de la de Cáceres. Los recuentos de mohos y levaduras obtenidos al analizar estas muestras están expresados en / las FIGURAS XVI y XVII. La comparación de estos resultados con los criterios de la I.C.M.S.F. se resume en las TABLAS XVII y XVIII. En ellas se observa que la "tasa de rechazo" para las muestras de pimentón dulce procedentes de la zona de Murcia se establecería en el 15.69 %, a la vez que otro 74.51 % se consideraría dentro de la denominada calidad marginal. Estos mismos parámetros, en el caso de las muestras de pimentón dulce procedentes de la / zona de Cáceres, se establecerían en el 36.00 % y el /

Hemos pretendido comparar los resultados obtenidos para el recuento en placa, por un lado, a partir / de los valores alcanzados en una sola dilución y, por otro, ajustando la recta de regresión a los valores obtenidos en todas las diluciones.

4.2.1.1.- Valores obtenidos a partir de una sola dilución.-

En las TABLAS IV y V hemos reunido los recuentos obtenidos para las 220 muestras diferentes estudiadas, expresados en número de colonias/gramo de especia. La TABLA IV resume los valores obtenidos para el total / de 100 muestras de las 27 especias heterogéneas analizadas (según se indicó en 3.1). La TABLA V resume los valores obtenidos para las 120 muestras de pimentón investigadas (apartado 3.1).

Las abreviaturas empleadas en ambas tablas se corresponden con las siguientes especias:

A = Ajo.
AL = Albahaca.
AN = Anís.
AP = Apio.
C = Canela.
CE = Cebolla.
CL = Clavo.
CO = Cominos.
CU = Cúrcuma.
CY = "Curry".
CH = Chile.
E = Eneldo.
ES = Estragón.
H = Hierbabuena.
L = Laurel.
M = Mejorana.
ME = Menta.
NM = Nuez moscada.
O = Orégano.
PD = Pimentón dulce.
PP = Pimentón picante.
PA = Pimentón agridulce (= pimentón ocal).
PE = Perejil.
PB = Pimienta blanca.
PC = Pimienta de Cayena.
PN = Pimienta negra.
R = Romero.
T = Tomillo.
V = Vainilla.
S = Sazonadores diversos.

de regresión.-

Hemos llevado a cabo un cálculo previo sobre un total de 56 muestras de pimentón, ajustando, para cada muestra, la recta de regresión a todos los valores obtenidos en las diferentes diluciones (menos los valores cero), con el fin de comparar estos recuentos con los / conseguidos con el método de una sola dilución.

En la TABLA VI se comparan los resultados obtenidos con ambos métodos, expresados en número de colonias/gramo de especia.

4.2.2.- Análisis de aflatoxinas en especias.-

De las 28 especias analizadas, tan sólo se ha detectado contaminación por aflatoxinas en cuatro de ellas: pimienta blanca, pimienta de Cayena, pimienta negra y pimentón. En el resto de especias muestreadas (ajo, albahaca, anís, apio, canela, cebolla, clavo, comino, / cúrcuma, "curry", chile, eneldo, estragón, hierbabuena, laurel, mejorana, menta, nuez moscada, orégano, perejil, romero, tomillo, vainilla y sazonadores), el análisis de aflatoxinas ha dado resultado negativo.

Los resultados positivos se distribuyen en la

4.2.3.- Estudio de cepas aflatoxigénicas en cultivos de laboratorio.-

Este estudio, motivado por la elevada frecuencia de aparición en las especies analizadas de especies fúngicas conceptuadas en la bibliografía como potencialmente productoras de micotoxinas, lo hemos concretado en el estudio de las dos especies sospechosas más frecuentemente aisladas: Aspergillus flavus Link y A. parasiticus Speare. Hemos investigado sus características aflatoxigénicas en cultivos de laboratorio, según indicamos en el apartado 3.5.2, y con la metodología allí propuesta.

El total de cepas investigadas, sobre medio / de cultivo A.P.A., ha sido de 296, de las cuales 285 pertenecen a la especie A. flavus, 3 a A. flavus var. columnaris y 8 a A. parasiticus.

La distribución de cepas productoras de algún tipo de las aflatoxinas investigadas (B_1 , B_2 , G_1 y G_2) / se recoge en la TABLA VIII. Asimismo se señala en dicha tabla la distribución de cepas aflatoxigénicas según las aflatoxinas que produjeron en el transcurso de los ensayos.

La TABLA IX recoge las frecuencias de apari--

ción de muestras en las que se detectaron A. flavus y A. parasiticus en el total de muestras estudiadas, comparándose asimismo las diferentes frecuencias de aparición registradas para el grupo homogéneo de muestras de pimentón y el grupo heterogéneo de muestras del resto de especias analizadas.

En la misma tabla se resume la distribución / de las muestras en las que se aislaron cepas de A. flavus y A. parasiticus productoras de aflatoxinas en cultivos de laboratorio, en el total de muestras estudiadas / (220), en las muestras de pimentón (120) y en las muestras del resto de especias (100).

En la TABLA X se sintetizan los resultados obtenidos del estudio de las frecuencias de aparición de / muestras con A. flavus y A. parasiticus en las muestras de pimentón analizadas, según las dos zonas españolas de producción mayoritaria (zona de Murcia y zona de Cáceres) y, dentro de la zona de Cáceres, en la que se producen / varios tipos, según las variedades de pimentón estudiadas (dulce, picante y ocalo agridulce).

Asimismo se recoge en esta tabla la distribución de las muestras en las que se registró la presencia de cepas de A. flavus y A. parasiticus productoras de aflatoxinas en cultivos de laboratorio, agrupadas las / muestras según zonas productoras y, en su caso, según /

5.- DISCUSION.-

5.1.- Limitaciones inherentes al muestreo.-

En cuanto a las limitaciones inherentes al / sistema de muestreo que hemos seguido en nuestro trabajo, debemos señalar dos principales:

1ª) Ya hemos mencionado los Criterios Micro-- biológicos establecidos por la I.C.M.S.F. y los progra-- mas de toma de muestras recomendados por esta Comisión / con el fin de compensar la variabilidad de los resulta-- dos y calcular la incidencia de lotes de productos no ap-- tos (apartado 2.2). Sin embargo, nuestros objetivos se / encaminan fundamentalmente hacia el conocimiento de la / variabilidad de la micoflora en el conjunto de las espe-- cias, y por ello hemos preferido ampliar el número total de muestras y de especias muestreadas a la opción de ana-- lizar 5 muestras de un mismo lote por cada una de las / muestras recogidas, tal y como indica la I.C.M.S.F.

Como consecuencia, de nuestros resultados no deben inferirse estándares microbiológicos, ya que tampoc-- o es el nuestro un criterio legislador. Tan sólo pode-- mos establecer resultados indicativos de las "tasas de /

ción de los resultados obtenidos para las unidades individuales de muestra con los enunciados Criterios de la / Comisión (apartado 4.1.3.3).

2ª) Según señalan Schuller et al. (1.976), el muestreo es el factor más importante que contribuye a la variabilidad de los análisis de micotoxinas, y concretamente de aflatoxinas, en los productos agrícolas, hecho que surge de la naturaleza discontinua de la distribución de las micotoxinas en estos productos. Con fines de inspección, se toman usualmente muestras de 1 a 5 Kg., y el tamaño de la muestra usada en los análisis varía según el método analítico seguido, estableciéndose en 50 / gr. (Robertson et al., 1.965) el compromiso entre economía de solvente y muestra representativa.

Al llevar a cabo nuestro muestreo, y debido a las características propias de las especias y condimentos (su empleo en dosis pequeñas en los usos domésticos habituales, su forma de comercialización e incluso su / precio), los envases recogidos como muestras independientes han contenido frecuentemente una cantidad total de / muestra inferior al tamaño teórico necesario de la muestra inicial para un análisis representativo de micotoxinas (1 Kg. como mínimo), y por ello la posible variabilidad observada en los resultados tampoco puede ser tomada

5.2.- Micoflora de especias.-

Existe escasa información publicada sobre la micoflora presente en las especias, y uno de nuestros / principales objetivos es contribuir al conocimiento detallado de las especies fúngicas que usualmente pueden hallarse como contaminantes de estos productos, incidiendo particularmente en la micoflora presente en el pimentón por razones ya apuntadas.

Algunos autores mencionan en sus publicaciones datos aislados sobre la abundancia de la micoflora / hallada en sus trabajos sobre especias, pero estas referencias rara vez van más allá de citar los recuentos fúngicos obtenidos y concretar algunos géneros o especies / determinadas. Así, por ejemplo, Mislivec et al. (1.972) se refieren a que el 100 % de las muestras que estudiaron de pimienta blanca en grano contenían mohos en su interior, de los cuales Aspergillus flavus era la especie dominante; Christensen et al. (1.972) encuentran A. flavus en gran número en pimienta negra y pimienta roja de la India; Christensen et al. (1.967) y Müller (1.981) / concretan que las especias contienen numerosas especies de Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, Scopulariopsis

sis y otros hongos, concidiendo que de la pimienta negra, pimentón y pimienta roja picante se aislan preferentemente Aspergillus glaucus y A. restrictus, pero también se encuentran con frecuencia A. flavus y A. ochraceus.

Ante la dificultad que hemos encontrado para contrastar nuestros resultados con datos al respecto previamente publicados, vamos a limitarnos a comentarlos / con brevedad.

5.2.1.- Examen de los datos referentes a especies aisladas.-

En la TABLA XXI se comparan las frecuencias / de aparición de los géneros aislados en el total de especies analizadas, en pimentón y en el grupo de especias / heterogéneas restantes (Apartado 4.1.3.1. Ver FIGURAS 2 y 3).

En esta tabla podemos comprobar que es muy notoria la frecuencia con que se aislan, de las especias / en general, especies fúngicas pertenecientes a los géneros Aspergillus y Penicillium, frecuencia que aumenta incluso en el caso del pimentón, llegando en esta especia, y en el caso del género Aspergillus, hasta el 92.50 % de las muestras.

Por otra parte, se aprecia una cierta asidui-

das en el aislamiento de hongos pertenecientes a la clase Zygomycetes (Absidia, Actinomucor, Circinella, Mucor, Rhizopus, Syncephalastrum), especialmente especies pertenecientes al género Mucor. La frecuencia de estos hongos aumenta notablemente en las muestras de pimentón, destacando el incremento de los géneros Rhizopus y Mucor, que se aíslan respectivamente en el 55.83 % y el 58.33 % de las muestras de pimentón, y, tan sólo, en el 3 % y el 22 %, respectivamente, de las muestras pertenecientes al grupo de 27 especies heterogéneas restantes. Por el contrario, los géneros Trichoderma y Fusarium no se han aislado a partir del pimentón, y han obtenido frecuencias del 9 % y 6 %, respectivamente, en aislamientos del conjunto de 27 especies heterogéneas restantes.

En resumen, podemos concluir que los géneros más frecuentemente encontrados en el total de especies / muestreadas son: Aspergillus (80.45 %), Penicillium / (57.27 %) y Mucor (41.82 %), seguidos a mayor distancia / por Rhizopus (31.82 %), Cladosporium (9.54 %), Alternaria (5.91 %) y Trichoderma (4.09 %). En el caso concreto del pimentón, los géneros más frecuentemente aislados / son prácticamente los mismos, con frecuencias algo más / elevadas en la mayoría de los casos: Aspergillus (92.50 %), Penicillium (61.66 %), Mucor (58.33 %), Cladosporium (10.00 %) y Alternaria (6.67 %). Destacan como variacio-

nes más notables el gran incremento que adquiere el género Rhizopus (55.83 %), la ausencia de Trichoderma y la adición de dos nuevos ficomicetos: Absidia (8.33 %) y / Circinella (4.17 %). Por último, en el conjunto de las / 27 especies restantes destaca la disminución registrada en la frecuencia de aparición de Aspergillus (66.0 %) y, sobre todo, la drástica disminución experimentada en el género Rhizopus, que sólo llega a alcanzar un 3 % frente al 55.83 % que exhibe en el pimentón. Por el contrario, y como era de esperar al muestrear un mayor número de especies diferentes, aparecen significativamente nuevos géneros: Fusarium (6.0 %), Acremonium (6.0 %), Paecilomyces (4.0 %) y Stemphylium (4.0 %), manteniéndose otros / géneros ya mencionados: Penicillium (52.0 %), Mucor / (22.0 %), Cladosporium (9.0 %), Trichoderma (9.0 %) y / Alternaria (5.0 %).

Estos resultados coinciden con los citados / por MÜLLER (1.981) en cuanto a Aspergillus, Penicillium y Cladosporium, difiriendo particularmente en el caso de los Zygomycetes, grupo que no es citado en los trabajos consultados y que hemos constatado que aparece con bastante asiduidad, especialmente en el pimentón, hasta el punto de que uno de sus representantes, el género Mucor, se constituye en el tercer género más frecuentemente aislado del conjunto de la micoflora de las especies inves-

A la vista de los resultados obtenidos, creemos de interés profundizar en el estudio de las frecuencias de aparición de las distintas especies fúngicas incluidas en los dos géneros dominantes: Aspergillus y Penicillium (Ver apartado 4.1.3.2 y FIGURAS 4, 5, 6 y 7).

* En lo que se refiere a ASPERGILLUS, género / más frecuentemente aislado en nuestro estudio (TABLA / XXI), a partir de nuestros datos podemos concluir que / predominan claramente las especies incluidas dentro de / los grupos del A. flavus y del A. niger. Así, refiriéndonos a la totalidad de muestras de especies analizadas / (FIGURA 4), las frecuencias de aislamiento de ambos grupos fueron:

-- GRUPO DEL A. FLAVUS: A. flavus (56.36 %), A. tamarisii (15.45 %), A. oryzae (8.18 %) y A. parasiticus (3.64 %).

-- GRUPO DEL A. NIGER: A. niger (57.27 %), A. phoenicis (27.73 %), A. ficuum (17.27 %) y A. awamori / (6.36 %).

Otras especies aisladas, pertenecientes a otros grupos taxonómicos, que alcanzan sólo una relativa frecuencia significativa pero que pueden tener interés / debido a su reconocido poder micotoxigénico, son: A. ver

siculator (11.36 %), A. ochraceus (0.02 %) y A. fumigatus (5.45 %).

Estos resultados difieren sustancialmente de los citados por Christensen et al. (1.967) ya que, aun / coincidiendo en los frecuentes aislamientos de A. flavus y, en menor medida, A. ochraceus, entre la micoflora aislada por nosotros no alcanzan significación las especies de Aspergillus más frecuentemente aisladas por estos autores: A. glaucus y A. restrictus. De hecho, tan sólo hemos aislado esporádicamente especies encuadradas dentro del grupo del A. glaucus: A. repens (3.18 %), A. amstelodami (2.27 %) y A. chevalieri (1.82 %), no citadas expresamente como tales en sus publicaciones.

Cuando consideramos únicamente las muestras analizadas de pimentón (FIGURA 6), los resultados se mantienen en líneas generales en cuanto a que los grupos / del A. flavus y A. niger siguen englobando las mayores / frecuencias de aislamientos, pero hay que destacar el incremento que experimenta A. flavus, que pasa del 56.36 % antes reseñado al 75.00 %. Asimismo, incrementan sus porcentajes A. phoenicis (del 27.73 al 40.83 %), A. niger / (del 52.27 al 60.00 %), A. ficuum (del 17.27 al 25.00 %) A. tamarisii (del 15.45 al 22.5 %) y A. parasiticus (del / 3.64 al 4.17 %), disminuyendo poco apreciablemente A. oryzae y A. awamori. Las otras especies citadas, disminu-

yen muy levemente su presencia, salvo quizás A. versicolor que pasa del 11.36 % al 5.83 %.

* Por lo que se refiere al género PENICILLIUM, las máximas frecuencias de aparición son sensiblemente / inferiores a las que registramos en Aspergillus, y las / ostentan especies encuadradas en las Subsecciones Asimétrica-Velutina y Asimétrica-Fasciculata. Concretamente, si consideramos la totalidad de muestras analizadas (ver FIGURA 5), las especies más frecuentes son:

— ASIMETRICA-VELUTINA: P. chrysogenum / (23.64 %), P. brevi-compactum (6.82 %) y P. roqueforti / (5.00 %).

— ASIMETRICA-FASCICULATA: P. verrucosum var. cyclopium (26.36 %) y P. expansum (4.09 %).

Estas frecuencias se mantienen, con muy ligeras variaciones, si consideramos tan sólo las muestras / de pimentón (FIGURA 7).

Los datos obtenidos muestran la clara preponderancia de dos especies (P. verrucosum var. cyclopium y P. chrysogenum) sobre el resto del género. A su vez, ambas exhiben frecuencias de aparición muy próximas entre si.

Entre estos resultados destaca indudablemente el hecho de que sea A. flavus la especie más frecuentemente aislada, ya que la relación de este hecho con su potencial capacidad toxigénica, discutida en el apartado 5.3.2 (ver TABLAS VIII, IX y X), apoya nuestra presunción de la potencial peligrosidad sanitaria que puede representar la incorporación de especias fuertemente contaminadas a diversos productos alimenticios, sin olvidar la existencia detectada de la contaminación directa por aflatoxinas en diversas especias.

Uniendo a todo ello el dato comprobado del aislamiento significativo de otras especies fúngicas potencialmente micotoxigénicas (Aspergillus amstelodami, A. awamori, A. candidus, A. clavatus, A. chevalieri, A. ficuum, A. fumigatus, A. nidulans, A. niger, A. ochraceus, A. oryzae, A. parasiticus, A. phoenicis, A. tamarrii, A. versicolor, Penicillium brevi-compactum, P. citrinum, P. corylophilum, P. chrysoqenum, P. expansum, P. roqueforti, P. verrucosum var. cyclopium, Rhizopus sp., Phoma sp., Acremonium sp., Alternaria tenuis, A. tenuissima, Fusarium sp., Trichoderma viride, ...), se refuerza nuestra consideración de que es preciso un mayor control analítico de estos productos e incluso de determinados alimentos a los que se adicionan, como comentamos en 5.3.2.

En nuestro propósito de incidir más profundamente en el estudio de la micoflora del pimentón, hemos procedido también a la comparación entre las micofloras aisladas a partir, respectivamente, de las muestras de / pimentón procedentes de las dos zonas españolas mayorita- riamente productoras: Murcia y Cáceres (apartado 4.1.3.2, FIGURA 8). De esta comparación inferimos que parecen / existir ciertas diferencias entre ambas micofloras, prin- cipalmente entre las frecuencias de aparición de algunos de los géneros aislados más constantemente: Penicillium (41.18 % de las muestras procedentes de la zona de Mur- cia por 76.81 % de las muestras procedentes de la zona / de Cáceres), Rhizopus (78.43 % por 39.13 %, respectiva- mente), Mucor (49.02 % por 65.22 %, respectivamente), Ab- sidia (15.69 % por 2.90 %, respectivamente), Cladospo- rium (3.92 % por 14.49 %, respectivamente) y Circinella (0.00 % por 7.25 %, respectivamente).

En lo que se refiere al estudio comparativo / de la presencia de ASPERGILLUS y PENICILLIUM en muestras de pimentón procedentes de ambas zonas productoras (apar- tado 4.1.3.2, FIGURA 9), también parecen existir ciertas diferencias entre las especies aisladas con mayor asidui- dad, en el sentido de que las frecuencias de aislamiento

pergillus en pimentones procedentes de la zona productora de Murcia, mientras que las especies de Penicillium / presentan en general una mayor frecuencia en los pimentones procedentes de la zona productora de Cáceres:

--- Género ASPERGILLUS: A. flavus (88.23 % de las muestras procedentes de la zona de Murcia por 65.22 % de las muestras procedentes de la zona de Cáceres), A. niger (70.59 % por 52.17 %, respectivamente), A. phoenicis (47.06 % por 36.23 %, respectivamente), A. tamaris / (41.18 % por 8.69 %, respectivamente), A. ficuum (31.37 % por 20.29 %, respectivamente), A. ochraceus (9.80 % / por 4.35 %, respectivamente).

--- Género PENICILLIUM: P. verrucosum var. cyclopium (15.69 % de las muestras procedentes de la zona productora de Murcia por 37.68 % de las muestras procedentes de la zona productora de Cáceres), P. chrysogenum (13.72 % por 34.78 %, respectivamente), P. roqueforti / (0.0 % por 11.59 %, respectivamente), P. brevi-compactum (11.76 % por 7.25 %, respectivamente).

Además, hay que hacer notar que la flora esporádica aislada es más variada, en cuanto al número de especies diferentes de Aspergillus y Penicillium, en las / muestras de pimentón procedentes de la zona productora /

Asimismo, hay que señalar que en el transcurso de la identificación de las diferentes cepas pertenecientes al género Penicillium obtenidas de pimentón, se logró el aislamiento de una especie nueva, que se denominó P. aurantio-flammiferum, y que fue objeto, junto a otras, de una publicación previa (Ramírez, Martínez y Berenguer. Mycopathologia. 72, 27-34. 1.981).

---0---

Un último aspecto del estudio de la micoflora del pimentón en el que intentamos profundizar, y que señalamos como uno de nuestros objetivos (apartado 2.3), / lo constituía el establecer comparaciones o relaciones / entre la micoflora aislada en nuestro estudio y la micoflora autóctona de las zonas de producción. Sin embargo, apenas hemos encontrado información sobre la flora fúngica autóctona de las zonas de producción, y, tan sólo, en una publicación de la Consejería de Agricultura de la Comunidad Autónoma de Murcia (1.982), se mencionan los hongos que producen las enfermedades más comunes que afectan al pimiento para pimentón. Entre ellos, se citan: Pythium debaryanum, P. ultimum, Rhizoctonia solani, Botrytis cinerea, Phytophthora capsici, Verticillium dahliae,

Fusarium oxysporum, Levellia tuculica y Coccinobolus ce-
satii, si bien estos hongos necesitan, en algunos casos,
medios de cultivo especiales para su crecimiento.

En cualquier caso, se observa claramente que no existe relación alguna entre la posible presencia de estos hongos sobre las plantas y frutos de pimiento para pimentón y la micoflora que hemos aislado en nuestro estudio sobre esta especie. Por ello, y como ya hemos apuntado, opinamos que la flora fúngica que aparece en las / especias es producto fundamentalmente de la contamina-
ción ambiental subsiguiente a la recolección de las mate-
rias primas, y, principalmente, durante el período de al-
macenamiento, procesado, manipulación, transporte y co-
mercialización. En el caso del pimentón, esta opinión /
coincide con la afirmación de Costa (1.982) de que, por
diversas circunstancias, es frecuente, por ejemplo, que
en el momento de la recolección del pimiento el volumen
del fruto recogido supere la capacidad de secado de las
plantas deshidratadoras, teniendo, por tanto, que ser al-
macenado. Este almacenaje se realiza generalmente en lo-
cales no siempre apropiados, con los sacos apilados y /
sin la ventilación suficiente que contrarreste el conte-
nido en humedad de los frutos, con lo que se producen re-
calentamientos y fermentaciones favorables a los ataques
de bacterias y hongos.

hincapié en que las especies fúngicas dominantes que hemos aislado habitualmente en las diferentes especies presentan en muchos casos elevadas frecuencias de aparición, es decir, no son esencialmente diferentes de unas especies a otras, a pesar de proceder de materias primas muy diversas y de hábitats geográficos, climáticos y edáficos muy distintos entre sí, y de ser objeto de procedimientos de procesado, almacenamiento y comercialización diferentes. Se trata, por otra parte, de especies fúngicas / habitualmente conceptuadas como cosmopolitas, colonizadoras de multitud de hábitats y susceptibles, por tanto, / de amplias áreas de dispersión.

5.3.- Resultados cuantitativos.-

5.3.1.- Recuento en placa (Análisis de las variaciones cuantitativas).-

El método de recuento fúngico en placa presenta algunos problemas, comunes a todas las técnicas que / requieren el aislamiento en placa de agar de colonias de microorganismos, tales como:

-- La competencia de las colonias en las placas (según señalan Dwivedi y Garret, 1.968), que puede /

ser capaz de provocar la eliminación de formas de crecimiento lento o de escasa resistencia a la fungistasis.

— La selectividad inevitable del medio de cultivo empleado y de las condiciones de incubación, que pueden influir en el desarrollo de algunas especies.

— La manipulación incorrecta de las diluciones decimales puede provocar la existencia de agregados con acúmulos de propágulos que sólo van a originar una colonia en la placa de recuento, con el consiguiente error añadido. Por otra parte, y debido al tamaño considerable que alcanzan diversos propágulos fúngicos, la demora en la preparación sucesiva de las diluciones decimales y la demora en la siembra de cada una de ellas en las placas de recuento, son dos factores que pueden introducir importantes errores en el método.

Como corolario de estos problemas, puede inferirse que los recuentos en placa efectuados a partir de una sola dilución pueden dar valores inferiores a los reales, como señalan Mateos et al. (1.982).

A pesar de todo ello, Montegut (1.960) indica que es el método más adecuado para realizar cualquier trabajo comparativo, y Jensen (1.962) opina que es el método más útil para la realización simultánea de estimaciones de la actividad fúngica y aislamiento de las espe

cies presentes. Además, creemos que algunos de sus inconvenientes pueden obviarse:

1ª) Con el empleo de un medio de cultivo de / revivificación (medio de triptona de soja. Apartado 3.2), adecuado, según indica Mossel (1.982), para que todos / los propágulos existentes en el alimento se encuentren / en condiciones óptimas para originar una colonia de crecimiento y conseguir de este modo un recuento fiable.

2ª) Con la utilización de medios de cultivo / para recuento que permitan el amplio desarrollo de la mayoría de especies fúngicas, como el agar-glucosa-oxite--traciclina (O.G.A.), citado en el apartado 3.2, y, en caso de duda, realizar el recuento al unísono con otro medio de cultivo que permita el crecimiento de especies / más sensibles, como pueden ser los Dermatofitos en general. En estos casos es aconsejable simultanear el uso / del medio O.G.A. con el medio de agar Sabouraud-dextrosa 4 %, citado en el apartado 3.3.

3ª) Al efectuar las diluciones decimales previas al recuento, es aconsejable el uso de agentes tenso activos, como el TWEEN 80, para conseguir la dispersión homogénea de los propágulos en los volúmenes totales o / parciales manejados. Asimismo, y con el mismo fin, se / precisa una agitación mecánica intensa en el momento de la preparación de las diluciones decimales seriadas e /

evitando demoras en los sucesivos pasos.

A diferencia del método de una sola dilución, el método de la recta de regresión (apartado 3.2.2) proporciona unos recuentos calculados en los que se tiene / en cuenta la razón real entre las diluciones en lugar de la teórica (caso del método de una sola dilución), y por ello tal vez más próximos a los valores reales. Por esta razón hemos llevado a cabo el recuento fúngico simultáneamente por ambos métodos en un total de 56 muestras de pimentón, con el fin de comparar los resultados obtenidos. Estos resultados se han reunido en la TABLA VI. Como puede observarse en ella, los valores de los recuentos en placa por los dos métodos presentan variaciones / notables en algunos casos. En general, los recuentos obtenidos con la recta de regresión ajustada a los valores de todas las diluciones son más elevados, oscilando desde 0,06 a 3.250,67 veces los obtenidos de una dilución, con un promedio para las 56 muestras comparadas de / 100,84 veces, y una elevadísima desviación típica.

En cualquier caso, de los resultados observados resulta claro comprobar como en los recuentos fúngicos conseguidos con la recta de regresión es sumamente / influyente el azar, ya que el cálculo a partir de distin

nal al sobreestimar los valores tomados de las dilucio--
nes mayores en detrimento de los valores tomados de las
diluciones menores, como señala Martínez (1.976); en e--
fecto, en estas circunstancias la aparición casual de u--
na colonia en las diluciones elevadas modifica la pen---
diente de la recta de regresión en forma mucho más impor--
tante que si apareciese en diluciones anteriores, con un
resultado final muy superior en el recuento. Todo ello /
provoca una gran variabilidad en los valores obtenidos /
por este método, por lo que resulta poco adecuado, espe--
cialmente a la hora de efectuar comparaciones, como pre--
tendamos en nuestro estudio.

Por todo lo expuesto, hemos optado por ajus--
tarnos en nuestras conclusiones a los resultados obteni--
dos a partir de una sola dilución, expresados en las TA--
BLAS IV y V (apartado 4.2.1.1).

Ya mencionamos en el apartado 2.1 que una de
las características destacables de las especies es la /
presencia en muchas de ellas de sustancias con acción an--
timicrobiana, y concretamente antifúngica, y tal circuns--
tancia podría tener "a priori" influencia sobre los re--
cuentos fúngicos. Hitokoto et al. (1.980) comprobaron /
que este efecto es especialmente acusado en ciertos ca--

hibitorio sobre el crecimiento de la flora de mohos y levaduras, obteniéndose recuentos sumamente bajos (datos / de Jay, 1.978; Müller, 1.981; ...), e incluso nulos, como ocurre en los resultados obtenidos por nosotros (ver TABLAS IV y XX). Según datos de Masada (1.975), citados por Hitokoto et al. (1.980), la fracción constituida por el aceite esencial del clavo contiene de un 70 a un 95 % de eugenol, y, según estos últimos autores, calculando / sobre una base de un contenido del 92 % de eugenol en la fracción de aceite esencial del clavo, cada gramo de esta especia molida contiene 142 mg. de eugenol. Estos autores demostraron un fuerte efecto inhibitorio del eugenol y timol sobre el crecimiento de Aspergillus toxigénicos (A. flavus, A. ochraceus y A. versicolor), siendo notorio el hecho de que el clavo era capaz de inhibir completamente el crecimiento de cepas de estos Aspergillus a una concentración de 3.5 mg. de clavo/ml. de medio, en cultivos de laboratorio. De las 29 clases de especias molidas ensayadas por Hitokoto et al., el clavo fué la que presentó un mayor efecto inhibitor sobre el crecimiento de los mohos utilizados en el ensayo, seguido por el anís estrellado y la pimienta inglesa. En el extremo opuesto, entre las 12 especias con un efecto relativamente menor sobre el crecimiento y/o la producción de toxi-

%), se encontraba el pimentón.

Por otra parte, algunas especias con un principio activo de potente acción antimicrobiana se detectan fuertemente polucionadas por microorganismos, y concretamente hongos. Así, el tomillo contiene de un 20 a / un 60 % de timol, según datos de Stahl (1.973), y calculando sobre una base de contenido del 54 %, según Hitokoto et al. (1.980), cada gramo de esta especia contiene 3 mg. de timol. Este posee un coeficiente fenólico de 20, y la esencia de tomillo de 13.4, según Herrman (1.963). Sin embargo, a pesar de todas estas consideraciones y a diferencia de lo que ocurre en el clavo, donde la potente acción antimicrobiana y antifúngica del principio activo de la esencia de clavo guarda una estrecha correlación con los escasos o nulos recuentos fúngicos detectados, los resultados que nosotros hemos obtenido al analizar muestras de tomillo manifiestan elevados recuentos / de mohos y levaduras: entre 56.000 y 170.000 col./gr. de especia, cifras bastante coincidentes con las publicadas por otros autores (Jay, 1.978; Müller, 1.981).

Como ya mencionamos en el apartado 2.2, distintos autores citan recuentos fúngicos como resultado / de sus estudios: Krishnawamy et al. (1.971, 1.973) se refieren a los mohos y levaduras como contaminantes de las

especies que estudiaban (pimienta negra, cilantro, mosta-
za, comino, "curry", hinojo), encontrando los recuentos
más altos en pimienta negra: 9.800 col./gr. Sin embargo,
los resultados que hemos obtenido en nuestro estudio in-
dican recuentos particularmente más elevados en cominos
(300 a 38.000 col./gr.), "curry" (0 a 80.000 col./gr.) y
pimienta negra (900 a 180.000 col./gr.). Asimismo, nues-
tros datos experimentales indican, en general, una mayor
contaminación fúngica que la registrada por Schwab et al.
(1.982). Otros autores, como Christensen et al. (1.967,
1.972) señalan una fuerte contaminación por A. flavus /
(superior a las 20.000 col./gr.) en pimienta negra y pi-
mienta roja, si bien la que encontraron en pimientos del
género Capsicum la citan como poco importante. Nuestros
resultados, coincidentes con los citados para pimienta /
negra, difieren en cuanto a los citados sobre el género
Capsicum, ya que hemos obtenido recuentos entre 0 y /
30.000.000 col./gr. en las muestras de pimentón analiza-
das. En este sentido, nuestros resultados se hallan más
próximos a los citados por Jay (1.978) (2.300 a 30.000 /
col./gr.) y Müller (1.981) (0 a 1.200.000 col./gr.).

En resumen, y teniendo en cuenta que no son /
muy numerosos los datos publicados sobre los recuentos /
fúngicos hallados en especias, en la TABLA XX comparamos
nuestros resultados en el conjunto de especias que hemos

analizado con los datos publicados por Jay (1.978) y Muller (1.981) sobre especias coincidentes.

De estos datos comparados y los resultados / que resumimos en el apartado 4.2.1.1 y las TABLAS IV y V concluimos que existe una notable contaminación micológica en el conjunto de las especias que hemos analizado, / si bien se aprecia una gran variabilidad en los recuentuos fúngicos obtenidos en especias distintas, e incluso dentro de una misma especie. En algunos casos (clavo, ajo, cebolla, cúrcuma, ...), y como indican diversos autores, la existencia de principios activos con acción inhibibidora del crecimiento microbiano puede dar lugar a la / obtención de recuentos fúngicos bajos o nulos. En otros casos, sin embargo, los recuentos son elevados, y la / gran variabilidad detectada en ciertas especias, como piñmienta negra (900 a 180.000 col./gr.), pimienta blanca / (0 a 520.000 col./gr.), "curry" (0 a 80.000 col./gr.), / pimentón (0 a 30.000.000 col./gr.), etc., puede atribuirse se a diversos factores, entre los que destacan los procedimientos de obtención, desecado y esterilización aplicados en unos casos y no en otros. Así, los procedimientos de esterilización disminuyen notablemente la carga micológica que portan las especias, y es un hecho que hemos comprobado procediendo al recuento de mohos y levaduras en un mismo pimentón antes y después de su esteriliza---

ción con oxido de etileno, obteniendo el siguiente resultado:

-- Recuento antes de la esterilización: 36.000 col./gr.

-- Recuento después de la esterilización: 85 col./gr.

Puede comprobarse la notable eficacia que llegan a alcanzar ciertos procedimientos de esterilización usualmente aplicados a las especias, y que citamos en el apartado 2.2.

También en el apartado 2.2, mencionamos los / criterios microbiológicos recomendados por la I.C.M.S.F. para el recuento de mohos y levaduras en especias. En / nuestros resultados (apartado 4.1.3.3) procedimos a comparar los resultados individuales que obtuvimos con los Criterios recomendados por dicha Comisión, expresándolos en forma de histogramas y tablas. Insistiendo en la salvedad que allí hacíamos de que nuestro plan de muestreo no ha sido diseñado sobre las 5 unidades de muestra de / cada lote, como recomienda la I.C.M.S.F., y sólo con el fin de obtener una indicación de las "tasas de rechazo", podemos inferir de nuestros resultados una baja calidad microbiológica de las especias en general, y del pimentón en particular, no tanto por las "tasas de rechazo" / obtenidas (considerables, en general), sino por la gran cantidad de muestras incluíbles en la denominada "calidad marginal". En efecto: En el conjunto de 100 muestras

de 27 especias heterogéneas analizadas, la "tasa de rechazo" hipotética se establecería en un 31 %, y la "calidad marginal" la constituiría otro 31 % de las muestras. En el caso del pimentón, si bien la "tasa de rechazo" sería algo menor (25.83 %), la "calidad marginal" la constituiría un notable 67,50 %, resultando tan sólo un 6.67 % de las 120 muestras analizadas incluíble en la denominada "calidad buena", con un recuento entre 0 y 10^2 col. por gr. de muestra.

Estas "tasas de rechazo" que hemos obtenido / como indicación son bastante más elevadas que las encontradas por Schwab et al. (1.982) en su estudio, sobre todo en lo que se refiere a ciertas especias, como el pimentón.

En cuanto a la existencia de diferencias en / el grado de contaminación fúngica existente en el pimentón producido en las dos zonas productoras más importantes de nuestro país, de los resultados que hemos obtenido (apartado 4.1.3.3) parece significarse una mayor "tasa de rechazo" para el pimentón procedente de la zona de Cáceres sobre el procedente de la zona de Murcia (33.33 % por 15.69 %, respectivamente), si bien tal apreciación se halla ciertamente condicionada ya que la "calidad marginal" del pimentón de la zona de Murcia es superior a / la apreciada en el pimentón procedente de la zona de Cá-

ceres (74.51 % por 52.52 %, respectivamente), y puesto / que se trata de muestras situadas en muchos casos en el límite inmediato a la "tasa de rechazo", pequeñas variaciones en los recuentos podrían hacer oscilar estos porcentajes.

Las diferencias, no obstante, se mantienen en forma bastante análoga al comparar un mismo tipo de pimentón (pimentón dulce), producido en ambas zonas: el / procedente de la zona de Cáceres presenta una "tasa de / rechazo" superior a la del procedente de la zona de Murcia (36.00 % por 15.69 %, respectivamente), invirtiéndose los términos al comparar la "calidad marginal" de ambos (74.51 % en el procedente de la zona de Murcia por / 64.00 % en el procedente de la zona de Cáceres).

Si tratamos de comparar los tres tipos de pimentón existentes en el mercado (dulce, picante y ocal o agridulce), comprobamos que el pimentón dulce y el pimentón picante presentan unas "tasas de rechazo" y una "calidad marginal" bastante semejantes, aunque levemente superiores en el caso del pimentón dulce:

PIMENTON DULCE: "Tasa de rechazo" = 22.37 %.

"Calidad marginal" = 71.05 %.

PIMENTON PICANTE: "Tasa de rechazo" = 20.69 %.

"Calidad marginal" = 68.97 %.

Por el contrario, el PIMENTON OCAL presenta

na "tasa de rechazo" muy incrementada (53.33 %) y una /
"calidad marginal" donde se incluye el resto de las mues-
tras estudiadas (46.67 %). Tal vez estos últimos resulta-
dos puedan estar parcialmente influenciados por el menor nú-
mero de muestras de este tipo de pimentón estudiadas.

-----0-----

Los datos expuestos, comprobados a lo largo /
de nuestro estudio, apoyan nuestra tesis sobre la exis--
tencia de una elevada contaminación fúngica en las espe-
cias en general de consumo más frecuente en nuestro país.
Puesto que la contaminación microbiológica de estos pro-
ductos parece poco menos que imposible de prevenir o evi-
tar (aspecto en el que insistimos en el apartado 2.2), /
debido al desfavorable proceso que se sigue generalmente
desde su recolección, durante su procesamiento y almace-
namiento y hasta su comercialización, opinamos que im---
plantar un procedimiento de esterilización sistemática y
rutinaria de las especias, antes de su envasado para la
venta al público, sería una solución viable para mejorar
la deficiente calidad microbiológica detectada en la ac-
tualidad.

Asimismo, a la vista de los resultados, cree-
mos de interés el establecimiento de una especificacio--

nes microbiológicas concretas sobre estos productos, que contemplen límites tolerables de contaminación fúngica, con el fin de salvaguardar y controlar su higiene y calidad sanitaria ante el consumidor directo o ante la adición de las especias a otros diversos productos alimenticios.

5.3.2.- Aflatoxinas y cepas productoras.-

En el apartado 5.1 hicimos referencia al muestreo como el factor más importante que contribuye a la variabilidad de los análisis de aflatoxinas en productos agrícolas, y de las soluciones de compromiso a las que se acude para la realización de análisis representativos.

Además de estas circunstancias limitantes, la metodología analítica para la investigación de micotoxinas en general (y aflatoxinas en particular) puede complicarse por el hecho de que los productos agrícolas a estudiar pueden ser lo suficientemente distintos entre sí como para requerir procedimientos de extracción diferentes, y también por la posible existencia de materia inerte, pigmentos y sustancias diversas que interfieran en el análisis, lo que hace necesaria una etapa adicional en el método analítico utilizado.

Los métodos habitualmente empleados para la /

determinación de aflatoxinas en frutos secos y granos /
son inapropiados en general para el conjunto de las espe
cias, a causa de excesivas interferencias en el desarro
llo de la cromatografía en capa fina. Tal es el caso del
METODO III (apartado 3.5.1), que sólo hemos aplicado en
casos aislados (ajo, anís, cebolla y vainilla).

Los métodos diseñados por Pons et al. (1.970)
y Romer (1.973), que incorporan el tratamiento con aceta
to de plomo y la columna de cromatografía para conseguir
una limpieza más eficaz del extracto, parecieron prometa
dores para el análisis de pimienta negra hasta que se /
descubrió una pérdida sustancial de aflatoxina B₁ en la
fase de precipitación con acetato de plomo.

Scott y Kennedy (1.973) encontraron que la /
cromatografía en capa fina bidimensional resolvía en /
gran medida el problema de las interferencias en los aná
lisis de pimientos, tras haber logrado el aislamiento de
las aflatoxinas por los métodos oficiales de la A.O.A.C.:
Método CB para pimienta blanca y pimienta negra y Método
BF para pimientos de Capsicum.

Suzuki et al. (1.973) proponen otro método mo
dificado para la determinación de aflatoxinas en espe
cias, de resultados comparables al de Scott y Kennedy ya
mencionado.

Tras la comparación previa de los diferentes

metodos, hemos preferido aplicar en nuestro estudio los métodos de Scott y Kennedy (1.973) para la determinación de aflatoxinas en especias (METODOS I y II, apartado / 3.5.1), debido a su eficacia y mayor simplicidad, coincidiendo con la opinión al respecto expresada por Beljaars et al. (1.975). No obstante, hemos comprobado que el Método BF (A.O.A.C., 1.980) utilizado por Scott y Kennedy (1.973) para pimientos de Capsicum (METODO I, apartado / 3.5.1) presenta todavía ciertos problemas de interferencias en el posterior análisis cromatográfico, especialmente al analizar pimentón, y que en esta especia resulta más conveniente la etapa de limpieza en columna utilizada en el Método CB (A.O.A.C., 1.980), aunque la metodología resulta evidentemente menos rápida (METODO II, apartado 3.5.1).

Haciendo la salvedad indicada en las limitaciones inherentes al muestreo (apartado 5.1-2º), de los resultados obtenidos al analizar las 220 muestras de especias, reunidos en el apartado 4.2.2, podemos concluir que la contaminación por aflatoxinas de las especias estudiadas es baja: 8.18 % del total de las muestras. Sin embargo, esta incidencia es nula en la mayoría de las especias analizadas, y aumenta considerablemente en tres / de ellas (pimienta blanca: 16,66 %; pimienta de Cayena: /

40.00 %; pimienta negra: 41.00 %), manteniéndose en el / caso del pimentón (8.33 %). En cualquier forma, las cantidades de aflatoxina que hemos detectado son pequeñas / (ver TABLA VII), con un máximo de 41 μ g./Kg. de aflatoxina total en una muestra de pimentón.

Estos resultados son bastante coincidentes / con los citados por Beljaars et al. (1.975), Suzuki et / al. (1.973), Scott y Kennedy (1.973), Christensen (1.972) etc., y de ellos podemos inferir que si bien la contaminación por aflatoxinas de las especias en general no parece presentar un peligro potencial inmediato para la salud del consumidor directo de estos productos, la constatable frecuencia de aparición de estas micotoxinas en especias concretas (pimientas y pimentón, especialmente), y la coincidencia de elevados recuentos de Aspergillus / del grupo flavus en ellas son circunstancias que hacen / recomendable el control analítico de estos productos.

Asimismo, y ante la variabilidad de los resultados publicados por diversos autores, incluidos los obtenidos en nuestro estudio, sería deseable la realiza---ción de un estudio exhaustivo, preferentemente con la / participación de distintos laboratorios, basado en un / muestreo más extenso de, al menos, aquellas especias más significativamente contaminadas por micromicetos poten---cialmente toxigénicos, y dirigido a la investigación glou

metabolitos tóxicos, con el fin de proceder, a partir de los resultados obtenidos en su conjunto, a una evaluación higiénico-sanitaria más concreta de dichos productos.

Por otra parte, Beljaars et al. (1.975) y Suzuki et al. (1.973) mencionan la presencia de aflatoxinas / en nuez moscada, significativa en cuanto al elevado número de muestras contaminadas (que supera el 60 % de las / muestras analizadas por estos autores), aunque también / en cantidades poco elevadas. En nuestro estudio, todas / las muestras de esta especie que hemos analizado han dado resultado negativo, si bien hay que hacer constar que la totalidad de nuestras muestras era de nuez moscada en tera mientras que en el caso de los autores citados todas las muestras aflatoxina-positivas eran de nuez moscada molida. Este dato parece guardar estrecha relación / con la contaminación fúngica detectada por diversos autores en esta especie. Así, Müller (1.981) cita recuentos entre 700 y 46.000 col./gr., mientras que nuestros resultados sobre nuez moscada entera oscilan entre 0 y 40 col./gr. Parece evidente que el procesamiento o manipulación industrial de esta especie (molienda, almacenamiento,...) tiene gran influencia en su contaminación por micromicetos, incluso por cepas aflatoxigénicas.

llevado a cabo sobre cepas productoras de aflatoxinas en cultivos de laboratorio, como indicamos en los apartados 3.5.2 y 4.2.3 lo hemos concretado en las numerosas cepas aisladas, del conjunto de especies analizadas, que identificamos como pertenecientes al grupo del Aspergillus / flavus, capaces "a priori" de ser productoras de aflatoxinas: A. flavus Link y A. parasiticus Speare.

En la bibliografía se citan numerosos medios de cultivo utilizables en la evaluación de la capacidad aflatoxigénica de cepas pertenecientes a las especies citadas. En algunos casos, la producción observada en estos medios es mayor que la detectada sobre el MEDIO APA que nosotros hemos empleado (apartado 3.5.2), especialmente en medios de cultivo a base de cacahuete, maíz o / trigo (Wicklów et al., 1.981; Mateos et al., 1.982; Mateos y Suárez, 1.983), e incluso cepas designadas como no productoras de aflatoxinas sobre MEDIO A.P.A. han resultado productoras al cultivarse sobre estos medios. A pesar de todo ello, en nuestro estudio hemos utilizado el MEDIO A.P.A., propuesto por Hara et al. (1.974), con la variante de sustituir el licor de macerado de maíz por / extracto de levadura, principalmente por dos razones:

1ª) La fiabilidad del MEDIO A.P.A. en lo que se refiere a la NO producción de falsos positivos, dato

comprobado por Wicklow et al. (1.961), lo que evita sobrestimaciones en nuestros resultados.

2ª) La facilidad y constancia en la reproducción de la experiencia, al tratarse de un medio semisintético que, a efectos, puede considerarse prácticamente como sintético. Con ello evitamos en lo posible la variación en la respuesta de las cepas ensayadas, algo difícil de asegurar al utilizar medios de cultivo naturales debido a la posible variabilidad de los componentes inherente a todo medio natural.

Por otro lado, de la observación a la luz / U.V. de 254 y 366 nm. de las placas con MEDIO A.P.A. inoculado con las cepas a ensayar, sistema propuesto por Hara et al. (1.974) como rápido y eficaz, no obteníamos / buenos resultados en cuanto a interpretaciones fiables / de positivos y negativos, por lo que decidimos realizar como parte del ensayo rutinario el análisis químico del medio de cultivo y el micelio crecido durante el período de incubación en oscuridad.

De los resultados que obtuvimos tras el ensayo de las 296 cepas aisladas pertenecientes a Aspergillus del grupo flavus (reunidos en las TABLAS VIII, IX y X, y en el apartado 4.2.3), podemos concluir que:

* Según se resume en la TABLA VIII, el porcenta

de cepas productoras de aflatoxinas es del 37.34 % /
(107 de 285 cepas ensayadas) para A. flavus, del 33.33 %
(1 de 3) para A. flavus var. columnaris y del 25.00 % (2
de 8) para A. parasiticus.

Estos resultados son algo más elevados que /
los mencionados por Hadlok (1.970) en su estudio sobre /
153 cepas de A. flavus aisladas de pimienta negra, donde
las cepas aflatoxigénicas constituían el 30 % de las ensa
yadas.

La mayoría de las cepas de A. flavus que he--
mos detectado como aflatoxigénicas en nuestro estudio de
laboratorio producen simultáneamente aflatoxinas B₁ y B₂
(70.09 %). En menor proporción se encuentran las cepas /
que producen aflatoxinas B₁ (27.10 %), B₁, B₂, G₁ y G₂ /
(1.87 %) y B₂ (0.93 %). En el caso de A. flavus var. co-
lumnaris, la cepa toxigénica hallada produjo aflatoxinas
B₁ y B₂, mientras que de las dos cepas de A. parasiticus
detectadas como aflatoxigénicas, una produjo aflatoxina
B₁ y la otra aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

* En los resultados resumidos en la TABLA IX se
observa que A. flavus se aisló en 124 muestras del total
de 220 muestras estudiadas (56.36 %), si bien este resul
tado puede ser desglosado en dos partes: por un lado, de
las 100 muestras de 27 especies heterogéneas analizadas
se aísla A. flavus en tan sólo 34 de ellas (34.00 %), /

analizadas, se aísla A. flavus en 90 de ellas (75.00 %).

En cuanto a la distribución de la presencia / de cepas aflatoxigénicas en las especias, aparecen en el 33.18 % de las 220 muestras totales y en el 58.87 % de / las 124 muestras en las que se detecta presencia de A. / flavus. En el caso del pimentón, estos porcentajes de a- parición de cepas aflatoxigénicas aumentan relativamente situándose en el 54.17 % de las 120 muestras analizadas y en el 72.22 % de las 90 muestras en que se detecta pre- sencia de A. flavus. Para el conjunto de las restantes / 27 especias heterogéneas, los porcentajes disminuyen no- tablemente, estableciéndose en el 8.00 % de las 100 mues- tras analizadas y en el 23.53 % de las 34 muestras en / las que se detecta A. flavus, respectivamente.

En lo que se refiere al A. parasiticus, los / resultados obtenidos son algo inferiores a los expresa- dos para A. flavus, detallándose también en la TABLA IX.

* Al estudiar por separado las 51 muestras de / pimentón procedentes de la zona productora de Murcia y / las 69 muestras de pimentón procedentes de la zona pro- ductora de Cáceres (TABLA X) se observa que:

1.- Existe una mayor frecuencia en la apari- ción de A. flavus en el pimentón procedente de la zona / productora de Murcia que en el de la zona productora de

respectivamente).

2.- Las muestras de pimentón en las que se detecta A. parasiticus son todas procedentes de la zona / productora de Cáceres.

3.- El porcentaje de muestras totales con cepas productoras de aflatoxinas es muy superior en las / muestras procedentes de la zona de Murcia (74.51 %) que en las procedentes de la zona de Cáceres (39.13 %), diferencia que se mantiene, si bien en menor grado, al comparar tan sólo aquellas muestras en las que se aisló previamente A. flavus (84.44 % y 60.00 %, respectivamente).

Aunque, en cualquier caso, la proporción de / muestras en las que se detectan cepas aflatoxigénicas es notable, en estas significativas diferencias pensamos / que influye fundamentalmente la diferente temperatura ambiental media que existe en ambas zonas productoras, más elevada en la zona murciana y más próxima a las temperaturas óptimas de crecimiento y producción de toxinas de estos hongos (apartado 2.2. TOXICIDAD).

Por último, y dentro de las 59 muestras de pimentón procedentes de la zona productora de Cáceres, entre los diferentes tipos de pimentón estudiados (dulce, picante y ocal) presenta una mayor incidencia de muestras con presencia de A. flavus el pimentón dulce que el

picante y el dulce (12.00 % por 52.00 % y 33.00 %, respectivamente). Asimismo, es mayor en el pimentón dulce la frecuencia de muestras portadoras de cepas aflatoxigénicas (44.00 % por 34.48 % y 40.00 %, respectivamente). Coincidentemente, todas las muestras portadoras de A. parasiticus (5 del total de 69 muestras analizadas) eran de pimentón dulce.

-----0-----

Ante el conjunto de resultados que hemos obtenido al estudiar las cepas aisladas de Aspergillus del grupo flavus productoras de aflatoxinas en cultivos de laboratorio, y principalmente los obtenidos en el caso de la especia más intensamente muestreada, el pimentón, quisieramos resaltar la potencial peligrosidad sanitaria que puede representar la incorporación de especias fuertemente contaminadas por micromicetos potencialmente micotoxigénicos a productos alimenticios (con un cierto paralelismo con la derivada de la incorporación de féculas contaminadas por mohos potencialmente micotoxigénicos o sus metabolitos tóxicos a preparados alimenticios o farmacéuticos, aspecto ya citado por Suárez e Ylla-Catalá (1.977) y Suárez et al. (1.977)). En ciertos productos alimenticios, sus propias características como sustratos para el crecimiento fúngico, por un lado, y condiciones ambientales favorables a dicha proliferación (principalmente du-

lante procesos de maduración o períodos de almacenamiento prolongados de tales alimentos), por otro, pueden favorecer la acumulación en ellos de metabolitos tóxicos, hipótesis de trabajo desarrollada en estudios de laboratorio por diversos autores que ofrece resultados experimentales como los obtenidos por Lancilloti y Lucisano / (1.971) que parecen apoyar esta posibilidad.

5.3.3.- Contaminación. Toxicidad. Importancia sanitaria. Legislación.-

CONTAMINACION.-

Como indicamos en el apartado 5.3.1, la contaminación micológica de las especias que hemos analizado presenta una gran variabilidad en cuanto a recuentos fúngicos, contrastando, en ambos extremos, la escasa o nula contaminación observada en especias como ajo, cebolla, / clavo, cúrcuma o vainilla y los elevados recuentos encontrados en pimentón, pimienta blanca, pimienta negra, menta, tomillo, orégano, romero, albahaca, "curry" y sazónadores en general.

A partir de nuestros resultados (TABLAS IV, V y XX), coincidimos con otros autores al considerar que, en conjunto, existe una notable contaminación fúngica en las especias analizadas. Consideramos que esta contaminación viene dada, fundamentalmente, por flora de almacena

a su recolección, generalmente por condiciones incorrec-
tas de almacenamiento y manipulación hasta su envasado /
final. Esta opinión la fundamentamos en el hecho de ais-
lar con gran frecuencia las mismas especies fúngicas en
especies totalmente diferentes y procedentes de hábitats
geográficos muy distantes entre si. Por otra parte, la /
TABLA XXI refleja la gran asiduidad con que se aislan es-
pecies de Aspergillus y Penicillium, que constituyen la
que podríamos denominar micoflora contaminante habitual
de las especies, junto a otros géneros que se aislan con
cierta periodicidad: Mucor, Rhizopus, Cladosporium, Al-
ternaria, Acremonium, Absidia, Trichoderma, ...

TOXICIDAD.-

Hacíamos referencia, en el apartado 2.2, a la
posible existencia de mohos micotoxigénicos y sus meta-
bolitos tóxicos en las especies. A este respecto, nues-
tros resultados nos hacen considerar dos aspectos distin-
tos:

* Por un lado, la contaminación por aflatoxinas
que hemos encontrado globalmente en las especies estudia-
das es baja: tan sólo hallamos presencia de estas micoto-
xinas en el 8.18 % de las 220 muestras analizadas; ade-
más, y según insistimos en 5.3.2, en la mayoría de las /

especias estudiadas no se detecta su presencia. Tan solo en cuatro especias (pimienta blanca, pimienta de Cayena, pimienta negra y pimentón) se puso de manifiesto la presencia de aflatoxinas, llegándose incluso a tasas de incidencia notables, aunque en cualquier caso en cantidades muy bajas que no llegaron a sobrepasar los 41 $\mu\text{g.}/\text{Kg}$, según reflejamos en la TABLA VII. Estos resultados son, en general, coincidentes con los de otros autores (Beljaars et al., 1.972, 1.975; Suzuki et al., 1.973; Scott y Kennedy, 1.973; Christensen, 1.967, 1.972, etc.). Sin embargo, la discordancia de nuestros resultados con los de otros autores en ciertas especias (nuez moscada, por ejemplo), y la escasa cantidad de muestras analizadas en muchos casos, nos hace coincidir con Beljaars et al. / (1.975) al considerar como conveniente un estudio internacional en profundidad para determinar la incidencia y nivel de contaminación por aflatoxinas de los diversos / tipos de especias.

* Por otro lado, cremos que hay que resaltar el aspecto concreto de la presencia de especies fúngicas potencialmente micotoxigénicas en las especias (ver apartado 5.2.1, pág. 125). De todas ellas, es significativa la abundante presencia de Aspergillus flavus en las diferentes especias estudiadas, con frecuencias de aparición en las muestras recogidas que alcanzan el 56.36 % para la /

totalidad de las 20 especies, el 75.00 % para el pimentón y el 34.00 % para el grupo heterogéneo de 27 especies restantes. Además, el estudio de laboratorio realizado en las cepas de Aspergillus del grupo flavus (A. flavus y A. parasiticus) aisladas, detallado en el apartado 4.2.3 y comentado en 5.3.2 (296 cepas en total; TABLAS VIII, IX y X), proporcionó tasas de hasta un 37.54 % de cepas productoras en el caso del A. flavus, resultado algo más elevado que el citado por Hadlok (1.970).

IMPORTANCIA SANITARIA.-

Nuestros resultados apuntan a que en las especies, en general, existen deficiencias en cuanto a las condiciones higiénicas de los productos, refiriéndonos concretamente a la contaminación micológica, ya que los recuentos son superiores, en un alto porcentaje de casos, a los admitidos como aceptables por organismos internacionales (I.C.M.S.F.).

En lo concerniente a la importancia sanitaria de los resultados que hemos obtenido en nuestro estudio, la incidencia y nivel de contaminación por aflatoxinas detectados en los análisis, junto a la forma habitual de utilización de estos productos alimenticios, nos inclina a pensar que no existe un riesgo sanitario directo para el consumidor.

sin embargo, y aunque los resultados que hemos obtenido en el estudio de cepas aflatoxigénicas no / han encontrado una relación paralela con la presencia de aflatoxinas en las especias estudiadas, creemos que hay que considerarlos significativos ante la circunstancia / comentada en 5.2.2 de que las especias se adicionan, en muchas ocasiones, a diversos productos alimenticios para comunicarles características organolépticas particulares (jamón, embutidos, adobos, quesos, sopas, salsas, etc.). En el caso factible y real de que estos alimentos así "inoculados" con propágulos de cepas fúngicas potencialmente micotoxigénicas, permanezcan en períodos de maduración o almacenaje prolongados y en condiciones apropiadas para la proliferación fúngica, creemos que hay que / considerar la posibilidad de la producción de micotoxinas que podrían ser vehiculizadas en el alimento hasta / el consumidor final. A este respecto, citamos la experiencia de Lancilloti y Lucisano (1.971) al inocular productos cárnicos con cepas aflatoxigénicas, llegándose a producir en estos alimentos hasta 20.000 ppb de aflatoxina B₁.

Por último, queremos referirnos brevemente al hecho de que en general la legislación internacional, y la legislación española vigente en particular (apartado 1.1), no contemplan, en sus especificaciones microbiológicas sobre especias y condimentos, el análisis micológico como una de las especificaciones del control microbiológico rutinario de estos productos. Sin embargo, existen recomendaciones de diversos autores e incluso organismos internacionales (I.C.M.S.F., por ejemplo), a las que nos sumamos a la vista de nuestros resultados, que / indican la conveniencia de ejercer este control.

Hay que hacer mención, por otra parte, de la gran variabilidad que hemos apreciado en los resultados obtenidos al estudiar las diferentes especias (en los recuentos fúngicos, sobre todo), coincidente con la registrada por distintos autores ya citados. Este hecho ha / llevado a Schwab et al. (1.982), entre otros, a considerar la conveniencia de establecer criterios microbiológicos específicos para cada producto o grupo de productos, más que un sólo criterio o grupo de criterios para todas las especias. Aunque, efectivamente, puede ser una posibilidad a considerar, en el estado actual de conocimientos y ante el hecho de que bajo la denominación de ESPECIAS se reúne a un numeroso y heterogéneo grupo de pro--

ductos alimenticios, "con carácter enunciativo y no limi
tativo", según expresa la propia legislación española al
respecto, nuestra opinión es que pueden establecerse criterios
válidos para el conjunto de los productos implicados,
con un fin homogeneizador del control, siempre que
se establezcan sobre unas bases analíticas amplias que /
tomen los resultados obtenidos para las especias más confl
ictivas como guía para el establecimiento de un criteri
o legislador cumplible, sin renunciar por ello al rigor
necesario que conlleva la importancia sanitaria del
criterio y el posible riesgo para la salud del consumido
dor.

En relación con el apartado 2.3, en que hacía mos mención expresa de los objetivos e interés de nues-- tro estudio, podemos establecer brevemente las siguien-- tes conclusiones:

-- En términos generales, la contaminación / fúngica de las especias y condimentos puede considerarse relativamente elevada. Esta contaminación alcanza sus co-- tas máximas en especias concretas: pimienta blanca, pi-- mienta negra, pimentón, tomillo, orégano, menta, albaha-- ca, hierbabuena, apio, laurel, cominos y "curry". (TABLA XX).

-- Para averiguar el grado de contaminación / fúngica en especias consideramos que el método de recuen-- to en placa a partir de una sola dilución es más idóneo que el método de recuento que ajusta la recta de regre-- sión a los recuentos de colonias de todas las diluciones y a los correspondientes valores de éstas.

-- Los hongos aislados en los productos obje-- to de estudio son, en su gran mayoría, especies ubícuas que habitualmente se incluyen en la denominada flora de almacenamiento.

-- La micoflora dominante en los productos es-- tudiados la constituyen, principalmente, especies perte--

necientes a los géneros Aspergillus y Penicillium, seguidos por Mucor, Rhizopus, otros Zygomycetos (Absidia, Circinella), Cladosporium, Alternaria y Trichoderma (TABLA XXI. FIGURA 2).

— La micoflora encontrada en el pimentón / muestra máximas frecuencias de aparición en las especies del género Aspergillus, seguido de Penicillium, Mucor y Rhizopus. A considerable distancia, podemos citar los géneros Cladosporium, Absidia, Alternaria y Circinella (TABLA XXI. FIGURA 3).

— Al estudiar la frecuencia de aparición de las especies incluídas en los géneros dominantes, llegamos a la conclusión de que las especies fúngicas que contaminan habitualmente las especias y condimentos son: A. flavus, A. niger, A. phoenicis, A. ficuum, A. tamaris, / A. versicolor, A. oryzae, A. ochraceus, A. awamori, A. fumigatus y A. nidulans, en cuanto al género Aspergillus, y P. verrucosum var. cyclopium, P. chrysogenum, P. brevicompactum, P. frequentans, P. roqueforti y P. expansum, por lo que se refiere al género Penicillium (FIGURAS 4 y 5).

— En la micoflora del pimentón se observa / una distribución de especies semejante a la anteriormente citada, con predominio de las especies incluídas dentro de los grupos del A. flavus (A. flavus, A. tamaris,

A. oryzae, A. parasiticus) y A. niger (A. niger, A. pnoe
nicis, A. ficuum, A. awamori), seguidas por A. versico--
lor, A. ochraceus y A. fumigatus. En cuanto al género Pe
nicillium, los aislamientos más frecuentes pertenecen a
las especies P. verrucosum var. cyclopium, P. chrysoqe--
num, P. brevi-compactum y P. roqueforti (FIGURAS 6 y 7).

-- Existen diferencias significativas entre /
las micofloras contaminantes de pimentones procedentes, /
respectivamente, de las zonas productoras de Cáceres y /
Murcia. En general, podríamos concluir que la flora fún-
gica aislada en pimentones procedentes de la zona cacere
ña es más variada que la aislada en pimentones proceden-
tes de la zona murciana. Así, se aísla un total de 14 gé-
neros en muestras procedentes de Cáceres por 12 en las /
procedentes de Murcia, aunque el dato es más significati-
vo al considerar los dos géneros dominantes, ya que se /
aislaron un total de 18 especies de Aspergillus en mues-
tras procedentes de la zona de Cáceres por 11 especies /
de dicho género en muestras procedentes de la zona de /
Murcia, y 15 por 7, respectivamente, en el caso del géne-
ro Penicillium. Además, existen notables variaciones en
las frecuencias de aislamiento de géneros y especies con-
cretas entre ambas zonas productoras, como discutimos en
5.2.2 (FIGURAS 8 y 9).

-- La influencia de la contaminación fúngica

procedente de las zonas autóctonas de producción de las especias no guarda relación directa con la micoflora contaminante de estos productos en etapas posteriores, fundamentalmente en la comercialización, al menos en el caso concreto del pimentón.

-- Salvo casos particulares (como puede ser / el clavo de especia), la acción antimicrobiana de las especias en general no tiene demasiada influencia sobre el grado de contaminación fúngica de estos productos, ni / tampoco sobre la selección de las especies contaminantes, como ocurre, como ejemplo definitorio, con los datos registrados sobre las muestras de tomillo estudiadas. (TABLA XX).

-- Es destacable la elevada frecuencia de aislamiento de cepas pertenecientes a especies fúngicas potencialmente productoras de micotoxinas, principalmente de aflatoxinas. Concretándonos al caso más significativo, A. flavus se aísla en el 56.36 % del total de muestras analizadas y en el 75 % de las muestras de pimentón (con un máximo de frecuencia del 88.28 % para las muestras de pimentón dulce procedentes de la zona productora de Murcia). (TABLAS IX y X).

-- Estudiada la distribución de cepas productoras de aflatoxinas en cultivos de laboratorio (punto / discutido en 5.3.2), presenta frecuencias del 33.18 % pa

ra el total de muestras de especias (lo que supone el /
58.87 % de las muestras en que se detecta presencia de /
A. flavus), del 54.17 % para las muestras de pimentón /
(el 72.22 % de las muestras con presencia de A. flavus)
y un máximo del 74.51 % para las muestras de pimentón /
dulce procedentes de la zona productora de Murcia (el /
84.44 % de las muestras en que se había detectado presenci
a de A. flavus) (TABLAS IX y X).

-- Podemos concluir que la contaminación por
aflatoxinas del conjunto de especias analizadas es rela-
tivamente baja (alrededor del 8 % del total de las mues-
tras). En general, la mayoría de las especias estudiadas
no presentan contaminación detectable por estos metaboliti
tos tóxicos; sin embargo, la incidencia de tales toxinas
se incrementa notablemente sobre la media mencionada en
pimienta blanca, pimienta de Cayena y pimienta negra (TA
BLA VII), según discutimos en 5.3.2.

Por otro lado, la cantidad de aflatoxinas de-
tectada en las muestras positivas no es excesivamente e-
levada, con un máximo de 41 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

-- Los datos últimamente comentados no pare--
cen guardar relación directa con las elevadas frecuen---
cias de aparición reseñadas para especies fúngicas potenci
almente micotoxigénicas (principalmente A. flavus), ni
tampoco con el porcentaje de cepas productoras de aflatoxi

xinas en cultivos de laboratorio obtenido en nuestro estudio, que superó el 37.5 % (TABLA VIII).

-- La metodología analítica que juzgamos más idónea para la investigación de aflatoxinas en especias en general, y particularmente en aquellas que presentan numerosas sustancias interferentes de los análisis (incluido el pimentón) es la constituida por una etapa de extracción y limpieza del extracto según el Método CB de la A.O.A.C. (1.980), con resolución final del extracto por cromatografía en capa fina bidimensional, según el Método de Scott y Kennedy (1.973) (FIGURA 1).

-- La metodología que hemos utilizado para la investigación de cepas productoras de aflatoxinas en cultivos de laboratorio sobre Medio A.P.A. modificado, basada en el método rápido de Hara et al. (1.974), se revela como fácilmente reproducible, eficaz y fiable, sobre todo si se utiliza como conclusión del ensayo rutinario la metodología que proponemos en nuestro estudio (apartado 3.5.2) basada en el análisis químico del medio de cultivo y el micelio crecido durante el período de incubación en oscuridad.

-- Nuestros resultados indican que existen deficiencias apreciables en cuanto a las condiciones higiénicas de las especias y condimentos en general, especialmente acusadas en algunos de estos productos, debido a /

que la tasa de contaminación fungica rebasa, en muchos /
casos, los límites admitidos como aceptables por organismos
internacionales (TABLAS XI a XIX).

-----0-----

T A B L A S

Y

F I G U R A S .

TABLA I

Sustancias con acción antimicrobiana contenidas
en las especias.

ESPECIA	COMPONENTES ACTIVOS
Anís	Cresol, aldehído anisínico, ác. benzoico.
Clavo	Aceite de clavo, eugenol, ác. benzoico.
Pimentón	Capsaicina.
Ajo	Alicina, alistatina, acroleína.
Alcaravea (comino)	α y γ -terpineno, carvona.
Nuez moscada	Geraniol, eugenol.
Pimienta	Aceite de pimienta, piperina, piperidina, citrál.
Pimienta de Jamaica	Eugenol, citral.
Tomillo	Timol, γ -terpineno, carvacrol.
Canela	Aceite de canela, aldehído cinámico, ác. benzoico, eugenol, citral.
Cebolla	Esencias alílicas, de butilo, de croton, feniletilmostaza.

condimentos, según Müller (1.981).

CONDIMENTO	CARGA MICROBIANA/GR. ALIMENTO	
	BACTERIAS	DEUTEROMICETOS
Ajedrea	4000-1480000	0-450
"Curry"	23000-17000000	0
Clavo	200-33000	10-100
Jengibre	2500-60000	200-2000
Cardamomo	6000-700000	100-230
Ajo fresco	4500-35000	0
Comino	2000-9000000	300-40000
Hoja de laurel	10000-100000	350-150000
Mejorana	11000-7600000	300-2500
Nuez moscada	1000-152000	700-46000
Pimentón picante	412000-11600000	0-1200000
Pimentón dulce	8000-2700000	10-5000
Pimienta negra	100000-704000000	10-1300000
Pimienta blanca	1000-2900000	300-9000
Pimienta Jamaica	10000-6000000	2000-100000
Salvia	11000-270000	260-20000
Granos de mostaza	500-6000	10-700
Tomillo	35000-2700000	12000-30000
Canela	8000-28000000	100-60000
Cebolla fresca	2000-38000	0-30
Mezcla de especias para embutidos	61000-5000000	750-1300

TABLA III

Contaminación fúngica de especias y condimentos, según Jay (1.978).

CONDIMENTOS	Nº microorganismos/Gr. muestra seca
	MOHOS Y LEVADURAS
Hojas laurel	3312
Clavo	5
Salsa "curry"	71-76
Mejorana	4899-18197
Pimentón	2291-30200
Pimienta	15-251
Salvia	10
Tomillo	8318-10965
Cúrcuma	1-71
Hojas apio	80-200
Hojas cebolla	1
Cebolla picada	15
Ajo picado	80
Polvo de ajo	76

Nº DE MUESTRA	RECUENTO (Col./gr.)	Nº DE MUESTRA	RECUENTO (Col./gr.)	Nº DE MUESTRA	RECUENTO (Col./gr.)	Nº DE MUESTRA	RECUENTO (Col./gr.)
1-A	870	26-CL	0	51-NM	0	76-PN	900
2-A	70	27-CL	0	52-NM	40	77-PN	5.000
3-A	0	28-CO	590	53-NM	0	78-PN	6.300
4-A	0	29-CO	50.000	54-0	42.000	79-PN	180.000
5-A	0	30-CO	2.420	55-0	40.000	80-PN	90.000
6-AL	1.860	31-CO	12.000	56-0	80	81-PN	2.700
7-AL	82.000	32-CO	300	57-0	1.600	82-PN	3.200
8-AN	5.800	33-CO	31.000	58-0	35.000	83-PN	17.000
9-AN	680	34-CU	0	59-0	76.000	84-PN	84.000
10-AP	21.000	35-CY	6.000	60-PE	0	85-PN	130.000
11-AP	120	36-CY	80.000	61-PE	80	86-R	60.000
12-AP	1.700	37-CY	0	62-PE	60	87-R	73.000
13-AP	1.800	38-CH	0	63-PB	520.000	88-T	107.000
14-C	1.100	39-CH	80	64-PB	9.000	89-T	170.000
15-C	0	40-CH	60	65-PB	0	90-T	170.000
16-C	2.600	41-E	140	66-PB	110.000	91-T	57.000
17-C	0	42-ES	120	67-PB	58.000	92-V	0
18-C	30	43-ES	1.800	68-PB	56.000	93-V	0
19-C	5.200	44-ES	600	69-PC	80	94-V	0
20-CE	10	45-H	39.000	70-PC	800	95-S	20
21-CE	0	46-L	68.000	71-PC	1.200	96-S	82.000
22-CE	60	47-M	2.200	72-PC	200	97-S	310
23-CE	100	48-ME	300.000	73-PC	400	98-S	0
24-CL	0	49-NM	0	74-PN	40.000	99-S	0
25-CL	0	50-NM	0	75-PN	140.000	100-S	20

Nº DE MUESTRA	RECUENTO (Col./gr.)	Nº DE MUESTRA	RECUENTO (Col./gr.)	Nº DE MUESTRA	RECUENTO (Col./gr.)	Nº DE MUESTRA	RECUENTO (Col./gr.)	Nº DE MUESTRA	RECUENTO (Col./gr.)
101-PD	3.230	131-PD	70	161-PD	21.000	191-PP	200		
102-PD	3.730	132-PD	900	162-PD	14.000	192-PP	270		
103-PD	260	133-PD	0	163-PD	9.000	193-PP	520		
104-PD	280	134-PD	1.900	164-PD	3.500	194-PP	0		
105-PD	23.300	135-PD	1.750	165-PD	4.000	195-PP	25		
106-PD	12.300	136-PD	1.950	166-PD	600	196-PP	50		
107-PD	3.000	137-PD	4.500	167-PD	3.000	197-PP	4.100		
108-PD	1.930	138-PD	9.800	168-PD	3.400	198-PP	135.000		
109-PD	1.900	139-PD	230	169-PD	2.210	199-PP	200		
110-PD	680	140-PD	190	170-PD	390	200-PP	4.000		
111-PD	1.900	141-PD	70	171-PD	13.400	201-PP	1.600		
112-PD	70	142-PD	28.000	172-PD	1.300	202-PP	7.000		
113-PD	10.700	143-PD	1.350	173-PD	12.000	203-PP	62.000		
114-PD	1.600	144-PD	225.000	174-PD	10.000.000	204-PP	3.800		
115-PD	1.300	145-PD	7.150	175-PD	30.000.000	205-PP	1.500		
116-PD	3.850	146-PD	1.300	176-PD	1.000.000	206-PA	6.420		
117-PD	1.450	147-PD	85	177-PP	19.000	207-PA	2.300		
118-PD	1.500	148-PD	36.000	178-PP	600	208-PA	15.000		
119-PD	19.000	149-PD	3.800	179-PP	7.000	209-PA	3.700		
120-PD	26.500	150-PD	1.210	180-PP	1.500	210-PA	2.700		
121-PD	4.500	151-PD	1.100	181-PP	1.700	211-PA	13.000		
122-PD	5.000	152-PD	480	182-PP	3.400	212-PA	21.000		
123-PD	2.100	153-PD	1.800	183-PP	2.200	213-PA	31.000		
124-PD	1.150	154-PD	75.000	184-PP	34.000	214-PA	1.700		
125-PD	2.850	155-PD	4.900	185-PP	38.000	215-PA	24.000		
126-PD	2.400	156-PD	150	186-PP	14.200	216-PA	17.000		
127-PD	1.000	157-PD	6.200	187-PP	700	217-PA	17.000		
128-PD	1.100	158-PD	6.200	188-PP	2.700	218-PA	1.400		
129-PD	700	159-PD	48.000	189-PP	3.800	219-PA	26.400		
130-PD	600	160-PD	600	190-PP	1.100	220-PA	6.000		

Nº de muestra	Una sola dilución	Recta de regresión
101	3.230	14.894
102	3.730	48.183
103	260	11.927
104	280	36.960
105	23.300	387.450
106	12.300	1.508.000
107	3.000	9.752.000
108	1.930	26.166
192	270	18
193	520	405
109	1.900	221
110	680	3.175
111	1.900	222
112	70	71.428
113	10.700	166.667
114	1.600	855
115	1.300	481
116	3.850	2.268
117	1.450	26.316
118	1.500	994
119	19.000	1.250.000
120	26.500	1.000.000
121	4.500	90.909
122	5.000	263.158
123	2.100	385
124	1.150	1.897
125	2.850	2.150
126	2.400	2.174
127	1.000	937
128	1.100	2.203
129	700	
130	600	949
131	70	334
132	900	227.778
133	0	
134	1.900	216
135	1.750	2.932
136	1.950	4.739
137	4.500	41.667
138	9.800	50.000
139	230	31
140	190	22
141	70	104
142	28.000	90.909
143	1.350	435
144	225.000	232.558
145	7.150	11.494
146	1.300	1.034
194	0	
195	25	
196	50	
197	4.100	10.417
198	135.000	666.667
199	200	683
147	85	116
148	36.000	58.823

TABLA VII

Análisis de aflatoxinas en especias. Resultados.

ESPECIA	Nº MUESTRAS ANALIZADAS	Nº MUESTRAS POSITIVAS	AFLATOXINAS DETECTADAS
Pimienta blanca	6	1 (16,66%)	B ₁ . (7 µg./Kg.)
Pimienta de Cayena	5	2 (40,00%)	B ₁ . (9 a 17 µg./Kg.)
Pimienta negra	12	5 (41,66%)	B ₁ , B ₂ y G ₁ . (5 a 27 µg./Kg.)
Pimentón	120	10 (8,33%)	B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂ . (6 a 41 µg./Kg.)

TABLA VIII

Distribución de cepas productoras de aflatoxinas.

	A. flavus		A. flavus var. columnaris		A. parasiticus	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
CEPAS INVESTIGADAS	285	96,29	3	1,01	8	2,70
CEPAS PRODUCTORAS DE AFLATOXINAS	107	37,54	1	33,33	2	25,00
DISTRIBUCION DE CEPAS PRODUCTORAS	B ₁	Nº 29	---	---	1	12,50
		% 27,10	---	---	50,00	---
SEGUN LAS AFLATOXINAS PRODUCIDAS	B ₂	Nº 1	---	---	---	---
		% 0,93	---	---	---	---
B ₁ , B ₂	Nº	75	1	33,33	---	---
	%	70,09	100,00	---	---	---
B ₁ , B ₂ G ₁ , G ₂	Nº	2	---	---	1	12,50
	%	1,87	---	---	50,00	---

Distribución de A. flavus y A. parasiticus. Cepas toxigénicas.

	Muestras totales (220) ESPECIAS.		MUESTRAS (120) PIMENTON.		MUESTRAS (100) RESTO ESPECIAS.	
	Nº muestras	% muestras	Nº muestras	% muestras	Nº muestras	% muestras
Muestras con presencia de <u>A. flavus</u> .	124	56,36	90	75,00	34	34,00
Muestras con cepas productoras de AFLATOXINAS.	Nº	33,18	65	54,17	8	8,00
	%		72,22		23,53	
Muestras con presencia de <u>A. parasiticus</u> .	8	3,64	5	4,17	3	3,00
Muestras con cepas productoras de AFLATOXINAS.	Nº	1,36	2	1,67	1	1,00
	%		40,00		33,33	

flavus y A. parasiticus en pimentón.
Cepas productoras de aflatoxinas.

	PIMENTON ZONA MURCIA (Molina, Espinardo,...)		PIMENTON ZONA CACERES (La Vera,...)					
	PIMENTON DULCE (51 muestr.)		PIMENTON DULCE (29 muestr.)		PIMENTON OCAL (15 muestr.)			
	Nº muestr.	% muestr.	Nº muestr.	% muestr.	Nº muestr.	% muestr.		
Muestras con presencia de <i>A. flavus</i>	45	88,23	18	72,00	18	62,07	9	60,00
Muestras con cepas productoras de AFLATOXINAS	38	74,51	11	44,00	10	34,48	6	40,00
	84,44		61,11		55,56		66,67	
Muestras con presencia de <i>A. parasiticus</i>	---	---	5	20,00	---	---	---	---
Muestras con cepas productoras de AFLATOXINAS	---	---	2	8,00	---	---	---	---
	---		40,00		---		---	
	45	65,22	45	65,22	45	65,22	45	65,22
	27	39,13	27	39,13	27	39,13	27	39,13
	60,00		60,00		60,00		60,00	
	5	7,25	5	7,25	5	7,25	5	7,25
	2	2,90	2	2,90	2	2,90	2	2,90
	40,00		40,00		40,00		40,00	

	N° MUESTRAS	% MUESTRAS
0-10 ² col./gr.	8	6.67
10 ² -10 ⁴ col./gr.	81	67.50
> 10 ⁴ col./gr.	31	25.83

PIMENTON (120 muestras).

	N° MUESTRAS	% MUESTRAS
0-10 ² col./gr.	5	9.80
10 ² -10 ⁴ col./gr.	38	74.51
> 10 ⁴ col./gr.	8	15.69

PIMENTON MURCIA (51 muestras).

	N° MUESTRAS	% MUESTRAS
0-10 ² col./gr.	3	4.35
10 ² -10 ⁴ col./gr.	43	62.32
> 10 ⁴ col./gr.	23	33.33

PIMENTON CACERES (69 muestras).

	N° MUESTRAS	% MUESTRAS
$0 - 10^2$ col./gr.	5	6.58
$10^2 - 10^4$ col./gr.	54	71.05
$> 10^4$ col./gr.	17	22.37

PIMENTON DULCE (76 muestras).

	N° MUESTRAS	% MUESTRAS
$0 - 10^2$ col./gr.	3	10.34
$10^2 - 10^4$ col./gr.	20	68.97
$> 10^4$ col./gr.	6	20.69

PIMENTON PICANTE (29 muestras).

	N° MUESTRAS	% MUESTRAS
$0 - 10^2$ col./gr.	0	0.0
$10^2 - 10^4$ col./gr.	7	46.67
$> 10^4$ col./gr.	8	53.33

PIMENTON OCAL (15 muestras).

investigadas de pimentón dulce según los criterios microbiológicos de la I.C.M.S.F. Comparación entre zonas productoras.

	N° MUESTRAS	% MUESTRAS
$0 - 10^2$ col./gr.	5	9.80
$10^2 - 10^4$ col./gr.	38	74.51
$> 10^4$ col./gr.	8	15.69

PIMENTON DULCE MURCIA(51muestras).

	N° MUESTRAS	% MUESTRAS
$0 - 10^2$ col./gr.	0	0.0
$10^2 - 10^4$ col./gr.	16	64.0
$> 10^4$ col./gr.	9	36.0

PIMENTON DULCE CACERES(25muestras).

TABLA XIX. Distribución de las muestras investigadas de especias, excepto el pimentón, según los criterios microbiológicos de la I.C.M.S.F.

	N° MUESTRAS	% MUESTRAS
$0 - 10^2$ col./gr.	38	38.0
$10^2 - 10^4$ col./gr.	31	31.0
$> 10^4$ col./gr.	31	31.0

ESPECIAS (excepto pimentón).
(100 muestras).

TABLA XX

	Nº organismos /gr. muestra seca.	Nº organis- mos/gr. de muestra.	Nº organis- mos/gr. de muestra.
Ajedrea		0-450	
Ajo	76-80	0	0-800
Albahaca			1.800-72.000
Anís			600-3.200
Apio	80-200		120-21.000
Canela		100-60.000	0-5.200
Cardamomo		100-230	
Cebolla	1-15	0-30	0-90
Clavo	5	10-100	0
Comino		300-40.000	300-38.000
Cúrcuma	1-71		0
"Curry"	71-76	0	0-80.000
Chile			0-80
Eneldo			140
Estragón			120-1.800
Hierbabuena			33.000
Jengibre		200-2.000	
Laurel	3.312	350-150.000	68.000
Mejorana	4.899-18.197	300-2.500	2.200
Menta			300.000
Mostaza		10-700	
Nuez moscada		700-46.000	0-40
Orégano			80-76.000
Perejil			0-80
Pimentón	2.291-30.200	0-1.200.000	0-30.000.000
Pimienta blanca		300-9.000	0-520.000
Pimienta de Cayena	15-251		80-1.200
Pimienta de Jamaica		2.000-100.000	
Pimienta negra		10-1.300.000	900-180.000
Romero			42.000-73.000
Salvia	10	260-20.000	
Tomillo	8.318-10.965	12.000-30.000	56.000-170.000
Vainilla			0
Sazonadores			0-82.000
Mezclas para embutidos		750-1.300	
	JAY. (1.978)	MULLER. (1.981)	RESULTADOS DE NUESTRO ESTU- DIO.

Frecuencias de aparición de los géneros aislados:
 Resultados comparativos entre especias totales muestreadas, pimentón y resto de especias muestreadas.

GENEROS AISLADOS	FRECUENCIAS DE APARICION		
	TOTAL DE ESPECIAS	PIMENTON	RESTO DE ESPECIAS
Absidia	5,45 %	8,33 %	2,00 %
Acremonium	3,64 %	1,67 %	6,00 %
Actinomucor	0,45 %	0,83 %	0,00 %
Alternaria	5,91 %	6,67 %	5,00 %
Aspergillus	80,45 %	92,50 %	66,00 %
Aureobasidium	1,36 %	1,67 %	1,00 %
Cephalophora	0,45 %	0,83 %	0,00 %
Circinella	2,73 %	4,17 %	1,00 %
Cladosporium	9,54 %	10,00 %	9,00 %
Epicoccum	0,45 %	0,00 %	1,00 %
Fusarium	2,73 %	0,00 %	6,00 %
Múcor	41,82 %	58,33 %	22,00 %
Paecilomyces	1,82 %	0,00 %	4,00 %
Penicillium	57,27 %	61,66 %	52,00 %
Phoma	1,82 %	1,67 %	2,00 %
Rhizopus	31,82 %	55,83 %	3,00 %
Scopulariopsis	0,45 %	0,83 %	0,00 %
Stemphylium	2,27 %	0,83 %	4,00 %
Syncephalastrum	1,36 %	1,67 %	1,00 %
Trichoderma	4,09 %	0,00 %	9,00 %
Trichotecium	0,91 %	1,67 %	0,00 %

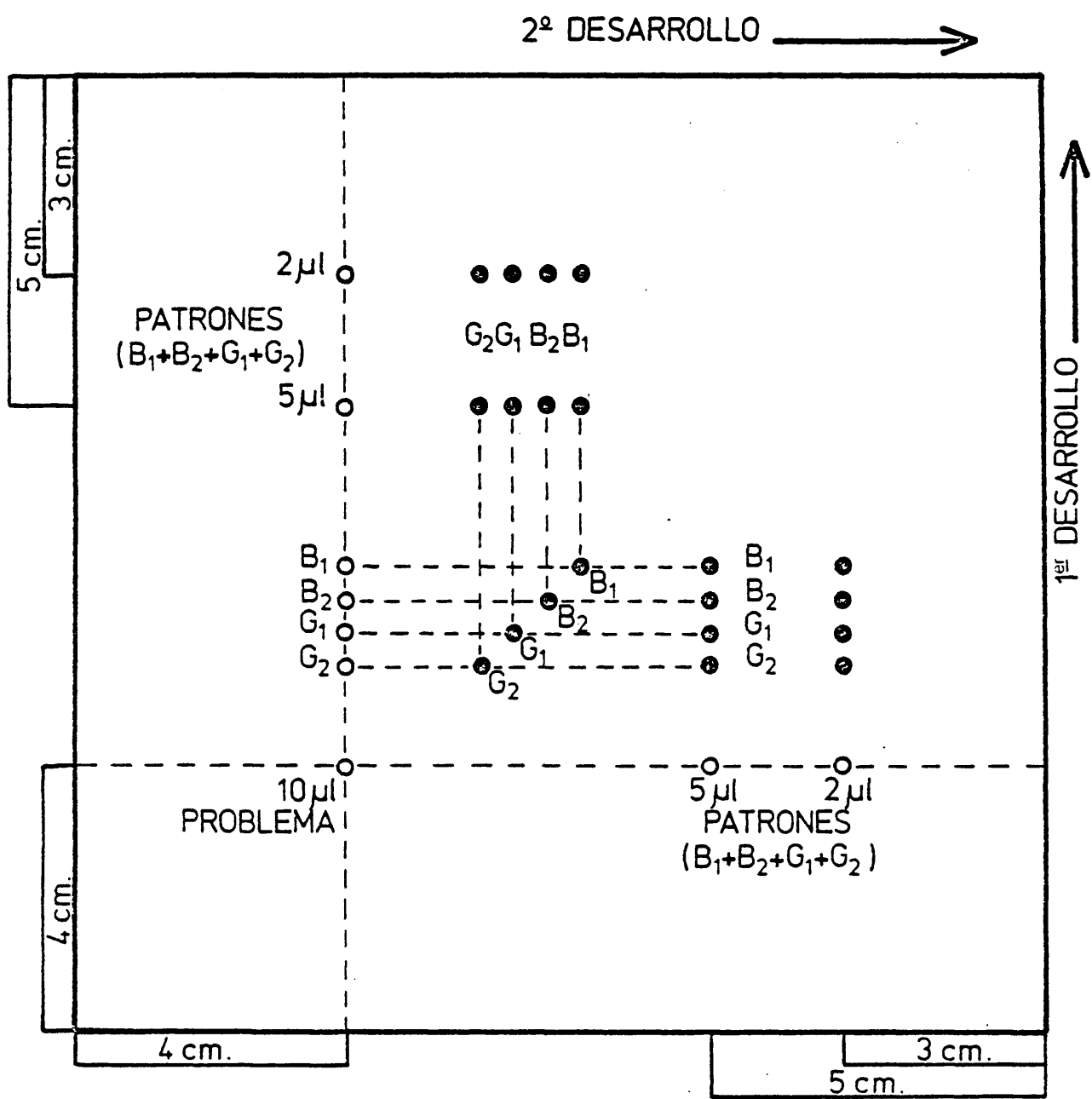
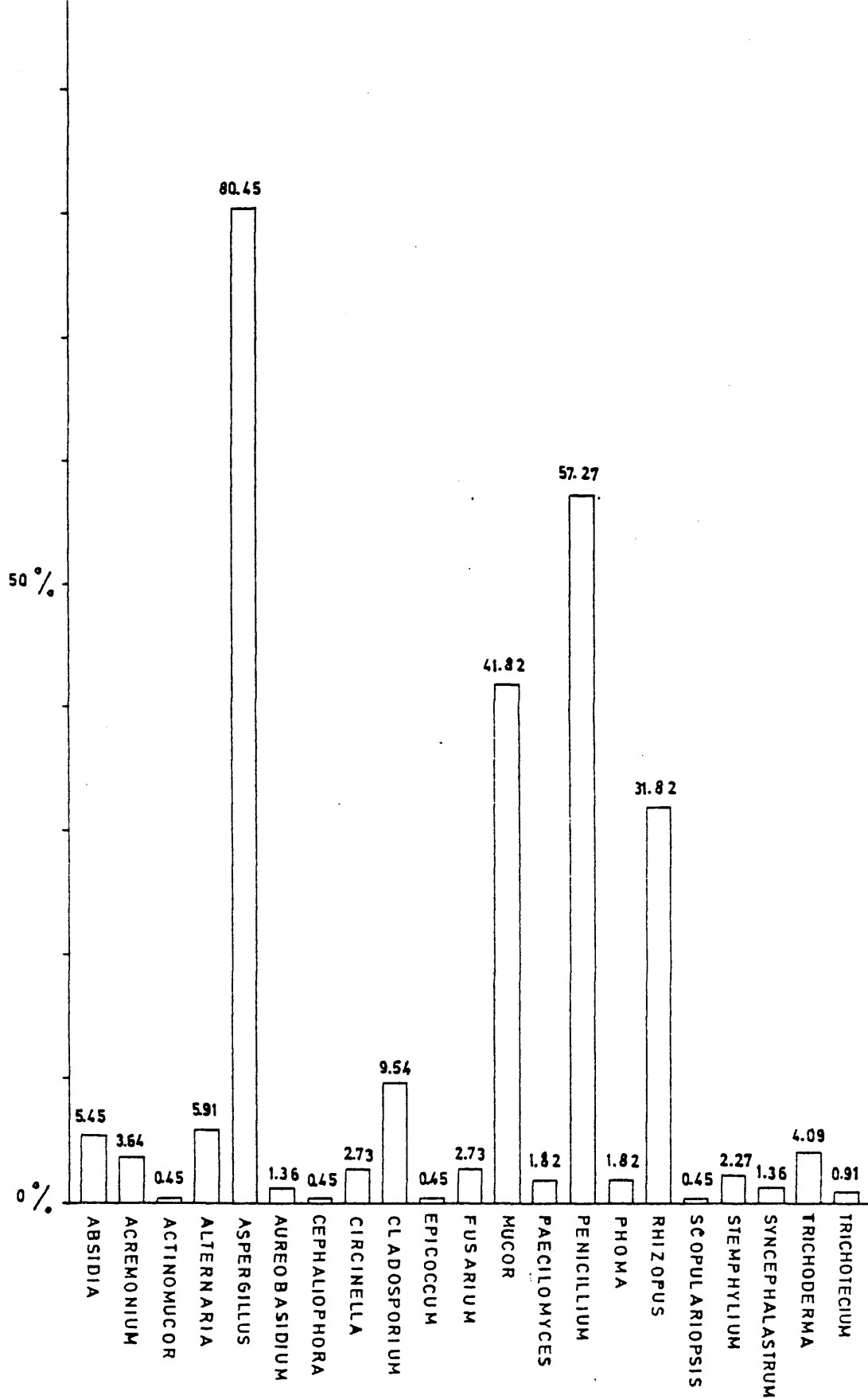


FIGURA 1

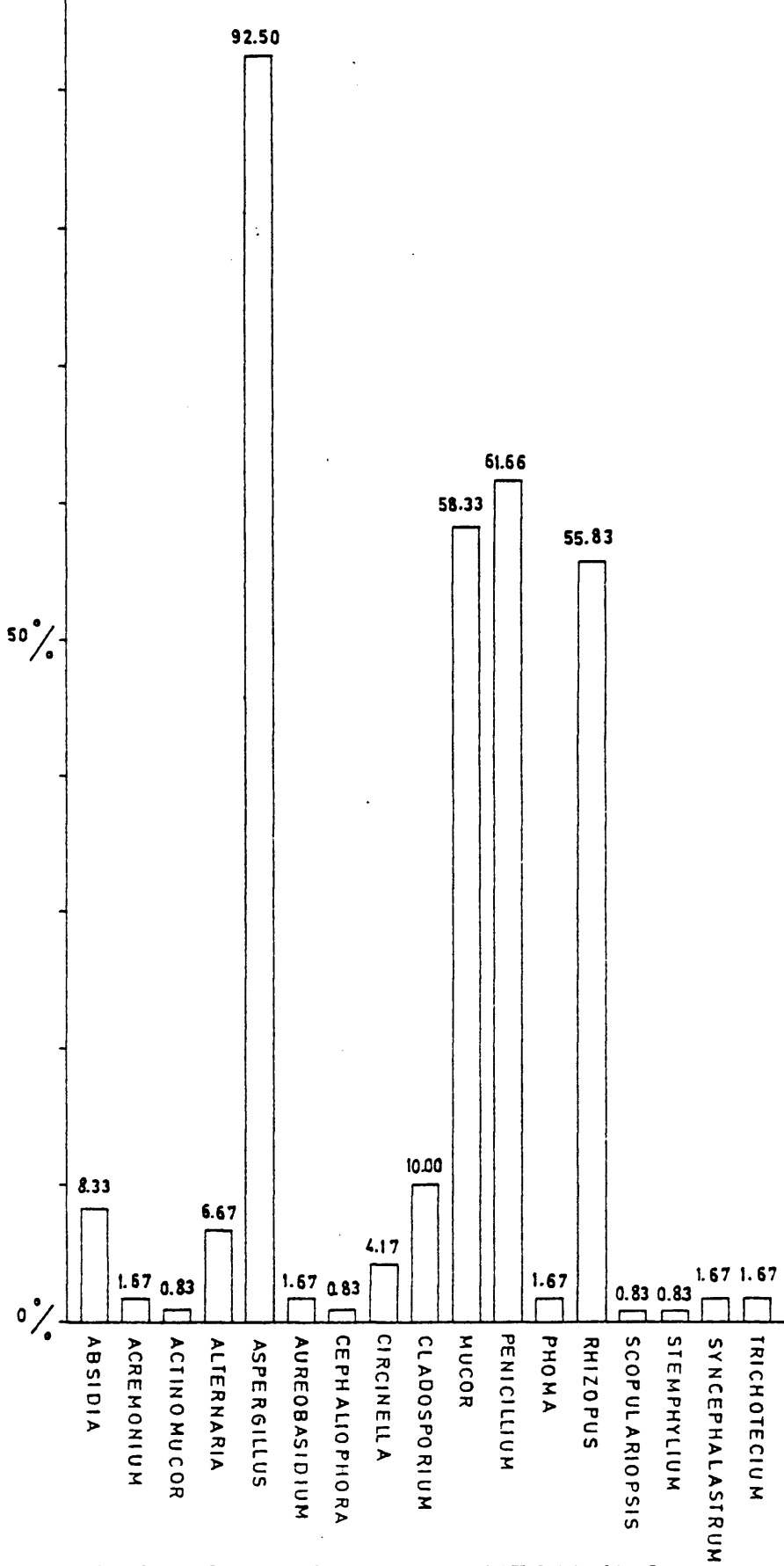
Cromatografía en capa fina bidimensional (ESQUEMA).



MICOFLORA DE ESPECIAS. (220 muestras).

Géneros identificados. Frecuencias de aparición.

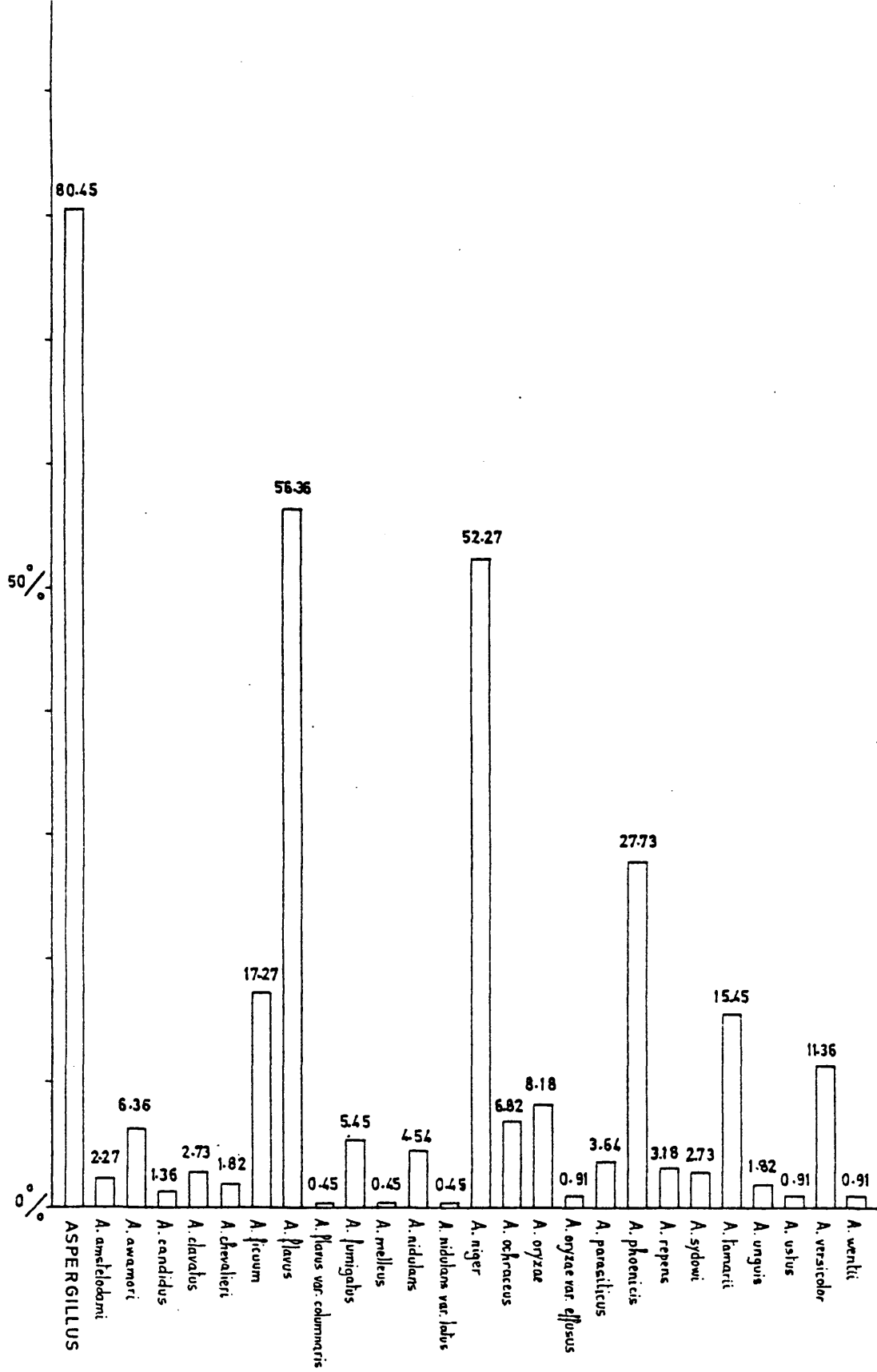
FIGURA 2



MICOFLORA DE PIMENTON.(120 muestras).

Géneros identificados.Frecuencias de aparición).

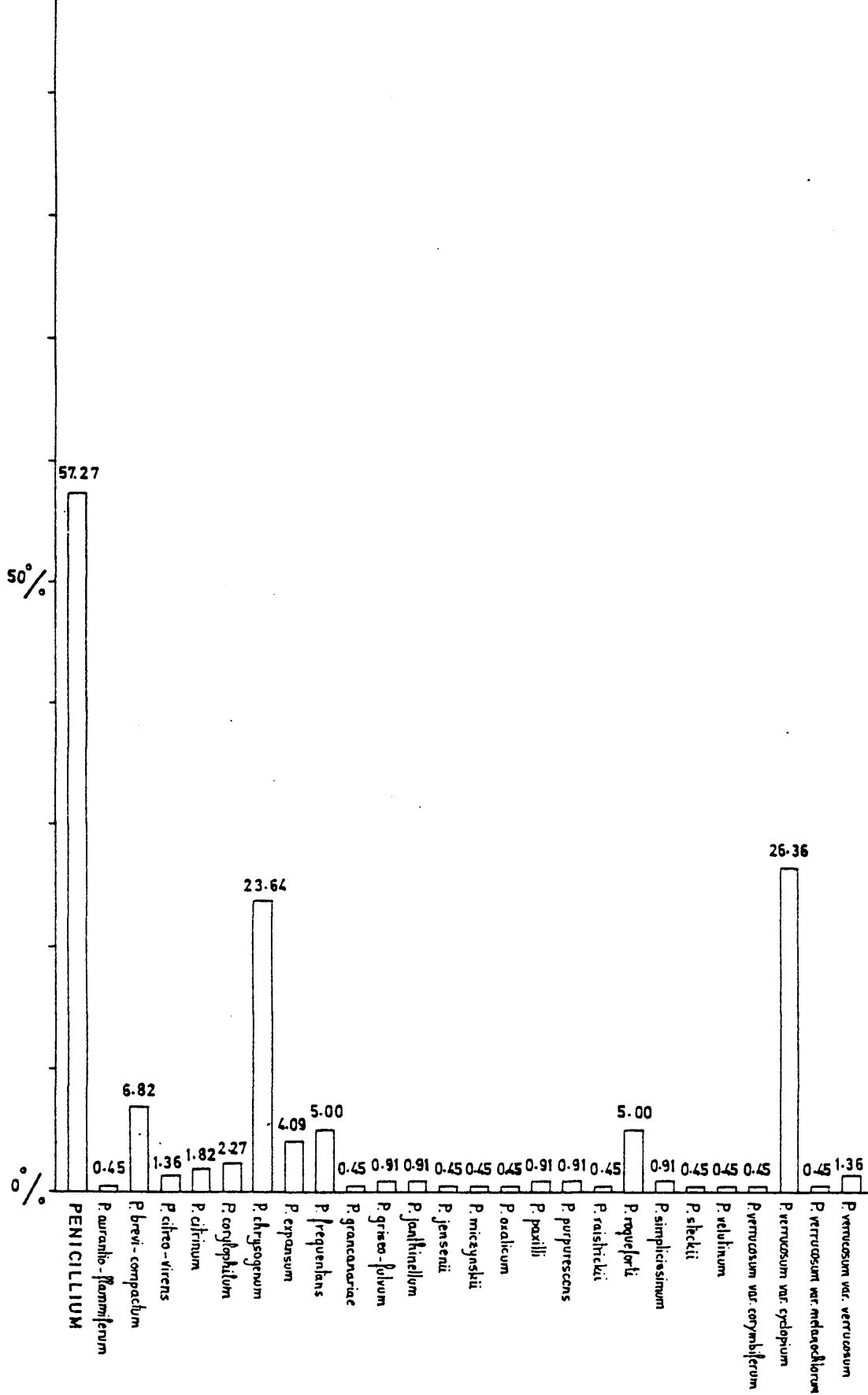
FIGURA 3



MICROFLORA DE ESPECIAS: Aspergillus.

Frecuencias de aparición.

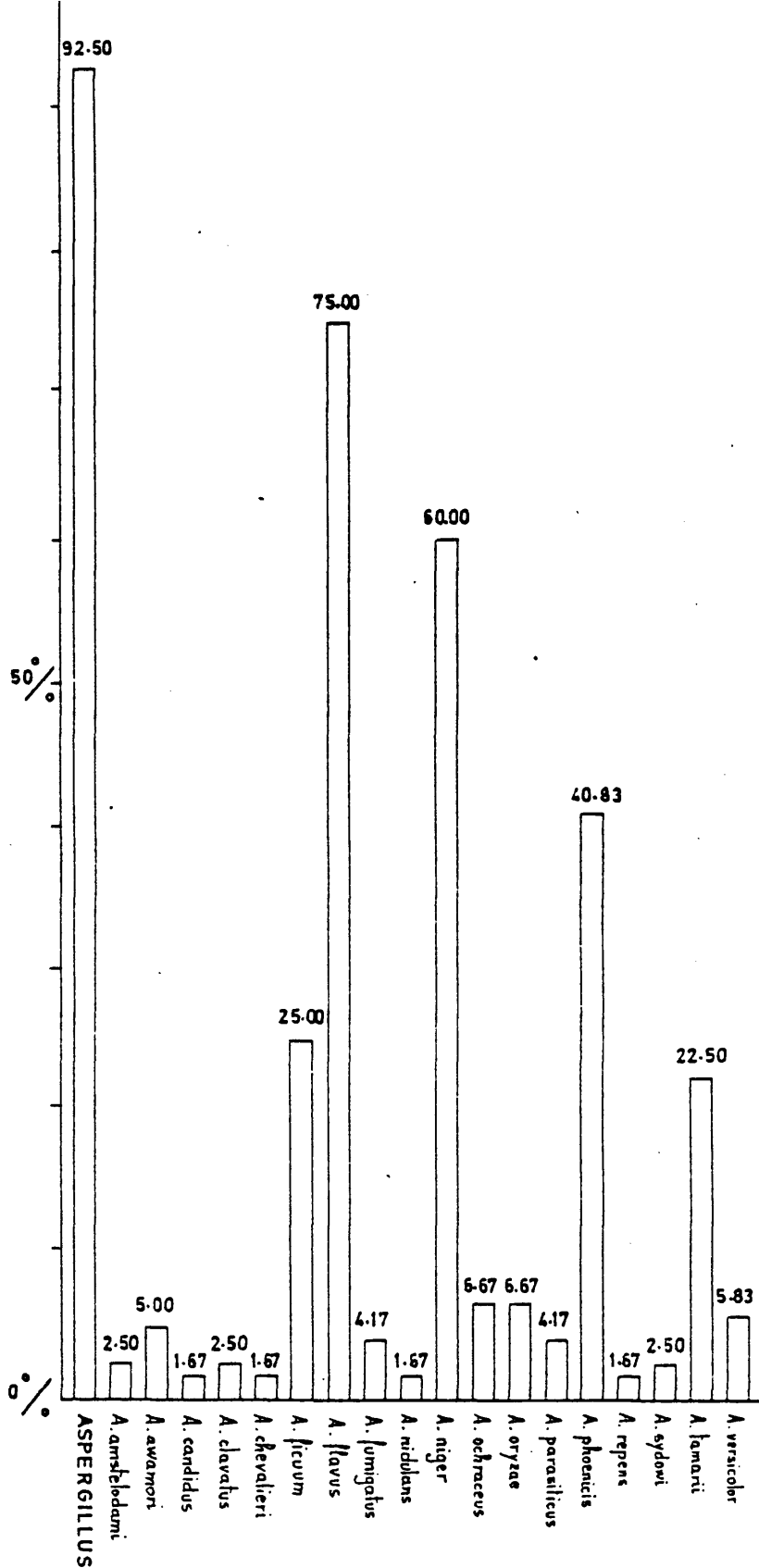
FIGURA 4



MICROFLORA DE ESPECIES: Penicillium.

Frecuencias de aparición.

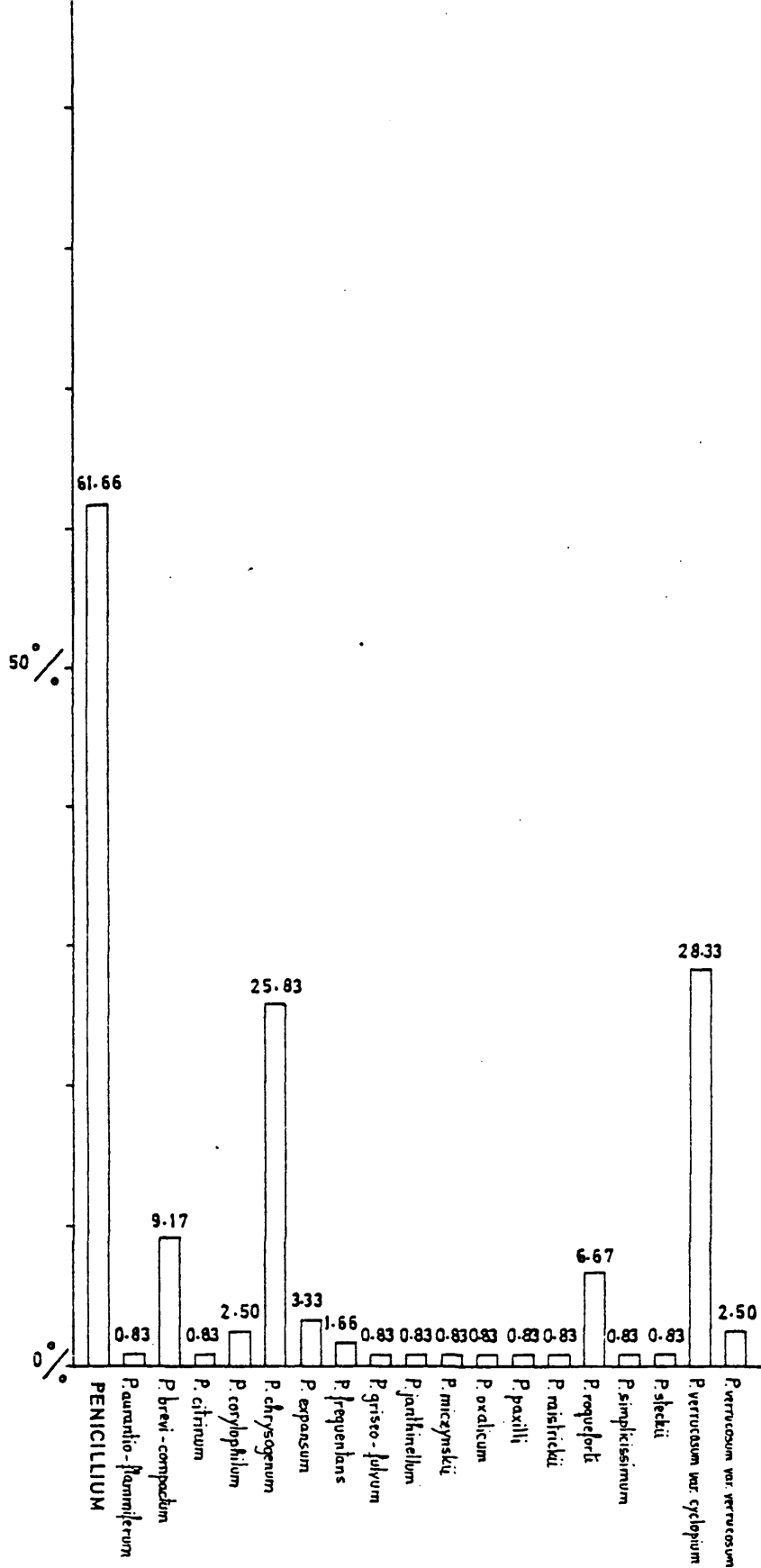
FIGURA 5



MICROFLORA DE PIMENTON: Aspergillus.

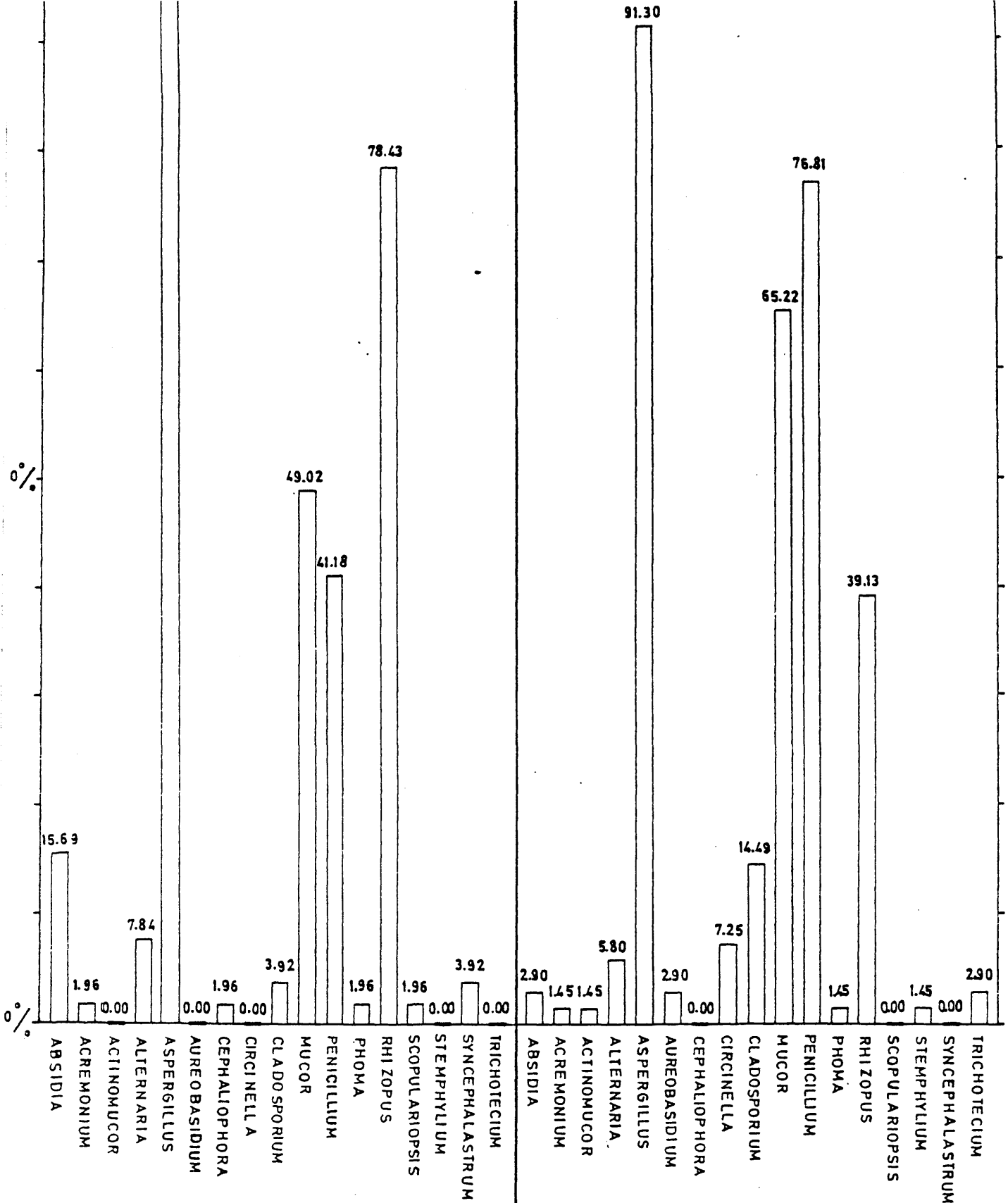
Frecuencias de aparición.

FIGURA 6



MICOFLORA DE PIMENTON: Penicillium.
Frecuencias de aparición.

FIGURA 7

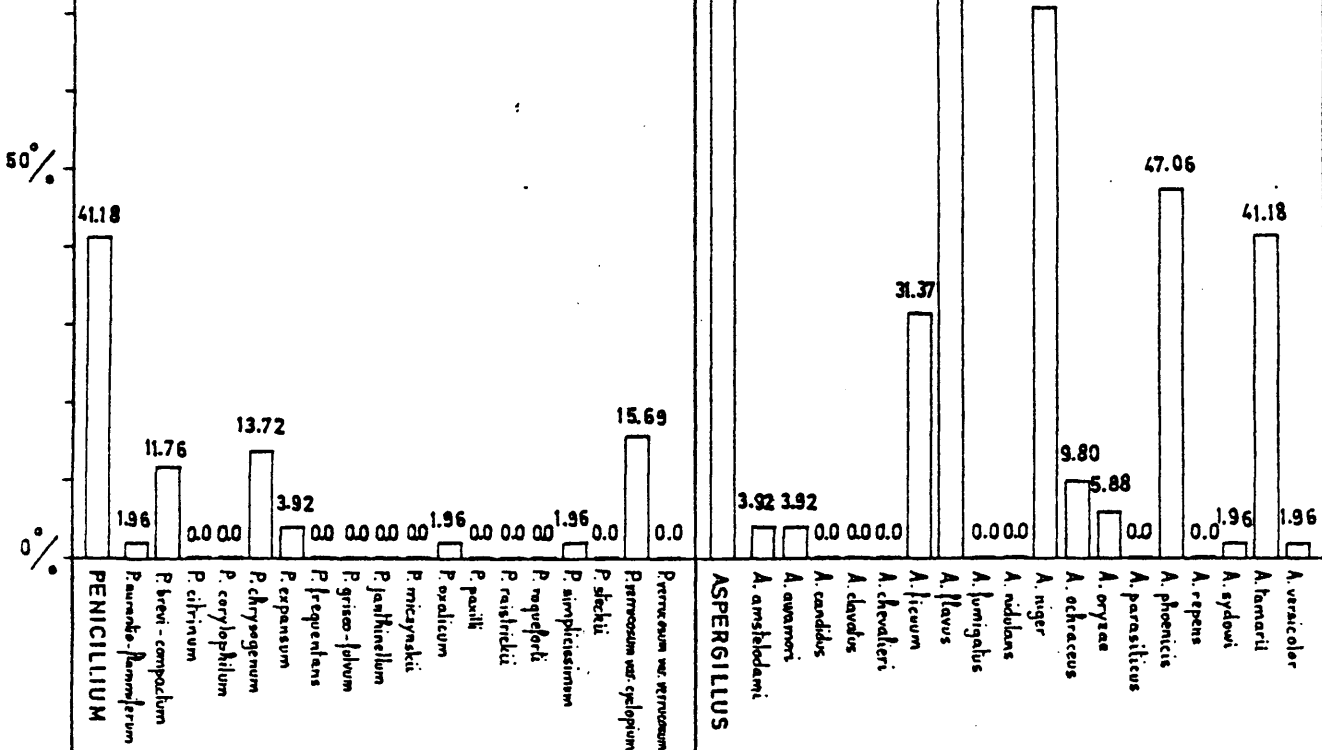


MICOFLORA DE PIMENTON. ZONA DE MURCIA.
 Géneros identificados. Frecuencias de aparición.
 (51 muestras).

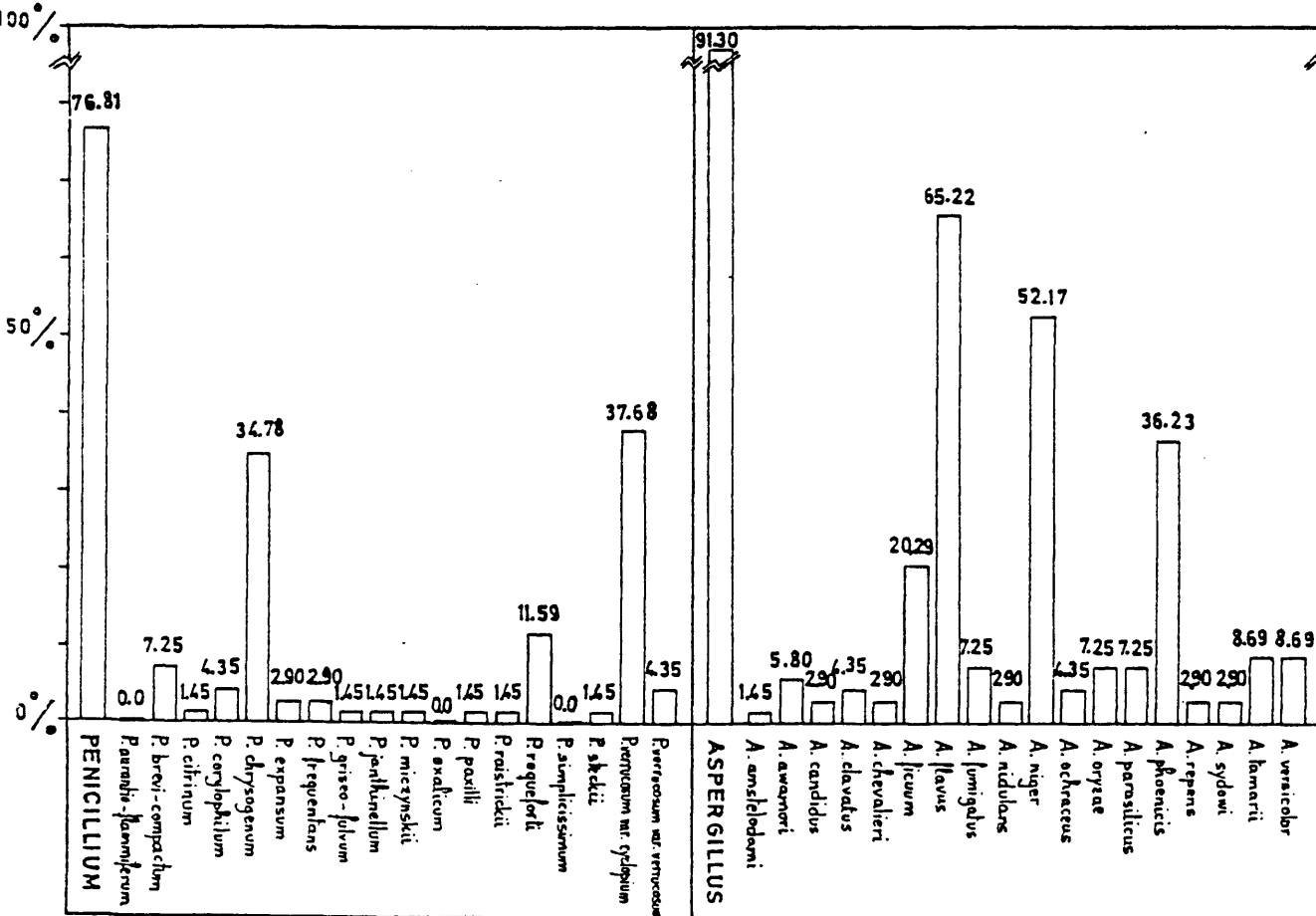
MICOFLORA DE PIMENTON. ZONA DE CACERES.
 Géneros identificados. Frecuencias de aparición.
 (69 muestras).

FIGURA 8

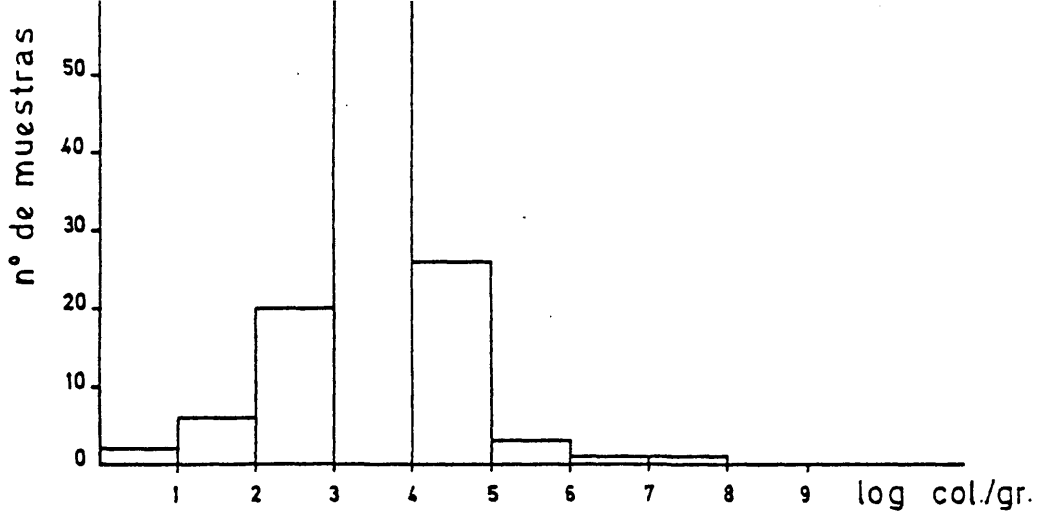
ZONA DE MURCIA



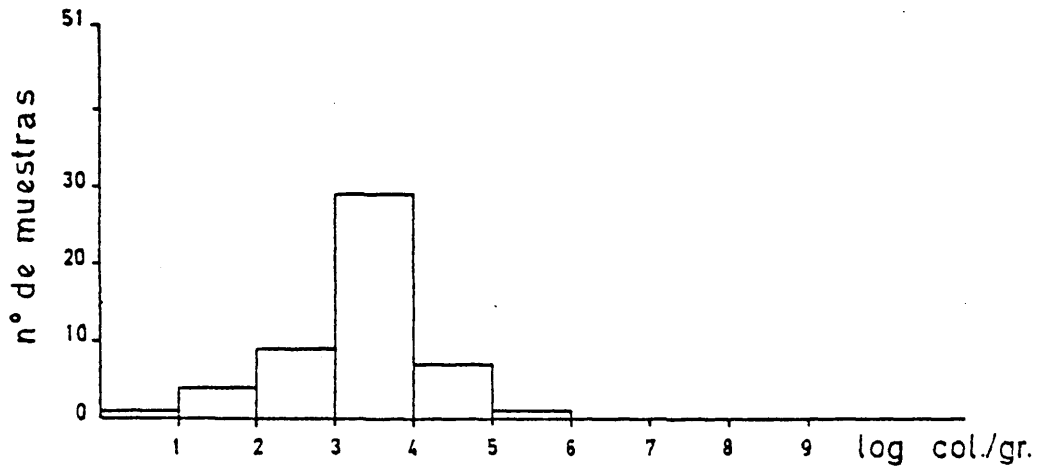
ZONA DE CACERES



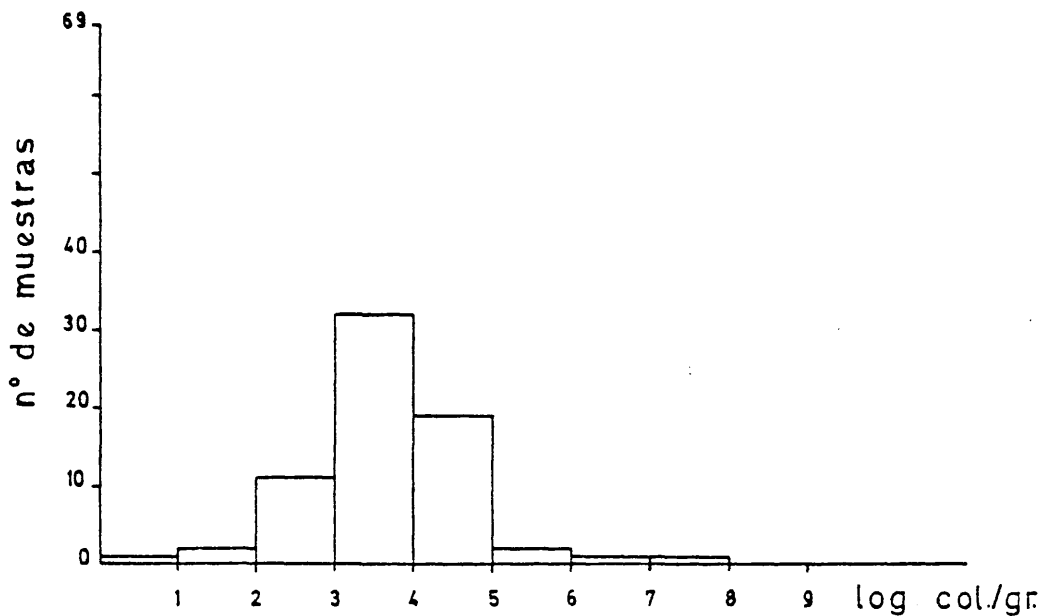
MICROFLORA DE PIMENTON: Penicillium. Aspergillus.
 Frecuencias de aparición.
 Comparación entre zonas productoras.



PIMENTON
(Murcia + Cáceres. 120 muestras).

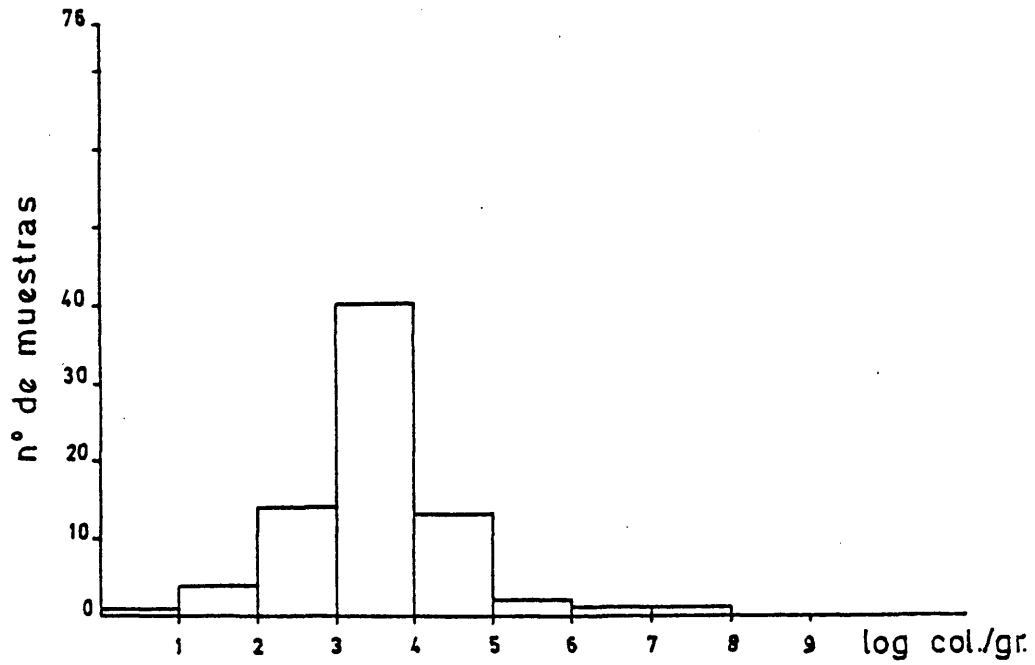


PIMENTON MURCIA
(dulce. 51 muestras).

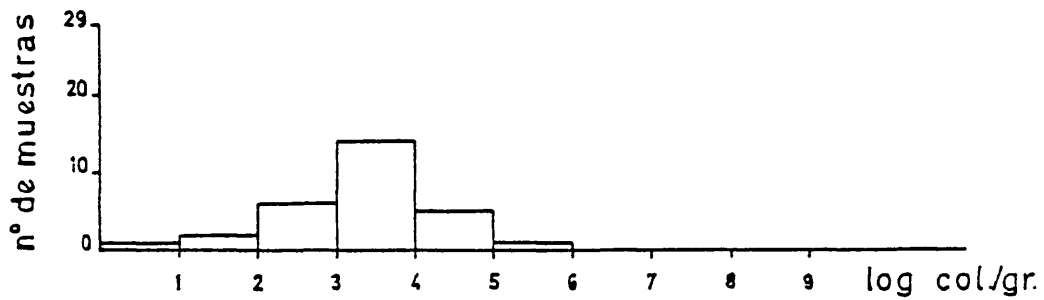


PIMENTON CACERES
(dulce + picante + ocal. 69 muestras).

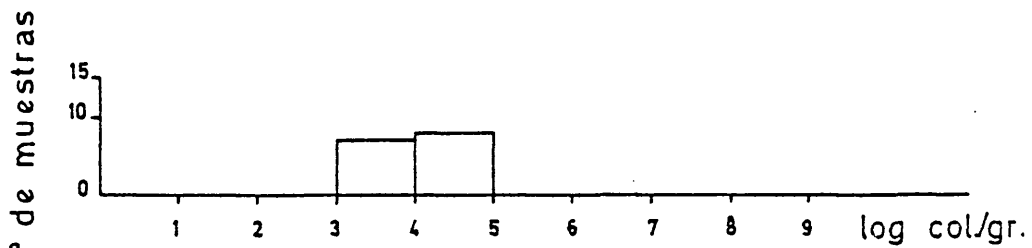
FIGURAS X, XI y XII. Recuentos obtenidos en pimentón:
Comparación entre zonas productoras.



PIMENTON DULCE
(Murcia + Cáceres. 76 muestras).

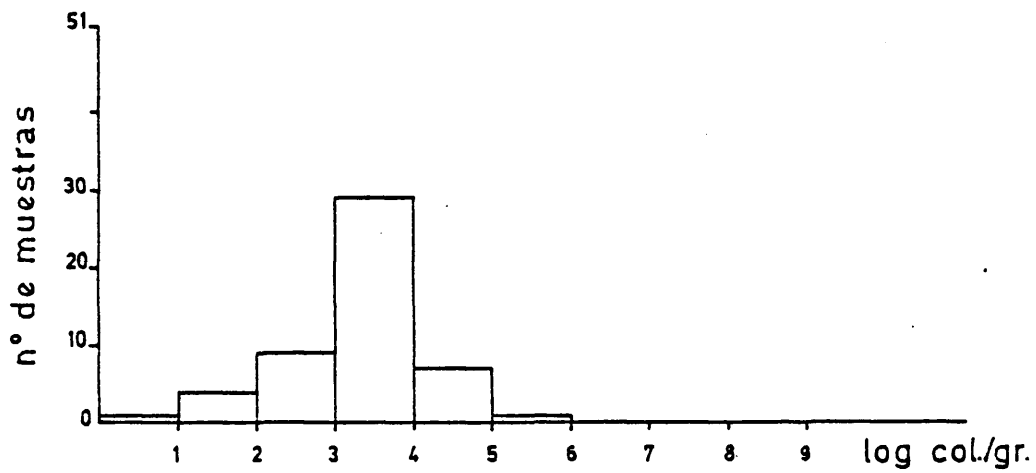


PIMENTON PICANTE
(Cáceres. 29 muestras).

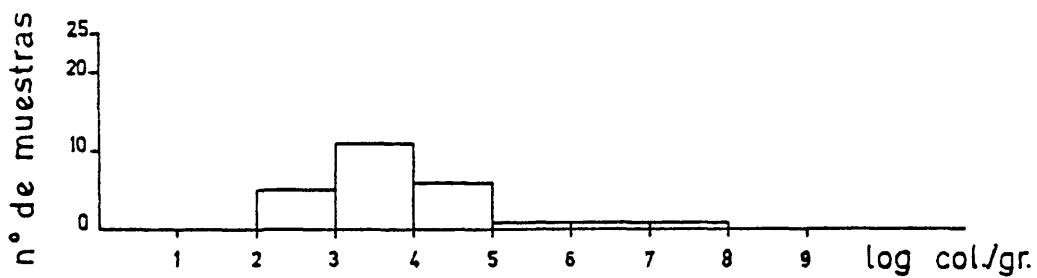


PIMENTON OCAL
(Cáceres. 15 muestras).

FIGURAS XIII, XIV y XV. Recuentos obtenidos en pimentón: Comparación entre los tipos dulce, picante y ocal.

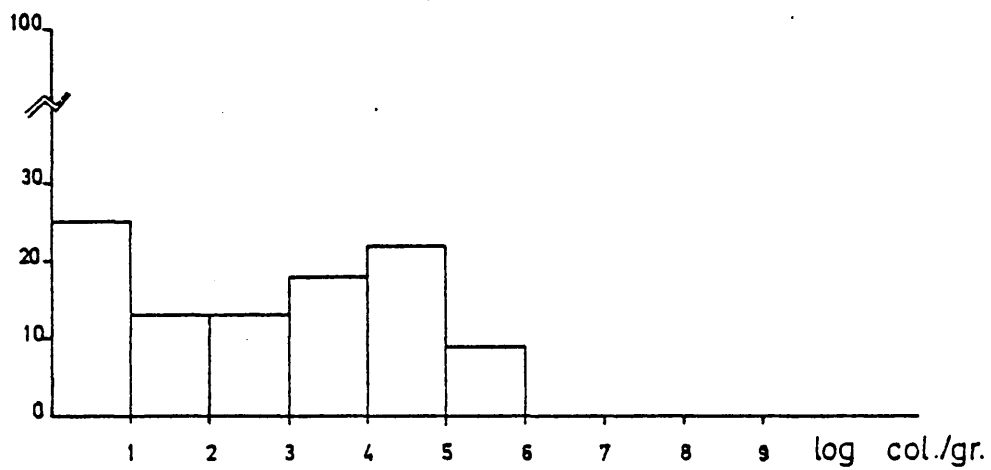


PIMENTON DULCE MURCIA
(51 muestras).



PIMENTON DULCE CACERES
(25 muestras).

FIGURAS XVI y XVII. Recuentos obtenidos para pimentón dulce: Comparación entre zonas productoras.



ESPECIAS (excepto pimentón)
(100 muestras).

FIGURA XVIII. Recuentos obtenidos para el conjunto de especias muestreadas, excepto el pimentón.

B I B L I O G R A F I A

- ALCARAZ, C.F. y CO. (1.982). "Pimiento para pimientón". Consejería de Agricultura. Comunidad Autónoma de Murcia.
- ARX, J.A.VON. (1.981). "The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture". 3301 Lehre. Verlag Von J. Cramer.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. / (1.980). "Official Methods of Analysis". / p. 414-434.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. / (1.984). "Official Methods of Analysis". / p. 477-499.
- BARNETT, H.L. y HUNTER, B.B. (1.972). "Illustrated Genera of Imperfect Fungi". Burgess Publishing Company.
- BARNETT, J.A., PAYNE, R.W. y YARROW, D. (1.983). "Yeasts: Characteristics and Identification". Cambridge University Press.
- BARRON, G.L. (1.977). "The Genera of Hyphomycetes from Soil". R.E. Krieger Publishing Company.
- BECKWITH, A.C. y STOLOFF, L. (1.968). "Fluorodensitometric Measurement of Aflatoxin Thin Layer Chromatograms". J.A.O.A.C. 51: 602-608.
- BELJAARS, P.R. y FABRY, F.H.M. (1.972). "Quantitative Fluorodensitometric Measurements of Aflatoxin B₁ with Flying Spot Densitometer. I. Fluorodensitometric Study of the Behavior of Aflatoxin B₁ Standard Spots on Different Types of Silica Gel". J.A.O.A.C. 55: 775-780.
- BELJAARS, P.R., SCHUMANS, J.C.H.M. y KOKEN, P.J. (1.975). "Quantitative Fluorodensitometric Determination and Survey of Aflatoxins in Nutmeg". J.A.O.A.C. 58,2: 263-271.
- BODROSSY, L. (1.960). "Verminderung des Infektionskeimgehaltes von Gewürzen der Fleischindustrie". Húsipar. 9: 160-164.
- BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO. Nº 293. 7/XII/1.960. "Orden de la Presidencia del Gobierno de 26

de noviembre de 1.960 (por la que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y venta de condimentos y especias naturales)".

BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO. Nº 177. 26/VII/1.961.
"Orden de la Presidencia del Gobierno de 20 de julio de 1.961 (por la que se modifican / determinados artículos de la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración y venta de condimentos y especias naturales)".

BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO. Nº 306. 22/XII/1.984.
"Real Decreto 2242/1.984, de 26 de septiembre, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circu lación y comercio de condimentos y especias".

BOOTH, C. (1.971). "The Genus Fusarium". Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, / England.

CARMICHAEL, J.W., BRYCEKENDRICK, W., CONNERS, I.L. y SIGLER, L. (1.980). "Genera of Hyphomyce-- tes". The University of Alberta Press. Alberta. Canada.

CASTELL, C.H. (1.944). "Thermophilic Bacteria in Foods and in Various Ingredients Entering Into the Manufacture of Foods". Food Res. 9: / 410.

CLARCK, W.R.E. (1.970). "Modern Trends in the Application of Spice". Food Manuf. 45: 53.

CODIGO ALIMENTARIO ESPAÑOL. (1.967). Capítulo / XXIV. p. 109-117.

COLE, R.J. y COX, R.H. (1.981). "Handbook of To-- xic Fungal Metabolites". Academic Press.

CORETTI, K. (1.955). "Bacterial Content of Spices". Fleischwirtschaft. 7: 305-308.

CHRISTENSEN, C.M. (1.972). Amer. Soc. Microbiol. News. 38: 165-169.

CHRISTENSEN, C.M., FANSE, H.A. NELSON, G.H., BA-- TES, F. y MIROCHA, C.J. (1.967). "Microflora

of Black and Red Pepper". Appl. Microbiol. /
15: 622-626.

DOMSCH, K.H., GAMS, W. y ANDERSON, T.H. (1.980).
"Compendium of Soil Fungi". Academic Press.

DWIVEDI, R.A. y GARRET, S.D. (1.968). "Fungal Com-
petition in Agar Plate Colonization from /
Soil Inocula". Trans. Br. Mycol. Soc. 51: /
95-101.

ELLIS, M.B. (1.971). "Dematiaceous Hyphomycetes".
Commonwealth Mycological Institute. Kew, Su-
rrey, England.

ELLIS, M.B. (1.976). "More Dematiaceous Hyphomyce-
tes". Commonwealth Mycological Institute. /
Kew, Surrey, England.

EPPLEY, R.M. (1.968). "Screening Methods for Zea-
ralenone, Aflatoxin and Ochratoxin". J.A.O.A.
C. 51: 74-78.

EPPLEY, R.M., STOLOFF, L. y CAMPBELL, A.D. (1.968)
"Collaborative Study of "A Versatile Procedu-
re for Assay of Aflatoxins in Peanuts Pro---
ducts" Including Preparatory Separation and
Confirmation of Identity". J.A.O.A.C. 51: /
67-73.

FABIAN, F.W., KREH, C.F. y LITTLE, N.W. (1.939).
"Role of Spices in Pickled Food Spoilage". /
Food Res. 4: 269.

FISBACH, H. y CAMPBELL, A.L. (1.965). "Note on De-
toxification of the Aflatoxins". J. Assoc. /
Off. Agr. Chem. 48: 1-28.

FLANNIGAN, B. y HUI, S.C. (1.976). "The Occurren-
ce of Aflatoxin-Producing Strains of Aspergi-
llus flavus in the Mould Floras of Ground /
Spices". J. Appl. Bacteriol. 41: 411-418.

FRANK, H.K. (1.966). "Aflatoxin in Lebensmitteln".
Arch. Lebensmittel-Hyg. Dtsch. 17: 237-242.

FRIESEN, M.D. y GARREN, L. (1.982). "Internatio--
nal Mycotoxin Check Sample Program: Part I.
Report on Laboratory Performance for Deter-

mination of Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in Raw Peanut Meal, Deoiled Peanut Meal, and Yellow Corn Meal". J.A.O.A.C. 65,4: 855-863.

- GAMS, W. (1.971). "Cephalosporium-Artige. Schimmelpilze (Hyphomycetes)". Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
- GERHARDT, U. (1.969). "La degerminización de especies". Gordian. 9: 1-12.
- GERHARDT, U. (1.974). "Especias y condimentos". / Edit. de la Rhein Hess. Druckwerkstätte, E. / Dietl. and Co., Alzey. p. 90-96.
- GIMENO, A. (1.979). "Thin Layer Chromatographic / Determination of Aflatoxins, Ochratoxins, / Sterigmatocystin, Zearalenone, Citrinin, T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Penicillic Acid, Patulin, and Penitrem A". J.A.O.A.C. 62,3: / 579-585.
- GIMENO, A. (1.980). "Improved Method for Thin Layer Chromatographic Analysis of Mycotoxins". J.A.O.A.C. 63,2: 182-186.
- GOLEIZ, K. (1.969). Med. Weter. 23: 362.
- HADLOK, R. (1.969). "La contaminación de productos cárnicos con hongos de moho por especias no tratadas". Fleischwitsch. 49: 1.601-1.608.
- HADLOK, R. (1.970). "Aflatoxine bei Fleischprodukten and Untersuchungen über die Häufigkeit / der Aflatoxinbildung durch Aspergillus flavus Stämme". Fleischwirtschaft. 50: 1.499-1.502.
- HADLOK, R. y TOURE, B. (1.973). "Investigaciones fungicológicas y bacteriológicas de especias desgerminizadas". Arch. Lebensmittelhygiene.
- HALL, J.R. (1.969). "Enhanced Recovery of Salmonella montevideo from Onion Powder by Addition of Potassium Sulfite to Lactose Broth". J.A.O.A.C. 52: 940.
- HARA, S., FENNEL, D.I. y HESSELTINE, C.W. (1.974) "Aflatoxin-Producing Strains of Aspergillus flavus Detected by Fluorescence of Agar Me--

dium Under Ultraviolet Light", Appl. Micro--
biol. 27,6: 1.118-1.123.

- HAWKSWORTH, D.L., SUTTON, B.C. y AINSWORTH, G.C.
(1.983). "Ainsworth and Bisby's Dictionary /
of the Fungi". Commonwealth Mycological Ins-
titute. Kew, Surrey, England.
- HERRMANN, J. (1.963). "Lehrbuch der Vorratspflege"
Berlin: VEB. Deutscher. Landwirtschaftsverlag.
- HESSELTINE, C.W. (1.955). "Genera of Mucorales /
with Notes on Their Synonymy". Mycologia. /
47: 344-363.
- HESSELTINE, C.W. (1.965). "A Millenium of Fungi,
Foods and Fermentations". Mycologia. 57: /
149-197.
- HESSELTINE, C.W. (1.967). "Aflatoxins and Other /
Mycotoxins". Health Laboratory Science. 4: /
222-228.
- HESSELTINE, C.W. y FENNELL, D.I. (1.955). "The Ge
nus Circinella". Mycologia. 47: 193-213.
- HITOKOTO, H., MOROZUMI, S., WAUKE, T., SAKAI, S.
y KURATA, H. (1.980). "Inhibitory Effects of
Spices on Growth and Toxin Production of To-
xigenic Fungi". Appl. Environ. Microbiol. /
39,4: 818-822.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. /
(1.970). "Annual Report". L.A.E.C. Lyon.
- INTERNATIONAL COMMISSION FOR MICROBIOLOGICAL SPE-
CIFICATIONS FOR FOODS. (1.974). "Microorga--
nisms in Foods: Sampling for Microbiological
Analysis. Principles and Specific Applica--
tions". University of Toronto Press. Canada.
- JAMES, L.H. (1.938). Food Industries. 10: 428-429
y 468.
- JAY, J.M. (1.978). "Microbiología moderna de los
alimentos". Edit. Acribia.
- JENSEN, V. (1.962). "Studies on the Microflora of
Danish Beech Forest Soils. I. The Dilution /

Plate Coun Technique for the Enumeration of Bacteria and Fungi in Soil". Zbl. Bakter II. 116: 13-32.

- JESSON, L.B., WOOD, I.H. y JENSON, C.E. (1.934). "Spoilage of Canned Chopped Ham by Organisms Carried by Spices". Ind. Eng. Chem. 26: / 1.118. (Citado por Pruthi, J.S., 1.980).
- JOLY, P. (1.964). "Le Genre Alternaria". Encyclopedie Micologique. XXXIII.
- JULSETH, R.M. y DEIBEL, R.H. (1.974). "Microbial Profile of Selected Spices and Herbs at Import". J. Milk Food Technol. 37: 414.
- KINNER, J.A., KOTULA, A.W. y MORCURI, A.J. (1.968) "Microbiological Examination og Ingredients of Eastern Type Turkey Rolls". Poult. Sci. / 47: 1.442.
- KORZYBSKI, T. y KORYLOWICZ, W. (1.961). Antibiotica. Jena: VEB. Gustav Fischer Verlag.
- KRISHNAWAMY, M.A., PATEL, J.D. y PARTHASARATHY, N. (1.971). "Enumeration of Microorganisms in / Spices and Spice Mixtures". J. Food Sci. Technol. 8: 191.
- KRISHNAWAMY, M.A., PATEL, J.D., PARTHASARATHY, N. y NAIR, K.K.S. (1.973). "Some of the Types / of Coliforms, Aerobic Mesophilic Spore Formers, Yeast and Moulds Present in Spices". / J. Plant Crops 1, Suppl., p. 200.
- KREGGER-VAN RIJ, N.J.W. (1.984). "The Yeasts: A Taxonomic Study". Elsevier Science Publishers. B.V. Amsterdam.
- LAENCINA, J. (1.982). "Informe sobre contenido microbiológico en pimentón y otras especias". C.S.I.C.
- LAL, R.N. y SADASIVAN, R.S. (1.944). "Standarization of Curry Powders". Indian J. Agric. Sci. 14: 32.
- LANCILLOTTI, F. y LUCISANO, A. (1.971). "Le Aflatoxine". Industria Conserve. 46: 11-123.

- LODDER, J. (1.974). "The Yeasts". North Holland / Publishing Company. Amsterdam.
- MARTINEZ, A. (1.976). "Estudio ecológico de la / miocenosis de un andosuelo, bajo bosque de / hayas". Tesis Doctoral.
- MATEOS, A., PAYA, M.J., CUTULI, M.T. y SUAREZ, G. (1.982). "Contribución al estudio de la micoflora contaminante del yogur. Aislamiento, / comprobación e inoculación de especies aflatoxigénicas". III Reunión Científica del Grupo Especializado en Microbiología de los Alimentos de la S.E.M. Facultad de Veterinaria. León.
- MATEOS GARCIA, A. y SUAREZ FERNANDEZ, G. (1.983). "Micoflora contaminante del yogur. Aislamiento, comprobación de toxigenicidad e inoculación de especies aflatoxigénicas". Alimentaria 148: 39-40.
- MAYR, G.E. y SUHR, H. (1.972). "Preservation and Sterilization of Pure and Mixed Spices". / Proc. Int. Conf. Spices, Trop. Prod. Inst. / London. 1.972. p. 201.
- MISLIVEC, P.B., DOUGLAS, R.G. y KAUTER, D.A. / (1.972). "Annual Meeting of the American Society of Microbiology". Phyladelphia. Abstracts, p. 27.
- MISRA, B.D. (1.962). "Studies on Physico-Chemical, Microbiological and Technological Aspects of Curry Powder and Spice Mixtures". Assoc. Thesis, C.F.T.R.I. Mysore, India.
- MONTEGUT, J. (1.960). "Value of the Dilution Method" in "The Ecology of Soil Fungi". Ed. / Parkinson and Waid. p. 43-52.
- MOREAU, C. (1.974). "Moisissures Toxiques dans / l'Alimentation". Masson et Cie. Editeurs.
- MOSSEL, D.A.A. (1.982). "Efectos subletales y revitalización en Microbiología de los Alimentos". IIIª Reunión Científica del Grupo de / Microbiología de los Alimentos. Sociedad Española de Microbiología. León.

- MOSSEL, D.A.A., HARREWIJN, G.A. y ELZEBROEK, J.M. (1.973). UNICEF.
- MOSSEL, D.A.A., KLEYNEN-SEMMELING, A.M.C., VINCEN TIE, H.M., BEERENS, H. y CATSARAS, M. (1.970) J. Appl. Bact. 33: 454-457.
- MOSSEL, D.A.A., VEGA, C.L. y PUT, H.M.C. (1.975). J. Appl. Bact. 39: 15-22.
- MOSSEL, D.A.A., VISER, M. y MENGERINK, W.H.J. / (1.962). Lab. Prac. 11: 109-112.
- MULLER, G. (1.981). "Microbiología de los alimentos vegetales". Ed. Acribia. Zaragoza.
- NATARAJAN, C.P. y SHANKARACHARYA, N.B. (1.972). / "Microbial Quality Standards for Foods". / Food Ind. J. 5 (1): 11.
- NECHOTENOVA, T.I., ET AL. (1.961). "Sterilisation von Gewürzen durch Athylenoxid". Konservn. i ovoscesus promyslennost. 16: 23-24.
- NIEMANN, H.E. (1.969). "Mikrobiologische Untersuchung über die Mikroflora von Gewürzen und / deren Entkeimung mit Athylenoxid". Diplomarbeit Sekt. Nahrungsgüterwirtsch. Lebebsmit--teltechn. Humboldt-Universität zu Berlin.
- OFICINA FEDERAL DE LA SALUD PUBLICA. BERNA (SUIZA) (1.982). "Metodo oficial para la cuantificación de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂". / Grupo de Trabajo Toxinas 2 de la Comisión / del Manual de los Productos Alimenticios de la Confederación. p. 1-7.
- ORMAY, L., ET AL. (1.968). "El significado de Bacillus cereus relativo al envenenamiento de comestibles en Hungría". Microbiología de Alimentos secos. Procedimiento del 6º Simposio Internacional de Microbiología de los Alimentos.
- PAL, N. y KUNDU, A.K. (1.972). Sci. Cult. 38: / 252-254.
- PEERS, F.G., GILMAN, G.A. y LINSELL, C.A. (1.976) "Dietary Aflatoxins and Human Liver Cancer.

- PEERS, F.G. y LINSELL, C.A. (1.973). "Dietary Afla
toxins and Liver Cancer A Population Based /
Study in Kenya". Brit. J. Cancer. 27: 473-484.
- PETSKA, J.J., GOUR, P.K. y CU, F.S. (1.980). Appl.
Environ. Microbiol. 40: 1.027-1.031.
- PITT, J.I. (1.979). "The Genus Penicillium". Aca-
demic Press.
- POHJA, M.S. (1.957). "Microbial Counts of Solid /
and Liquid Spices". Fleischwirtschaft. 9: /
547.
- PONS, W.A., Jr. (1.975). "Collaborative Study of
A Rapid Method for Determining Aflatoxins in
Cottonseed Products". J.A.O.A.C. 58: 746-753.
- PONS, W.A., Jr., CUCULLU, A.F., FRANZ, A.O., Jr.,
LEE, L.S. y GOLDBLATT, L.A. (1.973). "Rapid
Detection of Aflatoxin Contamination in Agri-
cultural Products". J.A.O.A.C. 56: 803-807.
- PONS, W.A., Jr., CUCULLU, A.F. y LEE, L.S. (1.971)
"Proc. Third. Intern. Congr. Food Sci. Techn-
ol. (SOS/70)". 1.970. p. 705-711.
- PONS, W.A., Jr., LEE, L.S. y STOLOFF, L. (1.980).
J.A.O.A.C. 63: 899-906.
- POWERS, E.M., LAWYER, R. y MASUOKA, Y. (1.975). /
"Microbiology of Processed Spices". J. Milk
Food Technol. 38: 683-687.
- PROCTOR, B.E., GOLDBLITH, S.A. y FRAM, H. (1.950)
"Effect of Super-Voltage Cathode Rays on Bac-
terial Flora of Spices and other Dry Food Ma-
terials". Food Res. 15: 490.
- PROGRAMA MIXTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS.
(1.982). "Evaluación de otros tratamientos /
de esterilización de las especias utilizadas
en los productos cárnicos.
- PRUTHI, J.S. (1.964). "Chemistry, Microbiology /
and Technology of Curry Powders". Spices /

- PRZYBYLSKI, W. (1.975). "Formation of Aflatoxin Derivatives on Thin Layer Chromatographic / Plates". J.A.O.A.C. 58: 163-164.
- RAMIREZ, C. (1.982). "Manual and Atlas of the Penicillia". Elsevier Biomedical Press.
- RAMIREZ, C., MARTINEZ, A.T. y BERENQUER, J.A. / (1.980). "Four New Species of Penicillium Isolated from the Air". Mycopathologia. 72: / 27-34.
- RAO, B.A.S., MISRA, B.D. y PRUTHI, J.S. (1.962). "Microbiological Examination of Curry Powders and Spice Mixtures". Proc. Symp. Spices Role Natl. Econ., 1 st, 1.962. Abstract, p.3
- RAPER, K.B. y FENNEL, D.I. (1.977). "The Genus / Aspergillus". R.E. Krieger Publishing Company.
- RICHMOND, B. y FIELDS, M.L. (1.966). "Distribution of Thermophilic Aerobic Sporeforming / Bacteria in Food Ingredients". Appl. Microbiol. 14: 623-626.
- RIFAI, M.A. (1.969). "A Revision of the Genus Trichoderma". Mycological Papers. 116: 1-56.
- ROBERTSON, J.A., LEE, L.S., CUCULLU, A.F. y GOLDBLATT, L.A. (1.965). "Assay of Aflatoxin in Peanuts and Peanuts Products Using Acetone-Hexane-Water for Extraction". J. Amer. Oil / Chem. Soc. 42: 467-471.
- ROMER, T.R. (1.973). J.A.O.A.C. 56: 1.111-1.114.
- ROMER, T.R. (1.975). "Screening Method for the Detection of Aflatoxins in Mixed Feeds and Other Agricultural Commodities with Subsequent Confirmation and Quantitative Measurement of Aflatoxins in Positive Samples". / J.A.O.A.C. 58: 500-506.
- ROMER, T.R. y CAMPBELL, A.D. (1.976). "Collaborative Study of A Screening Method for the Detection of Aflatoxins in Mixed Feeds, Other Agricultural Products, and Foods". J.A.O.A.C. 59: 110-117.

- SAMSON, R.A. (1.979). "A Compilation of the Aspergilli Described Since 1.965". Studies in Micology Nº 18.
- SAMSON, R.A., STOLK, A.C. y HADLOK, A. (1.976). / "Revision of the Subsection Fasciculata of / Penicillium and Some Allied Species". Studies in Micology Nº 11.
- SCOTT, P.M. y KENNEDY, B.P.C. (1.973). "Analysis and Survey of Ground Black, White and Capsicum Peppers for Aflatoxins". J.A.O.A.C. 56,6: 1.452-1.457.
- SCHULLER, P.L., HORWITZ, W. y STOLOFF, L. (1.976) "A Review of Sampling Plans and Collaboratively Studied Methods of Analysis for Aflatoxins". J.A.O.A.C. 56,6: 1.315-1.343.
- SCHWAB, A.H., HARPESTAD, A.D., SWARTZENTRUBER, A., LANIER, J.M., WENTZ, B.A., DURAN, A.P., BARNARD, R.J. y READ, R.B., Jr. (1.982). "Microbiological Quality of Some Spices and Herbs in Retail Markets". Appl. Environ. Microbiol. 44,3: 627-630.
- SHANK, R.C., WOGAN, G.N., GIBSON, J.B. y NONDASUTA, A. (1.972). "Dietary Aflatoxins and Human Liver Cancer. II. Aflatoxin in Market / Foods and Foodstuffs of Thailand and Hong- / Kong". Food Cosmet. Toxicol. 10: 61-69.
- SHARMA, A., BEHERE, A.G., PADWALL-DESAI, S.R. y / NADKARNI, G.B. (1.980). "Influence of Inoculum Size of Aspergillus parasiticus Spore Spores on Aflatoxin Production". Appl. Environ. Microbiol. 40,6: 989-993.
- SILLIKER, J.H. (1.963). "Total Count as Indexes / of Food Quality". In "Microbiological Quality of Foods" (Slanetz, Gaufin, and Ordal, / Eds.) p. 102. Academic Press. New York.
- SIMMONS, E.G. (1.967). "Typification of Alternaria, Stemphylium, and Ulocladium". Mycologia 59: 67-92.
- SMITH, G. (1.963). "Introducción a la Micología / Industrial". Ed. Acribia. Zaragoza.

- SMITH, H.W. (1.940). "Treated Spices Reduce Spoilage". Food Ind. 12,11: 50.
- STAHL, W.H. (1.972). "Oleoresin Quality Analysis: Facts or Fancy?". Trop. Sci. 14: 335.
- STOLK, A.C. y SMASON, R.A. (1.983). "The Ascomycete Genus Eupenicillium and Related Penicillium Anamorphs". Studies in Micology. Nº 23.
- STOLOFF, L. (1.980). "Aflatoxin Control: Past and Present". J.A.O.A.C. 63,5: 1.067-1.073.
- STOLOFF, L., BECKWITH, A.C. y CUSHMAC, M.E. / (1.968). "TLC Spotting Solvent for Aflatoxins". J.A.O.A.C. 51,1: 65-67.
- STOLOFF, L. y FRIEDMAN, L. (1.976). "Information Bearing on the Evaluation of the Hazard to Man from Aflatoxin". P.A.G. Bulletin. 6,2.
- STOLOFF, L., NESHEIM, S., YIN, L., RODRICKS, J.V., STACK, M. y CAMPBELL, A.D. (1.971). "A Multimycotoxin Detection Method for Aflatoxins, Ochratoxins, Zearalenone, Sterigmatocystin, and Patulin". J.A.O.A.C. 54,1: 91-97.
- STRONG, D.H., CANADA, J.C. y GRIFFITHS, B.B. / (1.963). "Incidence of Clostridium perfringens in American Foods". J. Appl. Microbiol. 11: 42.
- STUBBLEFIELD, R.D. (1.980). "Stability and Molar Absorptivity of Aflatoxin M₁ in Acetonitrile-Bencene (1+9)". J.A.O.A.C. 63.3: 634-636.
- SUAREZ FERNANDEZ, G. y ESCUDERO, A. (1.973). "Estudio de los efectos tóxicos producidos por la aflatoxina B₁ según la vía de inoculación y especie animal utilizada. Comunicación presentada al IV Congreso Nacional de Microbiología.
- SUAREZ FERNANDEZ, G., GUARRO ARTIGAS, J. y CALVOTORRAS, M.A. (1.977). "Fungi as Contaminants in the Pharmaceutical Industry. Possible toxicogenic Power". Pharmaceutica Acta Helveticae. 52: 267-270.

- SUAREZ-FERNANDEZ, G. e YLLA-CATALA GENIS, M. /
(1.977). "Producción de aflatoxinas en dis--
tintos tipos de fécula de calidad farmaceuti
ca". VI Congreso Nacional de Microbiología.
Santiago de Compostela.
- SUZUKI, J.I., DAINIUS, B. y KILBUCK, J.H. (1.973)
"A Modified Method for Aflatoxin Determina--
tion in Spices". J. Food Sci. 38: 949-950.
- SWARUP, J. y MATHUR, R.S. (1.972). "Seed Microflo
ra of Some Umbelliferous Spices". Indian Phy
topathol. 25: 125.
- TOKIN, B.P. (1.956). "Phytonzide". Berlin: V.E.B.
Verlag Volk und Gesundheit.
- TOROK, G. y FARKAS, J. (1.961). "Assays into the
Cell Count Reducing Effect of Ionising Radia
tion in Ground Paprika". Központi Elelmisze
ripari Kutatointézel Közleményei. 3: 1-7.
- TRUCKNESS, M.W. y STOLOFF, L. (1.980). "Thin La--
yer Chromatographic Determination of Aflato-
xins in Dry Ginger Root and Ginger Oleoresin"
J.A.O.A.C. 63,5: 1.052-1.054.
- VAUGHN, R.H. (1.970). "Incidence of Various /
Groups of Bacteria in Dehydrated Onions and
Garlic". Food Technol. 24: 83.
- VELASCO, J. (1.972). "Modified Ferric Gel Method
for Determining Aflatoxin in Cottonseed /
Meals". J.A.O.A.C. 55,6: 1.359-1.360.
- VELASCO, J. (1.975). "Fluorometric Measurement of
Aflatoxin Adsorbed on Florisil In Minico----
lumns". J.A.O.A.C. 58,4: 757-763.
- VRIES, G.A., DE (1.967). "Contribution to Knowled
ge of the Genus Cladosporium Link ex Fr.". /
3301 Lehre. Verlag Von J. Cramer.
- WALTKING, A.E. (1.978). "Collaborative Study of /
Three Methods for Determination of Aflatoxin
in Peanuts and Peanuts Products". J.A.O.A.C.
53: 104-113.
- WARMBROD, F. y FRY, L.J. (1.966). "Coliform and /

Total Bacterial Counts in Spices, Seasonings
and Condiments". J.A.O.A.C. 49: 678.

- WICKLOW, D.T., SHOTWELL, O.L. y ADAMS, G.L. /
(1.981). "Use of Aflatoxin-Producing Ability
Medium to Distinguish Aflatoxin-Producing /
Strains of Aspergillus flavus". Appl. Envi--
ron. Microbiol. 41,3: 697-699.
- WOGAN, G.N. y SHANK, R.C. (1.971). "Toxicity and
Carcinogenicity of Aflatoxins. Advances in /
Environmental Science and Technology". Ed. /
Pitts-Metcalf.
- WYLLIE, T.D. y MOREHOUSE, L.G. (1.977). "Mycoto--
xic Fungi. Mycotonins. Mycotoxinoses". Vol 1.
Marcel Dekker, Inc. New York and Basel.
- YESAIR, J. y WILLIAMS, O.B. (1.942). "Spice Conta
mination and Its Control". Food Res. 7: 118.
- ZSCHALER, R. (1.979). "Identificación de microor--
ganismos. Investigaciones y criterios de en--
juiciamiento en alimentos secos y gaseados".
Ernährungswirtschaft/Lebensmitteltechnik. 9:
61-67.
- ZYCHA, H., SIEPMANN, R. y LINNEMAN, G. (1.969). /
"Mucorales". D-3301 Lehre. Verlag Von J. Cra
mer.