

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS TAPONES DE CORCHO

3.1.1. PREPARACIÓN DE TAPONES CONTROL

Se ensayaron diferentes métodos para inocular experimentalmente los tapones de corcho con microorganismos que se aíslan frecuentemente de este sustrato.

3.1.1.1. Microorganismos utilizados

Los microorganismos utilizados para preparar los tapones de corcho control, fueron aislados previamente de tapones de corcho para vinos espumosos provenientes de diversas fábricas elaboradoras de este producto en Catalunya. Los mismos se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Microorganismos utilizados para la inoculación experimental de los tapones de corcho controles.

Hongos filamentosos	Levaduras	Bacterias
<i>Aspergillus niger</i> (FVB 1)	<i>Rhodotorula glutinis</i> (FVB 8)	<i>Bacillus cereus</i> (FVB 9)
<i>A. flavus</i> (FVB 2)		
<i>A. fumigatus</i> (FVB 3)		
<i>Rhizopus arrhizus</i> (FVB 10)		
<i>Acremonium strictum</i> (FVB 7)		
<i>Paecilomyces variotii</i> (FVB 6)		
<i>Trichoderma viride</i> (FVB 5)		
<i>Penicillium frequentans</i> (FVB 4)		

FVB: Colección de Cultivos de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

3.1.1.2. Tapones de corcho

Se procedió a la inoculación de una suspensión de los microorganismos a 270 tapones de corcho para vinos espumosos, los cuales fueron obtenidos en diferentes fábricas de tapones de corcho de Catalunya.

Previa a la inoculación, los tapones fueron introducidos en matraces de 250 ml de capacidad (a razón de 2 tapones por cada matraz) y esterilizados en autoclave a 120 °C, una atmósfera de presión, durante 20 minutos. Tras la esterilización se comprobó que no se alteraron las características físicas de los tapones siguiendo la Norma Catalana N° 010/95.

3.1.1.3. Suspensiones de conidios fúngicos, levaduras y bacterias

Se realizaron suspensiones celulares de los microorganismos aislados para inocularlos posteriormente a los tapones de corcho estériles.

3.1.1.3.1. Suspensiones de conidios fúngicos y levaduras

A los cultivos puros de los hongos filamentosos mencionados anteriormente se les agregaron 9 ml de solución fisiológica estéril y se procedió a agitar vigorosamente de forma mecánica para favorecer el desprendimiento de los conidios. Las suspensiones obtenidas se filtraron a través de doble gasa estéril, eliminando de esta forma otras estructuras fúngicas y obteniendo sólo conidios en las suspensiones. Se comprobó bajo el microscopio óptico, la ausencia de micelio y de otras estructuras fúngicas.

Posteriormente, se procedió a determinar el número de conidios por ml de la suspensión, para lo cual se depositó una alícuota de la misma, previamente homogeneizada, en la cámara de Bürker y se contaron los conidios en 80 cuadrados como mínimo. El número de conidios/ml se obtuvo multiplicando el promedio de los conidios contados por la superficie de la cámara y por la altura de la misma, este resultado se multiplicó por 1000 para así obtener el número total de conidios/ml.

Para realizar las suspensiones de levaduras, se tomaron colonias de los cultivos puros con asa bacteriológica, se suspendieron en suero fisiológico estéril y se determinó el número de células/ml de la manera antes descrita.

Se obtuvieron de esta forma, suspensiones del orden de 10^9 células/ml. Estas suspensiones se diluyeron en suero fisiológico estéril hasta obtener concentraciones del orden de 10^7 o de 10^5 células/ml.

3.1.1.3.2. Suspensiones de bacterias

Las suspensiones de bacterias se realizaron tomando colonias de los cultivos puros con asa bacteriológica estéril las cuales se suspendieron en suero fisiológico estéril, se comparó la turbidez obtenida con el tubo N° 4 de la escala de Mc Farland. Posteriormente, fueron diluidas en suero fisiológico estéril para obtener suspensiones de células con concentraciones del orden de 10^7 o de 10^5 células/ml.

3.1.1.4. Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron: agar extracto de malta al 2% adicionado de 30 ppm de clorhidrato de tetraciclina para el recuento y recuperación de hongos filamentosos y de levaduras (AEM) y agar triptona soja (TSA) para el recuento y recuperación de bacterias. A continuación se especifican la composición de cada uno de ellos:

Agar extracto de malta al 2%

Extracto de malta	20 g
Glucosa	20 g
Peptona	1 g
Agar-agar	20 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Ajustar pH a $4,5 \pm 0,2$. Esterilizar en autoclave a 120°C , 20 minutos.

Agar triptona soja

Triptona	15 g
Triptona de soja	5 g
Cloruro sódico	5 g
Agar-agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Ajustar pH a $7,3 \pm 0,2$. Esterilizar en autoclave a 120°C , 20 minutos

3.1.1.5. Inoculación de los tapones

Se prepararon baterías de matraces (3 matraces por cada concentración a ensayar) que contenían 2 tapones previamente pesados y esterilizados. A cada batería se le agregaron las suspensiones microbianas preparadas a las concentraciones mencionadas anteriormente, previo estudio de la viabilidad del inóculo inicial. En primer lugar, se realizaron las pruebas con las suspensiones de concentración 10^7 células/ml y luego con las suspensiones de concentración 10^9 o 10^5 células/ml.

A continuación se describen las metodologías utilizadas para la inoculación de los tapones de corcho.

3.1.1.5.1. Inoculación por aerosol

Un grupo de baterías de matraces fue inoculado con las suspensiones de microorganismos en forma de aerosol bajo campana de flujo laminar, impregnándolos uniformemente.

3.1.1.5.2. Inoculación por inmersión

A otro grupo de baterías de matraces, se les agregó 20 ml de la mezcla de suspensiones microbianas, a razón de 2 ml de suspensión de cada microorganismo. Los matraces así preparados se colocaron en un agitador-incubador y se agitaron por 3, 6, 9 y 24 horas a 28 °C y a 180 r.p.m. Al finalizar este tiempo se decantaron las suspensiones. A partir del líquido decantado se realizaron diluciones decimales seriadas que se sembraron por triplicado en AEM y TSA, se incubaron a 28 °C por 3-5 días y 37 °C por 24 horas, respectivamente. Posteriormente se contaron las Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/ml, estableciéndose el promedio en cada dilución. Cada batería fue procesada por triplicado y todos los ensayos se acompañaron de un control de esterilidad.

En un primer período se utilizaron mezclas formadas por las suspensiones de conidios fúngicos de *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* y *Penicillium frequentans*. En un segundo período se utilizaron mezclas de todas las suspensiones de conidios fúngicos, levaduras y bacterias. Cada una de estas mezclas se preparó respectivamente en

concentraciones de 10^9 , 10^7 o de 10^5 células/ml y se mezcló igual volumen de cada una de ellas (2 ml).

3.1.1.6. Recuento de los microorganismos recuperados

El recuento de los microorganismos recuperados se realizó por el método de las diluciones decimales seriadas. A los tapones de corcho inoculados experimentalmente se les agregó un volumen de suero fisiológico estéril que permitiera (según el peso de los tapones) la primera dilución, los matraces así preparados, se agitaron mecánicamente durante una hora, a 28 °C y 120 r.p.m., para favorecer la separación de los microorganismos de los tapones de corcho.

A partir de esta dilución se realizaron las siguientes en forma decimal seriada; 0,1 ml fueron sembrados en AEM al 2% adicionado de antibióticos con el fin de cuantificar los hongos filamentosos y las levaduras e igual cantidad en TSA para la cuantificación de bacterias, las placas se incubaron a 28 °C por 3-5 días y 37 °C por 24 horas respectivamente. Este ensayo se realizó por triplicado.

Al finalizar la incubación se llevó a cabo el recuento de las UFC/tapón y la determinación del porcentaje de recuperación de microorganismos en cada tapón, aplicando las siguientes fórmulas:

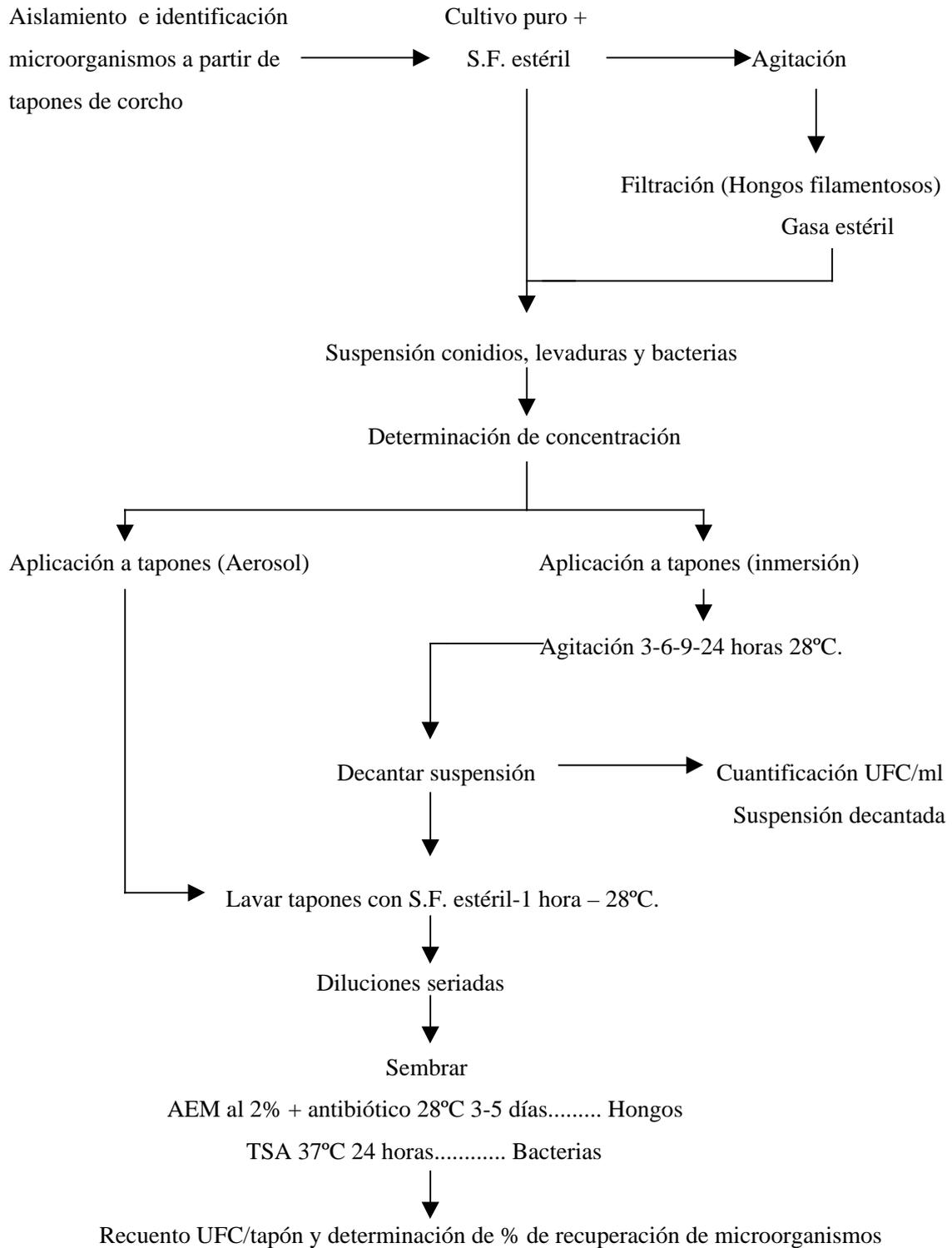
$$\% \text{ Recuperación} = 100\% - \% \text{ Reducción}$$

$$\% \text{ Reducción Tapones} = \frac{\text{UFC inoculados/tapón} - \text{UFC detectadas/tapón}}{\text{UFC inoculados/tapón}} \times 100$$

$$\text{UFC inoculados/tapón} = \text{UFC inóculo inicial} - \text{UFC inóculo final (después del lavado)}$$

$$\% \text{ Reducción inóculo} = \frac{\text{UFC/ml (inóculo inicial)} - \text{UFC/ml (inóculo final)}}{\text{UFC/ml (inóculo inicial)}} \times 100$$

A continuación se esquematiza el procedimiento de laboratorio realizado para la preparación de los tapones de corcho controles.



Esquema 3. Procedimiento de laboratorio para la preparación de tapones controles

3.1.2. EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS TAPONES DE CORCHO

3.1.2.1. Inoculación de los tapones de corcho control

Fueron inoculados tapones de corcho para vinos espumosos durante 6 horas por el método de inmersión, con mezclas de suspensiones de conidios fúngicos, levaduras y bacterias a concentraciones de 10^2 células/ml.

Las mezclas de microorganismos estaban formadas por suspensiones de conidios de *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Penicillium frequentans*, *Trichoderma viride*, *Paecilomyces variotii*, *Acremonium strictum* y células de *Rhodotorula glutinis* y *Bacillus cereus*; las cuales fueron aplicadas a los tapones de corcho a razón de 2 ml cada una.

A estas mezclas no se adicionó ninguna especie del grupo de los *Zigomycetes*, con la finalidad de evitar que su crecimiento invasivo impidiera el recuento de los demás microorganismos.

3.1.2.2. Ensayos realizados para evaluar el método de referencia

Los diferentes parámetros establecidos por la Norma Catalana N° 0.20/95 para el control microbiológico de tapones de corcho para vinos espumosos fueron ensayados en los tapones de corcho control, de igual forma estos parámetros fueron modificados a fin de establecer las comparaciones respectivas.

Los parámetros objeto de estudios fueron: soluciones de lavado, tiempo y velocidad de lavado, medios de cultivo, tiempos y temperaturas de incubación. Cada uno de ellos se probó en forma individual y se mantuvieron los demás constantes. Se tomaron en cuenta los mejores resultados en cada caso para continuar con la prueba siguiente. Cada uno de los ensayos se realizó 6 veces con tres réplicas cada uno y se acompañó de sus respectivos controles de esterilidad.

3.1.2.2.1. Prueba de las soluciones de lavado

Para llevar a cabo las pruebas de las soluciones de lavado, se introdujeron 2 tapones control en un matraz que contenía 100 ml de suero fisiológico estéril. De igual forma otros 2 tapones control se sumergieron en un matraz que contenía 100 ml de solución estéril Ringer _.

Los matraces así preparados se agitaron mecánicamente a 150 r.p.m. por 60 minutos. Culminado este tiempo, las soluciones de lavado fueron filtradas al vacío sobre filtros estériles de nitrocelulosa (Lida[®]) de 47 mm de diámetro y 0,45 µm de diámetro de porosidad. Los filtros se retiraron asépticamente y se colocaron sobre la superficie de los medios de cultivo Plate Count Agar (PCA) y Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) adicionado de 3 ppm de clorhidrato de tetraciclina. Las placas de PCA se incubaron a 37 °C durante 24 horas para el recuento de bacterias y las placas de SDA se incubaron a 28 °C durante 3-5 días para el recuento de hongos filamentosos y levaduras.

3.1.2.2.2. Prueba de la velocidad de lavado

Para realizar esta prueba, se agitaron mecánicamente durante 60 minutos a 100, 150 y 200 r.p.m., matraces que contenían dos tapones controles cada uno, sumergidos en 100 ml de solución Ringer _ estéril o en 100 ml de suero fisiológico estéril.

El procesado posterior de los tapones control siguió de la misma forma que fue descrita en el apartado anterior.

3.1.2.2.3. Prueba del tiempo de lavado

Se colocaron 2 tapones de corcho en matraces que contenían 100 ml de las soluciones de lavado antes mencionadas y se agitaron a 150 r.p.m. por 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos. El procesado posterior se siguió según lo descrito en el apartado 3.1.2.2.1.

3.1.2.2.4. Prueba de los medios de cultivo

Los tapones de corcho control sumergidos en las soluciones de lavado (suero fisiológico o Ringer _ estériles) se agitaron durante 30 minutos a 150 r.p.m., las soluciones de lavado fueron filtradas como se indica en el punto 3.1.2.2.1. Tras la filtración al vacío, los filtros fueron colocados asépticamente sobre diferentes medios de cultivo para el posterior recuento de los microorganismos recuperados.

Para el recuento de las bacterias se utilizaron los medios de cultivo Plate Count Agar (PCA) y Triptona de Soja Agar (TSA); para el recuento de hongos filamentosos y levaduras se usaron los medios de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), Extracto de Malta Agar (AEM); WL Nutritivo Agar (WLN) y Rosa de Bengala Agar (RBA).

A continuación se detalla la composición de los medios de cultivo no descritos anteriormente:

Plate Count Agar

Peptona	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Dextrosa	1,0 g
Agar-agar	15,0 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

pH del medio: $7,0 \pm 0,2$

Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Sabouraud Dextrosa Agar

Glucosa	40 g
Peptona	5 g
Peptona de carne	5 g
Agar-agar	15 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

pH del medio: $5,6 \pm 0,2$

Esterilizar a 120 °C por 20 minutos.

WL Nutritivo Agar

Extracto de levadura	4,000 g
Triptona	5,000 g
Dextrosa	50,000 g
Fosfato monopotásico	0,550 g
Sulfato magnésico	0,125 g
Cloruro cálcico	0,125 g
Cloruro férrico	0,002 g
Sulfato manganosos	0,002 g
Cloruro potásico	0,425 g
Verde bromocresol	0,022 g
Agar agar	20,000 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

pH del medio: $5,5 \pm 0,2$

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos

Rosa de Bengala Agar

Peptona	5,00 g
Dextrosa	10,00 g
Fosfato potásico	1,00 g
Sulfato magnésico	0,50 g
Rosa de bengala	0,05 g
Agar-agar	10,00 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Cloranfenicol	0,50 g

pH del medio: $7,2 \pm 0,2$

Esterilizar a 121 °C por 20 minutos

3.1.2.2.5. Prueba del tiempo de incubación

Los tapones de corcho control fueron procesados siguiendo los pasos del apartado anterior. Los filtros se colocaron sobre los medios de cultivo TSA para el recuento de bacterias y sobre SDA para el recuento de hongos filamentosos y levaduras incubándose a 37 °C y 28 °C respectivamente por 24, 48, 72, 96 y 120 horas.

3.1.2.2.6. Prueba de la temperatura de incubación

Finalmente, se probaron diferentes temperaturas de incubación de los filtros sobre los medios de cultivo antes mencionados, estas fueron 35, 37 y 39 °C para el recuento de bacterias y 25, 28 y 30 °C para el recuento de hongos.

3.1.2.3. Cálculo de las UFC/tapón

Los recuentos totales de las UFC en cada uno de los filtros se dividieron entre el número de tapones ensayados en cada matraz, obteniéndose de esta forma las

UFC/tapón. Estos cálculos se realizaron tanto para todos los microorganismos en las mezclas aplicadas como para las especies de cada uno de ellos presentes en cada una de las mezclas.

$$\text{UFC/tapón} = \frac{\text{UFC/ filtro}}{N}$$

N= Número de tapones

3.1.2.4. Comparación de metodologías

Se prepararon tapones de corcho control utilizando el método del inmersión con la finalidad de aplicarles diferentes metodologías y comparar los recuentos de los microorganismos recuperados.

Las metodologías empleadas fueron:

- a) Las establecidas por la Norma ISO 10718:1993.
- b) El método de las diluciones decimales seriadas.
- c) El método Sistema Miliflex-100.

Así mismo, se compararon los resultados obtenidos al aplicar la metodología propuesta en este trabajo utilizando tapones de corcho para vinos espumosos y tapones de corcho para vinos tranquilos.

3.1.2.4.1. Norma ISO 10718:1993

A los tapones controles se les aplicó la metodología establecida por el International Standarization Organism ISO 10718:1993 para el control microbiológico de este producto. Las diferencias básicas de esta Norma con la Norma Catalana 0.20/95 es la utilización de caldo de extracto de malta acidificado con ácido tartárico y adicionado de etanol como solución de lavado y un tiempo de lavado de 24 horas.

3.1.2.4.2. Método de las diluciones decimales seriadas

Los tapones de corcho control pesados previamente, fueron inoculados por el método de inmersión con 20 ml de las suspensiones de microorganismos en concentración de 10^9 células/ml (A razón de 2 ml de cada suspensión) y se realizaron diluciones decimales seriadas a partir de esta concentración, como se indica en el apartado 3.1.1.6.

3.1.2.4.3. Método Sistema Miliflex-100®

Este sistema utiliza una bomba al vacío al cual se le adosa la unidad Miliflex-100® que está compuesta por un embudo de 100 ml de capacidad, que posee el filtro estéril de ésteres de celulosa de 0,45 μ m de porosidad, después de la filtración de la solución de lavado de los tapones de corcho, la unidad se coloca sobre la cámara que contiene el medio de cultivo semisólido (Caldo m-TGE para el recuento total de bacterias y otros microorganismos aerobios o Caldo m-GREEN para el recuento de hongos filamentosos y levaduras), se aplica presión para seccionar el embudo, se cierra la cámara de cultivo y se incuba bajo las condiciones establecidas para cada medio de cultivo.

A continuación se detalla la composición de los medios de cultivo mencionados.

Caldo m-TGE

Ampollas de plástico de 2 ml
Triptona 10 g
Extracto de carne 6 g
Dextrosa 2 g
Agua destilada c.s.p. 1000 ml
pH: $7,0 \pm 0,2$
Incubar a 28-30 °C por 48-96 horas

Caldo m-GREEN

Ampollas de plástico de 2 ml
Peptona 1,0 g
Extracto de levadura 1,0 g
Dextrosa 3,0 g
Sulfato potásico 0,5 g
Sulfato de magnesio 0,5 g
Diastasa 0,1 g
Tiamina 0,1 g
Verde de bromocresol 0,05 g
Agua destilada c.s.p. 1000 ml
pH $4,6 \pm 0,2$
Incubar a 28-32 °C por 48-96 horas

3.1.2.4.4. Método aplicado a diferentes tapones de corcho

Se compararon las UFC/tapón de los microorganismos recuperados cuando se utilizaron tapones de corcho para vinos espumosos y tapones de corcho para vinos tranquilos.

Se colocaron 2 tapones control si eran para vinos espumosos y 4 tapones si eran para vinos tranquilos, en matraces que contenían 100 ml de solución Ringer _ estéril, se agitaron a 150 r.p.m. por 30 minutos, concluido este tiempo las soluciones se filtraron y los filtros fueron sembrados sobre SDA y TSA a 28 °C por 3-5 días y 37 °C por 24 horas respectivamente. Las UFC/tapón fueron calculadas según el apartado 3.1.2.3.

3.2. RECuento, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN MUESTRAS DE TAPONES DE CORCHO

3.2.1. Muestras de tapones de corcho

Fueron recolectadas en condiciones asépticas 12 muestras de tapones de corcho terminados y adicionados de un recubrimiento de silicona, en diferentes fábricas de tapones de corcho para vinos espumosos y vinos tranquilos de Catalunya, cada muestra estaba compuesta por 100 tapones de corcho, 6 muestras correspondían a tapones para vinos tranquilos y 6 muestras a tapones para vinos espumosos.

Las muestras fueron transportadas al laboratorio en forma aséptica para evitar el aumento de la microbiota ya existente.

3.2.2. Procesado de las muestras

Los tapones de corcho fueron colocados de forma aséptica en matraces que contenían 100 ml de Ringer _ o suero fisiológico estériles (2 en el caso de tapones para vinos espumosos y 4 si eran para vinos tranquilos), se agitaron a 150 r.p.m. por 30 minutos, las soluciones de lavado se filtraron al vacío y los filtros se sembraron sobre TSA, SDA, RBA y Agar Mc Conkey (para determinar la presencia de Enterobacterias), se

incubaron a 37 °C por 24 horas para el recuento bacterias y a 28 °C por 3-4 días para el recuento de hongos filamentosos y levaduras

Al cabo de este tiempo se procedió al recuento de las UFC en cada placa y los cálculos de las UFC/tapón se realizó como se indica en el punto 3.1.2.3.

3.2.3. Aislamiento de hongos filamentos, levaduras y bacterias

Se tomaron con asa bacteriológica estéril, colonias representativas de los microorganismos que crecieron sobre los filtros sembrados en los medios de cultivo antes mencionados y se resembraron en tubos de ensayo con los medios de cultivo TSA para el aislamiento de bacterias y SDA o AEM al 2% para el aislamiento de hongos filamentosos y levaduras, se incubaron a las temperaturas y tiempos ya establecidos, el procedimiento se repitió hasta obtener cultivos puros.

3.2.4. Identificación de los microorganismos aislados

3.2.4.1. Identificación de hongos filamentosos

La identificación de los hongos filamentosos se llevó a cabo a través de la observación de las características macroscópicas y microscópicas de los mismos, siguiendo las claves establecidas por Domsch *et al* en 1980, Samson *et al* en 1984 y Pitt y Hocking en 1985. En el caso de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, éstos se sembraron, además, sobre placas de Czapek con tres puntos de siembra equidistantes a fin de facilitar su identificación, la cual se realizó considerando las características descritas por Domsch *et al* en 1980, Pitt en 1985, Ramírez en 1982, Raper y Fennell en 1965, Raper y Thom en 1949 y Samson *et al* en 1984.

3.2.4.2. Identificación de levaduras

La identificación de las levaduras se efectuó mediante la observación de las características macroscópicas de las colonias sobre AEM o SDA (color, textura aspecto), y de las características microscópicas, tomando en cuenta los caracteres de

multiplicación vegetativa (formación de pseudomicelio o micelio verdadero) y las características de las células (forma, tipo de gemación de los blastoconidios).

Así mismo, se les aplicaron pruebas de asimilación de fuentes de carbono, mediante el sistema API 20 C AUX[®], el cual está compuesto de 20 cúpulas conteniendo substratos deshidratados de diferentes azúcares que permiten realizar 19 pruebas de asimilación (la cúpula 0 corresponde al control negativo). Las cúpulas fueron inoculadas con un medio semisólido que contenía 100 µl de suspensión de la levadura a probar con densidad óptica igual al tubo N° 2 de la escala de Mc Farland, las cámaras fueron incubadas por 24-72 horas a 30 °C. Las lecturas se realizan con la visualización del crecimiento de la levadura debido a su capacidad de utilizar el substrato correspondiente y la identificación del microorganismo, comparando los resultados obtenidos con la tabla de identificación.

Los azúcares ensayados por este método son: Glucosa, glicerol, 2-ceto-D-gluconato, L-arabinosa, D-xilosa, adonitol, xilitol, galactosa, inositol, sorbitol, α-metil-D-glucosida, celobiosa, lactosa, maltosa, sacarosa, trehalosa, melezitosa y rafinosa.

3.2.4.3. Identificación de bacterias

Las bacterias se identificaron tomando en cuenta sus características morfológicas y tintoriales, así mismo se les efectuaron las pruebas bioquímicas especificadas por Barrow y Feltham en 1993 y se compararon los resultados obtenidos con las tablas de identificación de los autores antes mencionados y con el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology editado por Holt en 1986.

Además, las Enterobacterias y otros bacilos Gram-negativos fueron identificados por el sistema API 20 E[®], el cual consta de 20 microtubos que contienen substratos deshidratados para las pruebas bioquímicas específicas para estos microorganismos. Las bacterias se inoculan con las suspensiones bacterianas y se incuban durante 18-24 horas a 35-37 °C, realizando la lectura de los resultados tras este período de incubación.

3.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

3.3.1. Suspensiones de microorganismos

Se realizaron suspensiones de conidios fúngicos y de levaduras en concentración de 10^6 células/ml en suero fisiológico estéril, a partir de cultivos puros en AEM con 7 días de incubación a 28 °C y suspensiones de bacterias de densidad óptica igual a los tubos 5-6 de la escala de Mc Farland, a partir de cultivos en TSA incubados por 24 horas a 37 °C.

3.3.2. Actividad enzimática

Se evaluó la actividad enzimática de los microorganismos mediante el sistema API ZYM[®], con el cual se pueden estudiar 19 actividades enzimáticas a través de 20 cúpulas preparadas con substratos enzimáticos tamponados.

Las enzimas investigadas por orden numérico se detallan a continuación:

- | | |
|-----------------------------|--|
| 1. Control negativo | 11. Fosfatasa ácida |
| 2. Fosfatasa alcalina | 12. Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa |
| 3. Esterasa (C1) | 13. α -galactosidasa |
| 4. Esterasa lipasa (C8) | 14. β -galactosidasa |
| 5. Lipasa (C14) | 15. β -glucosidasa |
| 6. Leucina arilamidasa | 16. α -glucosidasa |
| 7. Valina arilamidasa | 17. β -glucosidasa |
| 8. Cistina arilamidasa | 18. N-acetil- β -glucosaminidasa |
| 9. Tripsina | 19. α -manosidasa |
| 10. α -quimotripsina | 20. α -flucosidasa |

Se añadieron 65 µl de las suspensiones celulares en cada cúpula, se incubaron las galerías a 37 °C para las bacterias y a 28 °C para los hongos filamentosos, durante 4 horas. Al finalizar este tiempo, se añadió una gota del reactivo API ZYM A y una gota del reactivo API ZYM B en cada cúpula.

La lectura de los resultados se efectúa de acuerdo a la intensidad del color de la reacción. Los resultados pueden semicuantificarse, correspondiendo 0 a una reacción negativa, 1 a la formación de 5 nanomoles, 2 a 10 nanomoles, 3 a 20 nanomoles, 4 a 30 nanomoles y 5 a 40 o más nanomoles.

3.4. ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

3.4.1. Método de los discos

Se realizaron cultivos de las especies de hongos filamentosos y levaduras en placas de AEM, por 3-5 días a 28 °C y cultivos de suspensiones bacterianas con densidad óptica igual al tubo N°1 de la escala de Mc Farland en placas de TSA, por 24 horas a 37 °C.

Culminado este tiempo, se cortaron discos de 6 mm de diámetro de estos cultivos que fueron colocados sobre placas de petri de AEM o TSA a los cuales, previamente, se les había sembrado por superficie con asa de Digraslky, suspensiones celulares en concentración de 10^6 células/ml de todos los microorganismos.

Se colocaron dos discos de cada microorganismo, uno haciendo contacto por la zona del desarrollo microbiano y otro haciendo contacto por la zona del medio de cultivo, con la finalidad de probar la actividad inhibitoria del microorganismo, en cada placa también se colocaron discos que sólo contenían medio de cultivo. Simultáneamente, se sembraron placas control que poseían sólo las suspensiones de los microorganismos, con el fin de comprobar su viabilidad.

Las placas fueron incubadas, proporcionando las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos sembrados por superficie, es decir, a 28 °C por 3-5 días si se trataba de hongos filamentosos y levaduras y a 37 °C por 24 horas si se trataba

de bacterias. Al finalizar este tiempo, se midieron los halos inhibitorios producidos, de la siguiente manera: Se midieron los diámetros de los halos inhibitorios totales, se restaron a éstos los diámetros de los discos y el resultado se dividió entre dos. Los resultados se expresaron en milímetros (mm).

Estas pruebas también se realizaron con hongos filamentosos que son frecuentemente aislados de tapones de corcho para vinos, pero que no fueron encontrados en las muestras analizadas. Estos fueron: *Aspergillus flavus* (FVB 3), *Penicillium frequentans* (FVB 4), *Rhizopus arrhizus* (FVB 10), *Paecilomyces variotii* (FVB 6) y *Acremonium strictum* (FVB 7), pertenecientes a la colección de cultivos de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

3.4.2. Cromatografía en capa fina

Se realizaron cromatografías en capa fina a partir de cultivos puros de los hongos filamentosos con mayor actividad inhibitoria.

Para ello, se utilizaron cromatofolios de silica gel Merck® (Ref: 1.0553), previamente activados a 105 °C durante 90 minutos. En los cromatofolios activados se colocaron durante 1 minuto, los discos de los microorganismos estudiados, por sus dos caras, acompañados de discos control (sólo medio de cultivo), a una distancia de 1 cm del borde inferior de la cromatoplaca. Se secaron las huellas con secador automático.

Los cromatofolios se introdujeron en una cubeta de vidrio saturada con una mezcla de reactivos. Se ensayaron mezclas con las siguientes composiciones:

Cloroformo/Acetato de etilo/Acido acético glacial (6:3:1),

Benceno/Metanol/Acido acético glacial (24:2:1), (98:8:4) y (12:1:0,5)

Cloroformo/Metanol (98:2).

Los cromatofolios fueron retirados de la cubeta a los 90 minutos o cuando el frente del solvente llegaba a los 4 cm del borde superior de las cromatoplasmas, éstos fueron secados mecánicamente.

La lectura de los cromatofolios se realizó observando las huellas cromatográficas de los discos de microorganismos bajo luz ultravioleta con longitudes de onda de 254 y 365 nanómetros.

Posteriormente, se realizaron cromatografías de los microorganismos que revelaron huellas cromatográficas bien definidas, éstas fueron separadas, repitiendo numerosas veces los discos de cada microorganismo en cada cromatofolio, los cuales fueron introducidos en cubeta de vidrio con una mezcla de Benceno/Metanol/Acido acético glacial en proporción 96:6:2, a excepción de *Fusarium moniliforme* para el cual se utilizó una mezcla de Cloroformo/Acetato de etilo/Acido acético glacial en proporción 60:30:10, las condiciones de tiempo fueron iguales a las ya descritas, las bandas se recuperaron y se depositaron en tubos de centrífuga que contenían los solventes mencionados, se centrifugaron por 5 minutos a 10000 r.p.m. El sobrenadante resultante, fue separado del sedimento y colocado en otro tubo de centrífuga.

Se cortaron discos de papel de filtro de 0,5 cm de diámetro, los cuales se esterilizaron en autoclave a 121 °C por 20 minutos. Estos discos se impregnaron con los extractos de los microorganismos que habían sido separados y fueron depositados en placas que contenían los microorganismos, sembrados por agotamiento en superficie, contra los cuales habían presentado actividad inhibitoria. Se incubaron a 28 °C durante por 48 horas si se trataba de hongos filamentosos y levaduras y a 37 °C por 24 horas si se trataba de bacterias. Finalmente se midieron los halos inhibitorios, de la forma antes descrita.

3.5. METABOLISMO SECUNDARIO DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

3.5.1. Producción de Micotoxinas

Se escogieron entre los hongos filamentosos aislados aquellos que según la bibliografía, en su metabolismo secundario son capaces de producir micotoxinas. Estos fueron: *Alternaria alternata*, *Penicillium citrinum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*.

Se realizaron cultivos en placas de Petri de los microorganismos antes mencionados, durante 7 días a 28 °C, de los cuales se extrajeron discos de 6 mm de diámetro, los

discos fueron colocados sobre cromatofolios activados contactando con éstos sólo su cara de medio de cultivo, a 2 cm del borde inferior del cromatofolio, durante un minuto.

De igual forma se colocaron al lado de cada disco 10 µl de los controles de las micotoxinas específicas para cada microorganismo. Las micotoxinas ensayadas fueron:

- Acido tenuazoico (TA),
- Tentoxina (TEN),
- Alternariol (AOH),
- Altenueno (ALT),
- Alvertoxina I (ATX-I)
- Alternariol monometil éter (AME)

Descritas como elaboradas y acumuladas por *Alternaria alternata*.

- Citrinina. Descrita como elaborada y acumulada por *Penicillium citrinum*.
- Fumonisina B₁. Descrita como elaborada y acumulada por *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*.

Se prepararon controles de las micotoxinas de *Alternaria alternata* a las concentraciones de 30 ng/10 µl de alcohol etílico para alternariol, alternariol monometil éter, altenueno y alvertoxina y de 50 ng/10 µl de alcohol etílico para ácido tenuazoico y tentoxina. Los controles de las micotoxinas de *Penicillium citrinum*, y de las especies de *Fusarium* estudiadas (citrinina y Fumonisina B₁ respectivamente) fueron preparados a una concentración de 25 µg/ml de cloroformo, los controles utilizados fueron:

- Acido tenuazoico (Sigma[®], Ref. 3408)
- Tentoxina (Sigma[®], Ref. T8099)
- Alternariol (Sigma[®], Ref. A1312)
- Altenueno (Sigma[®], Ref. A4437)
- Alvertoxina I (Sigma[®], Ref. A1437)
- Alternariol monometil éter (Sigma[®], Ref. A3171)

- Citrinina (Sigma[®], Ref. C2513)
- Fumonisina B₁ (Sigma[®], Ref. F1147)

La cromatografía se llevó a cabo en una mezcla de Benceno/Metanol/Acido acético glacial en proporción 96:6:2 para *Alternaria alternata*, siguiendo la metodología utilizada por Fábrega *et al* 2000 y una mezcla Cloroformo/Metanol 50:50 para *Penicillium citrinum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*, como modificaciones de los métodos descritos por Montani *et al* en 1988 para la detección de citrinina y por Voss *et al* en 1990 para la detección de fumonisina B₁. Los cromatofolios fueron secados y su posterior lectura se realizó de la forma antes descrita.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron estadísticamente por medio del análisis de varianza de un factor (ANOVA) y las variaciones significativas entre los grupos estudiados fueron determinadas mediante un análisis *post-hoc* de Student-Newman-Keuls. Los cálculos se realizaron mediante el programa SPSS 6.1.2.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS TAPONES DE CORCHO

Los resultados de la evaluación de las metodologías utilizadas para el control microbiológico de tapones de corcho para vinos, se especifican en los resultados obtenidos en la preparación de tapones control y en los resultados obtenidos en la evaluación de diferentes metodologías de control microbiológico de estos productos utilizando los tapones control preparados.

4.1.1. PREPARACIÓN DE LOS TAPONES CONTROL

Los resultados obtenidos después de aplicar los diferentes métodos de inoculación experimental, con diferentes suspensiones de microorganismos a diferentes concentraciones y tiempos de incubación, se especifican a continuación.

4.1.1.1. Inoculación de tapones control por aerosol

El recuento de los microorganismos recuperados al aplicar las diferentes mezclas de éstos por el método de aerosol, fue menor de diez (10) en la primera dilución de todas las concentraciones de inóculos utilizadas.

4.1.1.2. Inoculación de tapones control por inmersión

El método de contaminación de los tapones por inmersión, proporcionó resultados que variaron según el tipo, tiempo de aplicación y concentración del inóculo.

En la Figura 3, se muestra la relación existente entre el tiempo de inoculación y el recuento de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) en los tapones de corcho y las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro del líquido decantado (UFC/ml del líquido decantado), cuando el inóculo estaba formado por una mezcla de *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* y de *Penicillium frequentans* (1:1:1:1), a concentración de 10^7 UFC/ml.

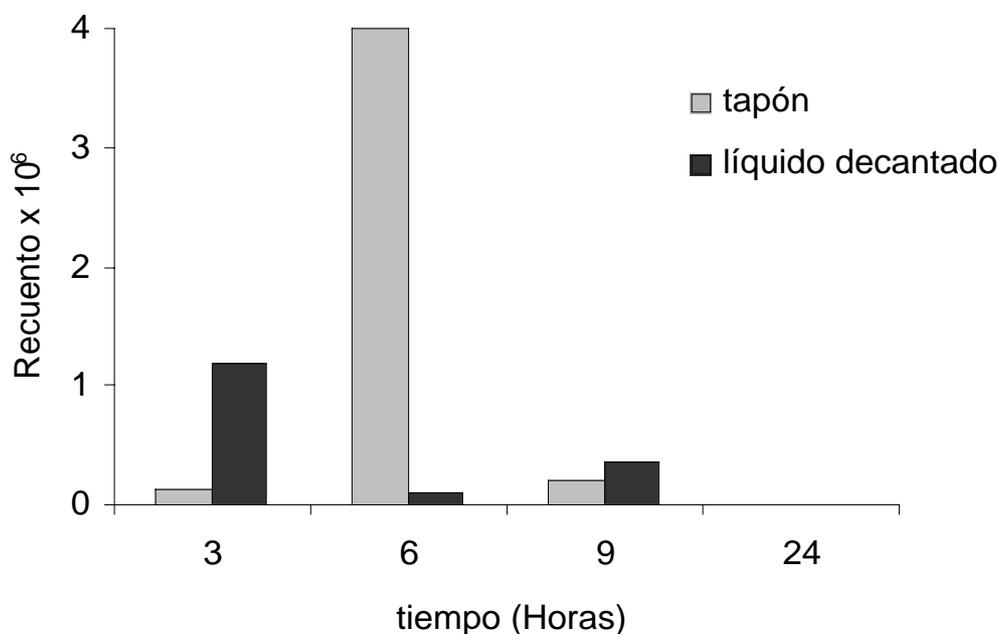


Figura 3. Recuento de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) y de las Unidades Formadoras de Colonia por ml del líquido decantado (UFC/ml del líquido decantado) de *Aspergillus* y de *Penicillium* en función del tiempo de incubación

En la Tabla 7, se indican los porcentajes de recuperación de estos microorganismos en la mezcla antes mencionada, tanto en los tapones como en el líquido decantado en función del tiempo de incubación.

Tabla 7. Porcentaje de recuperación en la mezcla de concentración 10^7 UFC/ml de *Aspergillus* y de *Penicillium* en líquido decantado y en los tapones en función del tiempo de incubación.

Tiempo (Horas)	Porcentaje de Recuperación (%)	
	Líquido decantado	Tapón
3	10,0	0,6
6	0,9	35,8
9	5,4	0,3
24	0,2	0,0

El recuento de las UFC/tapón y las UFC/ml del líquido decantado de todas las especies de microorganismos aplicados a una concentración de 10^7 UFC/ml, en función del tiempo de incubación, se indica en la Figura 4.

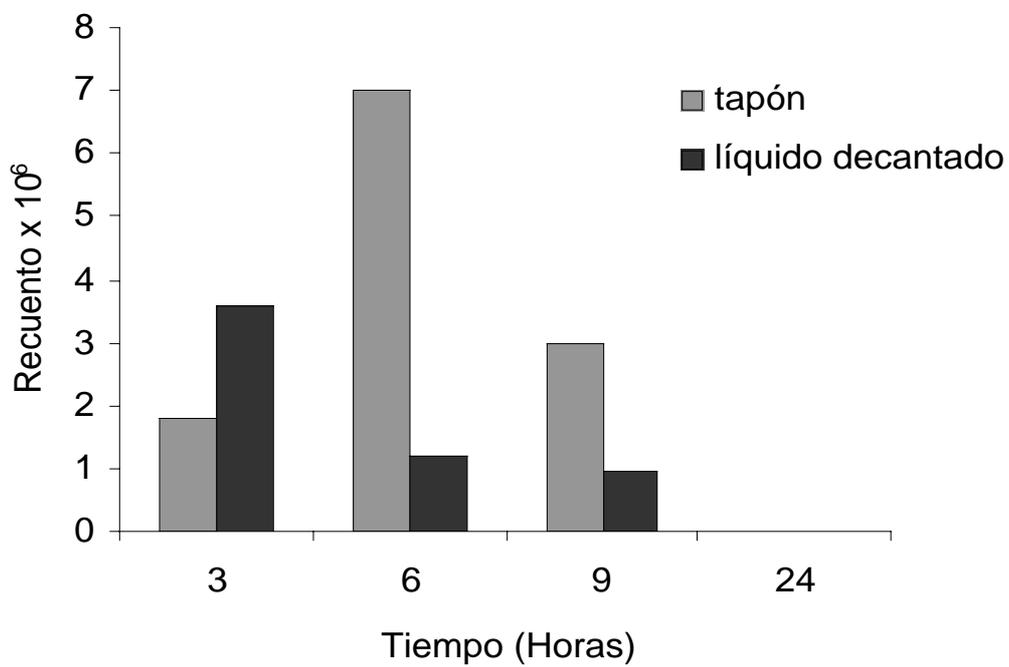


Figura 4. Recuento de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) y de las Unidades Formadoras de Colonia por ml del líquido decantado (UFC/ml del líquido decantado) de los microorganismos en función del tiempo de incubación

En la Tabla 8, se señalan los porcentajes de recuperación de todas las especies de microorganismos tanto en el líquido decantado como en los tapones de corcho en función del tiempo de incubación, cuando se aplicaron las mezclas a una concentración de 10^7 UFC/ml.

Tabla 8. Porcentaje de recuperación de todas las especies de microorganismos en el líquido decantado y en los tapones en función del tiempo de incubación.

Tiempo (Horas)	Porcentaje de Recuperación (%)	
	Líquido decantado	Tapón
3	22,5	10,9
6	7,5	44,9
9	58,7	19,2
24	0,0	0,0

Los porcentajes de recuperación de hongos filamentosos, levaduras y bacterias aplicados por inmersión durante seis (6) horas de incubación, se indican en la Tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje de recuperación de hongos filamentosos, levaduras y bacterias a las seis (6) horas de inoculación partiendo de una concentración inicial de 10^7 UFC/ml.

Microorganismo	Porcentaje de Recuperación (%)
Hongos filamentosos	41,7
Levaduras	1,9
Bacterias	0,7

En la Tabla 10, se muestra el porcentaje de recuperación individual de los microorganismos aplicados por inmersión a los tapones de corcho en un período de seis (6) horas de incubación. Cabe mencionar que *A. fumigatus* y *P. variotii* no fueron recuperados.

Tabla 10. Porcentaje de recuperación individual de los microorganismos a las seis (6) horas de inoculación, partiendo de una concentración inicial de 10^7 UFC/ml.

Microorganismo	Porcentaje de recuperación (%)
<i>Trichoderma viride</i>	14,4
<i>Aspergillus niger</i>	9,8
<i>Rhizopus arrhizus</i>	9,8
<i>Penicillium frequentans</i>	2,6
<i>Acremonium strictum</i>	2,6
<i>Aspergillus flavus</i>	2,6
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1,9
<i>Bacillus cereus</i>	0,7

El recuento de las UFC/tapón de la mezcla de *Aspergillus* y de *Penicillium* tras la inoculación de los tapones durante seis (6) horas con una suspensión de 10^9 UFC/ml de estos microorganismos, se representa en la Figura 5.

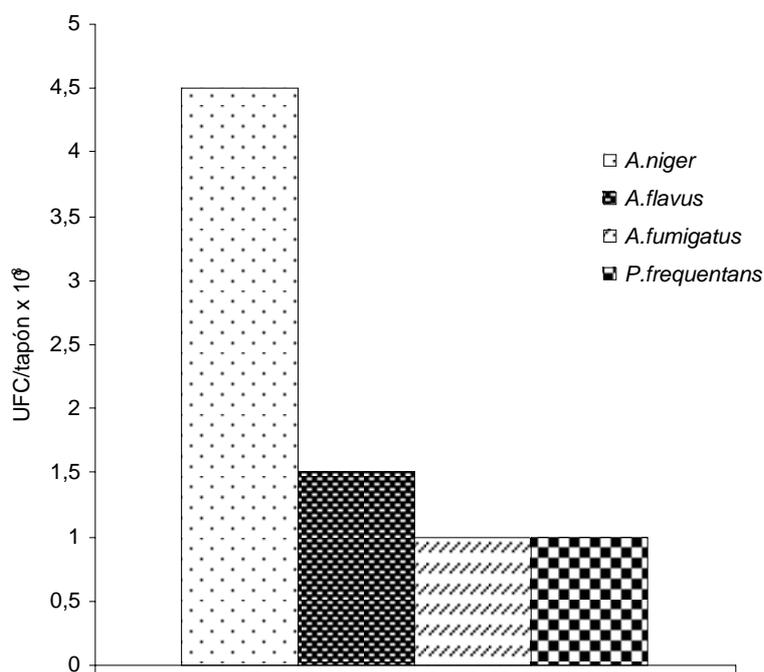


Figura 5. Recuento de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) en la mezcla de *Aspergillus* y de *Penicillium* en los tapones inoculados con una suspensión de 10^9 conidios/ml.

En la Figura 6, se señala el recuento de las UFC/tapón en la mezcla antes mencionada, cuando se aplicó un inóculo de 10^5 UFC/ml.

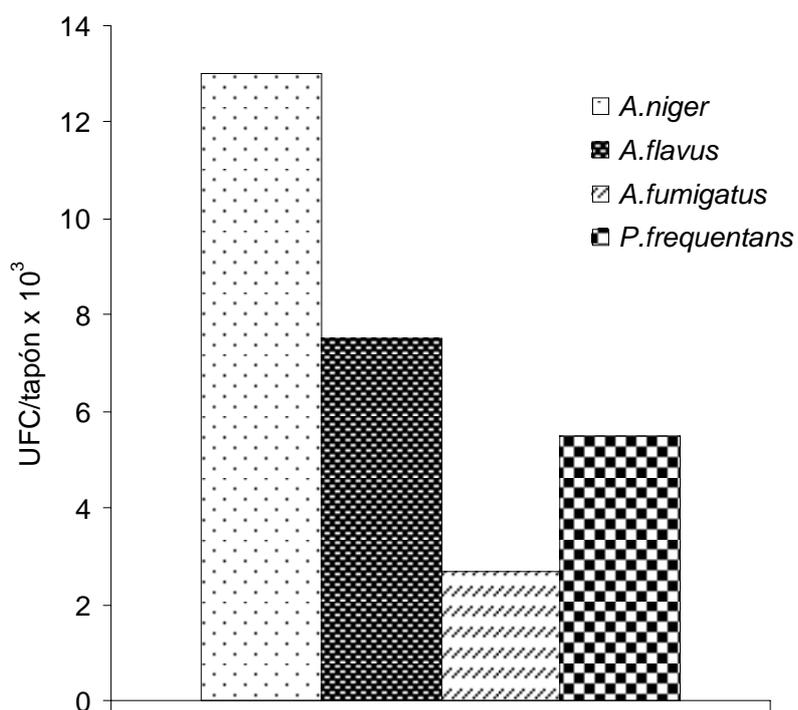


Figura 6. Recuento de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) en la mezcla de *Aspergillus* y de *Penicillium* en los tapones inoculados con una suspensión de 10^5 conidios/ml

En la tabla 11, se indican los porcentajes de recuperación de la mezcla de *Aspergillus* y de *Penicillium* en los tapones inoculados durante seis (6) horas con suspensiones de 10^9 o de 10^5 UFC/ml.

Tabla 11. Porcentaje de recuperación en la mezcla de *Aspergillus* y de *Penicillium* en los tapones inoculados con suspensiones de 10^9 o de 10^5 UFC/ml

Microorganismo	Porcentaje de Recuperación (%)	
	Inóculo 10^9 conidios/ml	Inóculo 10^5 conidios/ml
<i>Aspergillus niger</i>	19,7	7,2
<i>A. flavus</i>	6,5	4,1
<i>A. fumigatus</i>	4,3	1,4
<i>Penicillium frequentans</i>	4,3	2,8

En la Figura 7, están representados los resultados obtenidos en el recuento de las UFC/tapón de todas las especies de microorganismos cuando éstos fueron inoculados durante seis (6) horas con una suspensión de 10^9 UFC/ml.

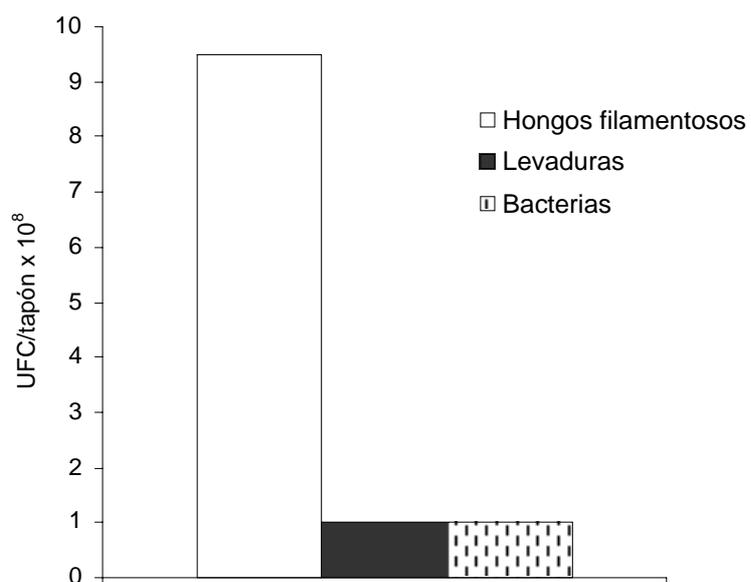


Figura 7. Recuento de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) de todas las especies de microorganismos en los tapones inoculados con una suspensión de 10^9 células/ml.

El recuento de las UFC/tapón de todas las especies de microorganismos inoculados en suspensiones de 10^5 UFC/ml, se muestra en la Figura 8.

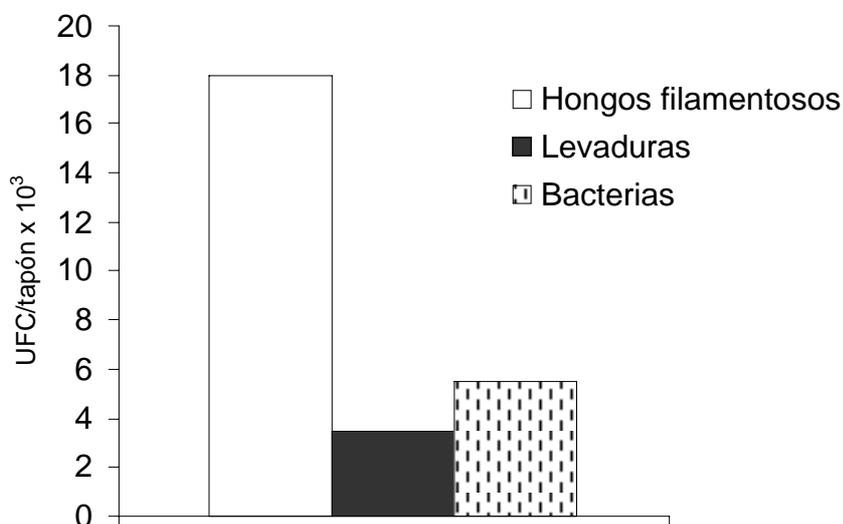


Figura 8. Recuento de las UFC/tapón de todas las especies de microorganismos en los tapones inoculados con una suspensión de 10^5 células/ml.

En la tabla 12 se señala el porcentaje de recuperación de los hongos filamentosos, levaduras y bacterias cuando se aplicaron las suspensiones a concentraciones de 10^9 o de 10^5 UFC/ml.

Tabla 12. Porcentaje de recuperación de todos los microorganismos en los tapones inoculados con suspensiones de 10^9 o de 10^5 células/ml

Microorganismos	Porcentaje de Recuperación (%)	
	Inóculo 10^9 células/ml	Inóculo 10^5 células/ml
Hongos filamentosos	39,6	8,9
Levaduras	4,1	1,8
Bacterias	4,1	5,0

4.1.1.3. Resultados del análisis estadístico en la preparación de los tapones de corcho control

Los resultados del análisis estadístico de los datos correspondientes a los recuentos de las UFC/tapón y UFC/ml del líquido decantado, tanto en las mezclas de *Aspergillus* y de *Penicillium* como en las mezclas de todos los microorganismos en función del tiempo de inoculación, de la concentración del inóculo y de los microorganismos recuperados, se detallan en las Tablas 13-19.

Tabla 13. p-valores para el ANOVA de los recuentos de las UFC/ml del líquido decantado de la mezcla de *Aspergillus* y de *Penicillium* inoculados a una concentración de 10^7 UFC/ml en función del tiempo de incubación.

		Tiempo de incubación (Horas)			
		3	6	9	24
3	.		**	**	**
6			.	NS	NS
9				.	NS
24					.

Significación: *p < 0.05, **p < 0,01, ***p < 0.001

NS: No significativo

Tabla 14. p-valores para el ANOVA de los recuentos de las UFC/ml del líquido decantado de todas las especies de microorganismos inoculados a una concentración de 10^7 UFC/ml en función del tiempo de incubación

Tiempo de incubación (Horas)				
	3	6	9	24
3	.	***	**	*
6		.	*	*
9			.	*
24				.

Significación: *p < 0.05, **p < 0,01, ***p < 0.001
 NS: No significativo

Tabla 15. p-valores para el ANOVA de los recuentos de UFC/tapón de *Aspergillus* y de *Penicillium* inoculados a una concentración de 10^7 UFC/ml en función del tiempo de incubación

Tiempo de incubación (Horas)				
	3	6	9	24
3	.	**	**	*
6		.	***	*
9			.	*
24				.

Significación: *p < 0.05, **p < 0,01, ***p < 0.001
 NS: No significativo

Tabla 16. p-valores para el ANOVA de los recuentos de UFC/tapón de todas las especies de microorganismos inoculados a una concentración de 10^7 UFC/ml en función del tiempo de incubación

	Tiempo de incubación (Horas)			
	3	6	9	24
3	.	***	**	*
6	.	.	**	*
9	.	.	.	*
24

Significación: *p < 0.05, **p < 0,01, ***p < 0.001

NS: No significativo

Tabla 17. p-valores para el ANOVA de los recuentos de las UFC/tapón de *Aspergillus* y de *Penicillium* inoculados a una concentración de 10^9 UFC/ml a las 6 horas de incubación

	Microorganismos			
	1	2	3	4
1	.	**	***	**
2	.	.	NS	NS
3	.	.	.	NS
4

Significación: *p < 0.05, **p < 0,01, ***p < 0.001

NS: No significativo

1: *Aspergillus niger* 2: *Aspergillus flavus* 3: *Aspergillus fumigatus* 4: *Penicillium frequentans*

Tabla 18. p-valores para el ANOVA de los recuentos de UFC/tapón de *Aspergillus* y de *Penicillium* inoculados a una concentración de 10^5 UFC/ml a las 6 horas de incubación

Microorganismos				
	1	2	3	4
1	.	*	***	**
2		.	**	NS
3			.	NS
4				.

Significación: *p < 0.05, **p < 0,01, ***p < 0.001

NS: No significativo

1: *Aspergillus niger* 2: *Aspergillus flavus* 3: *Aspergillus fumigatus* 4: *Penicillium frequentans*

Tabla 19. p-valores para el ANOVA de los recuentos de las UFC/tapón de Hongos filamentosos, levaduras y bacterias inoculados a concentraciones de 10^9 o de 10^5 UFC/ml a las 6 horas de incubación.

Microorganismos			
	1	2	3
1	.	**	**
2		.	NS
3			.

Significación: *p < 0.05, **p < 0,01, ***p < 0.001

NS: No significativo

1: Hongos filamentosos 2: Levaduras 3: Bacterias

4.1.2. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS UTILIZADAS

4.1.2.1. ENSAYOS REALIZADOS PARA EVALUAR EL MÉTODO DE REFERENCIA

Los recuentos de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) y el porcentaje de recuperación individual de los microorganismos que formaban las mezclas con las cuales se prepararon previamente los tapones de corcho control se detallan a continuación.

Cabe destacar que los porcentajes de recuperación individual de los microorganismos no superaron en ningún caso el 10 %.

4.1.2.1.1. Prueba de las soluciones de lavado

Los resultados obtenidos después de ensayar Suero fisiológico estéril o Solución Ringer _ estéril como soluciones de lavado de los tapones de corcho control, se resumen en la Figura 9.

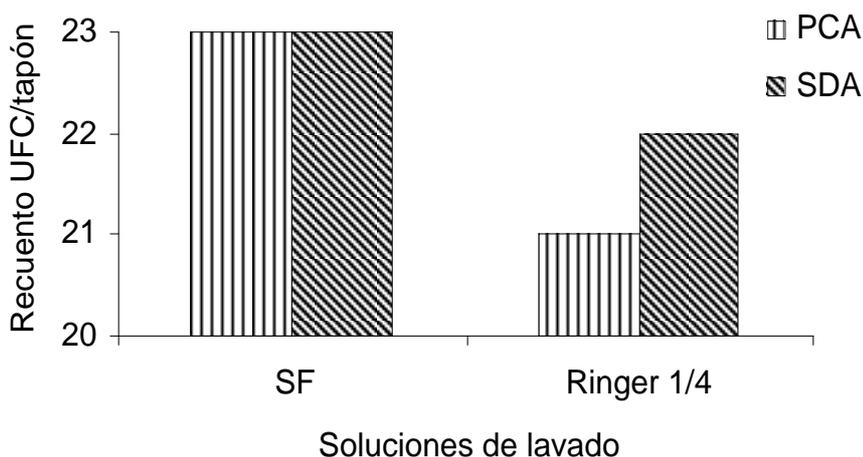


Figura 9. Recuento de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) en los medios de cultivo PCA y SDA en función de la solución de lavado

PCA: Plate Count Agar SDA: Sabouraud Dextrosa Agar SF: Suero Fisiológico

En las Figuras 10 y 11, se representa el porcentaje de recuperación de todos los microorganismos previamente inoculados a los tapones de corcho, cuando se utilizó Suero fisiológico estéril o Solución Ringer _ estéril como solución de lavado, respectivamente.

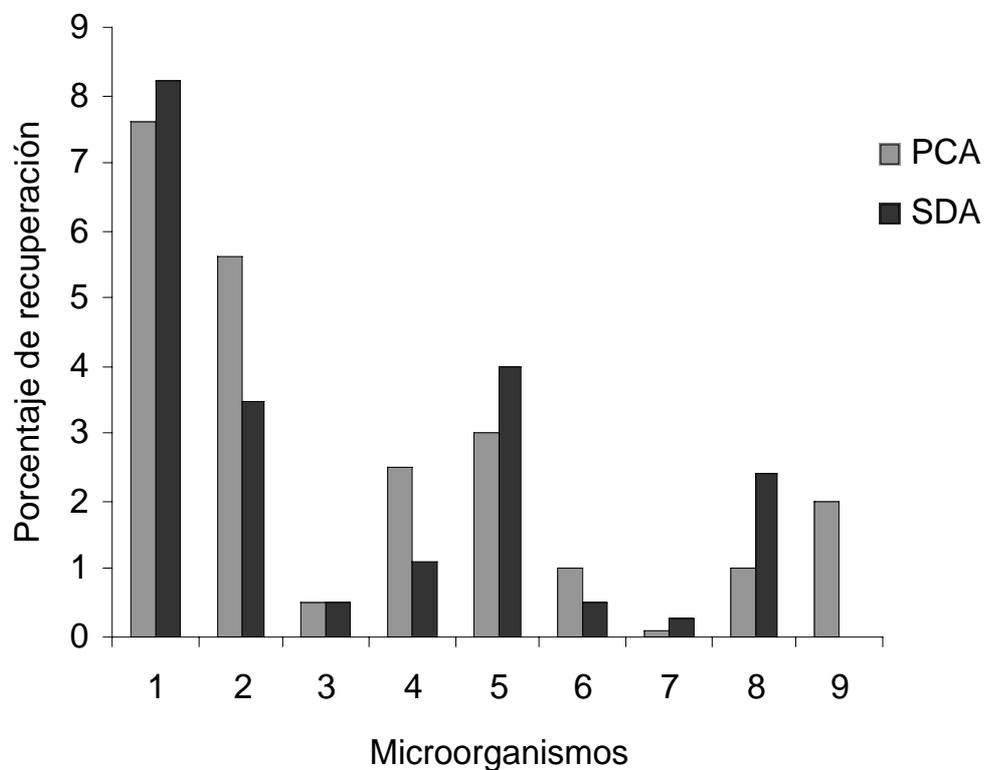


Figura 10. Porcentaje de recuperación, en PCA y SDA, de todos los microorganismos en función de Suero fisiológico como solución de lavado

PCA: Plate Count Agar SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

1: *Aspergillus niger* 2: *Aspergillus flavus* 3: *Aspergillus fumigatus* 4: *Penicillium frequentans*
 5: *Trichoderma viride* 6: *Paecilomyces variotii* 7: *Acremonium strictum* 8: *Rhodotorula glutinis*
 9: *Bacillus cereus*

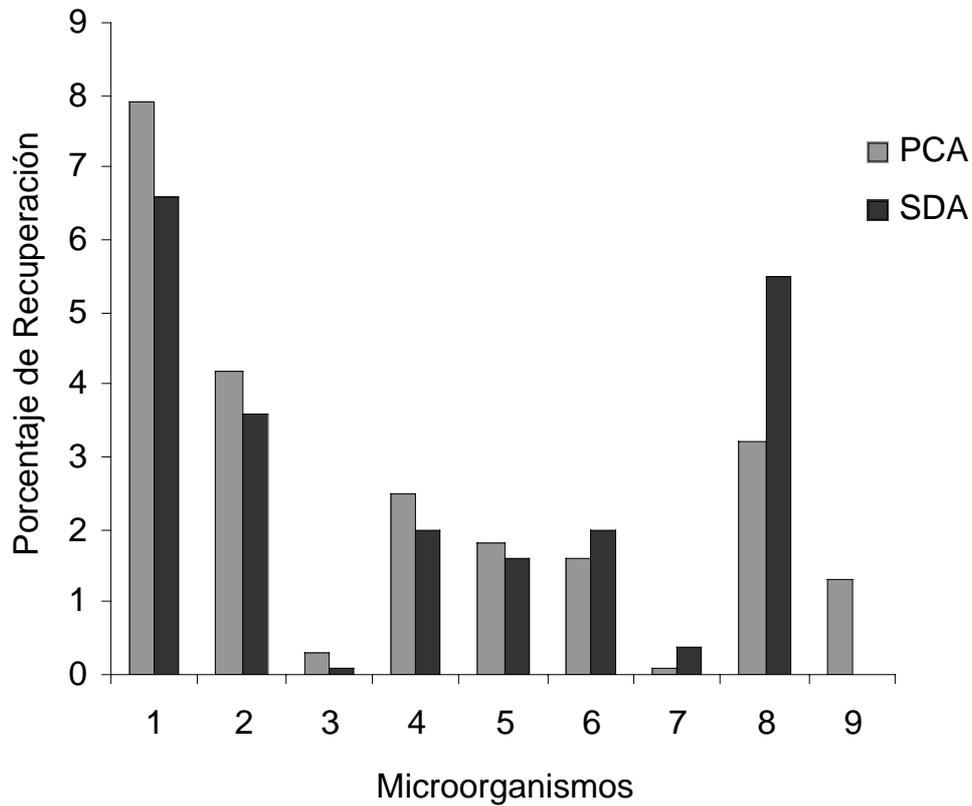


Figura 11. Porcentaje de recuperación, en PCA y SDA, de todos los microorganismos, en función de Ringer _ como solución de lavado

PCA: Plate Count Agar SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

1: *Aspergillus niger* 2: *Aspergillus flavus* 3: *Aspergillus fumigatus*
 4: *Penicillium frequentans* 5: *Trichoderma viride* 6: *Paecilomyces variotii*
 7: *Acremonium strictum* 8: *Rhodotorula glutinis* 9: *Bacillus cereus*

4.1.2.1.2. Prueba de la velocidad de lavado

Los resultados obtenidos después de ensayar las diferentes velocidades de lavado (100, 150 y 200 r.p.m), se señalan en la Figura 12.

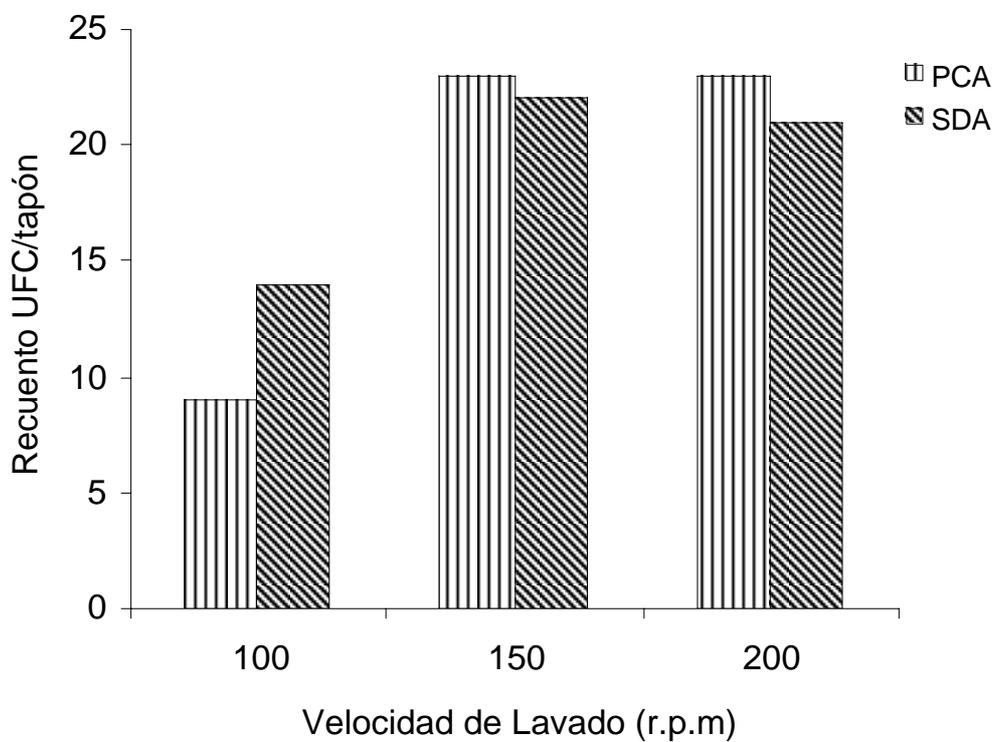


Figura 12. Recuento de las Unidades Formadoras de Colonia/tapón (UFC/tapón) de los microorganismos, en los medios PCA y SDA, en función de la velocidad de lavado (r.p.m)

PCA: Plate Count Agar SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

Los porcentajes de recuperación, en PCA y SDA, de cada uno de los microorganismos inoculados a los tapones de corcho, en función de las diferentes velocidades de lavado, se indican en las Figuras 13 y 14 respectivamente.

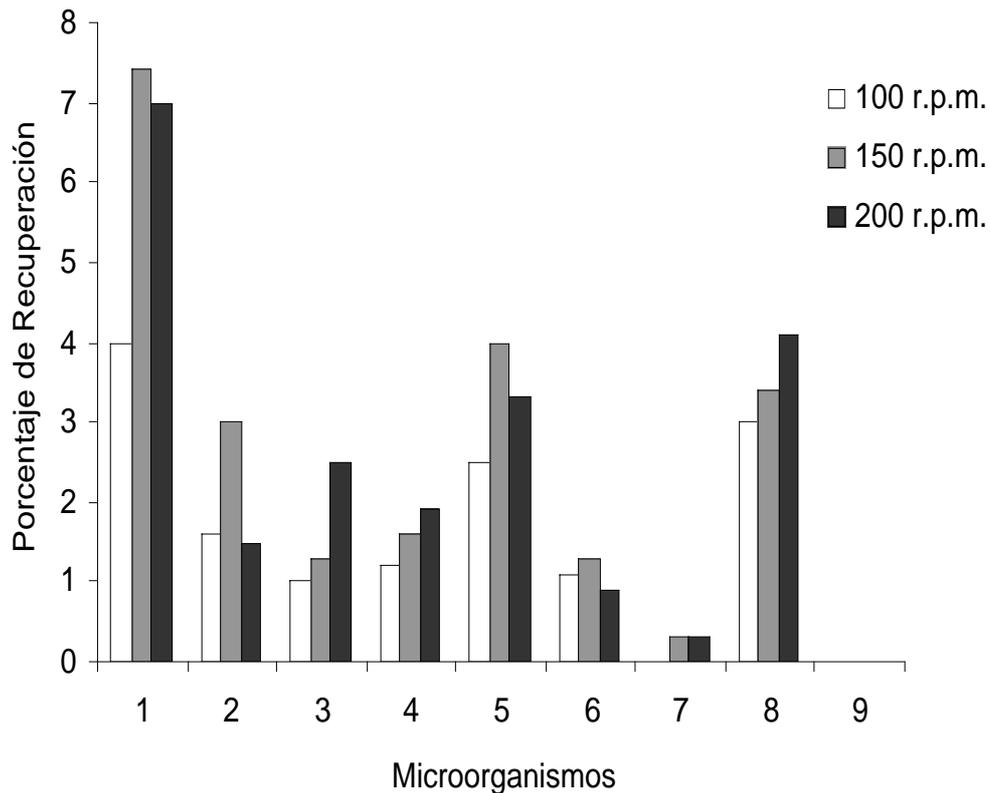


Figura 13. Porcentaje de recuperación individual de los microorganismos, en SDA, en función de la velocidad de lavado

SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

1: *Aspergillus niger* 2: *Aspergillus flavus* 3: *Aspergillus fumigatus*

4: *Penicillium frequentans* 5: *Trichoderma viride* 6: *Paecilomyces variotii*

7: *Acremonium strictum* 8: *Rhodotorula glutinis* 9: *Bacillus cereus*

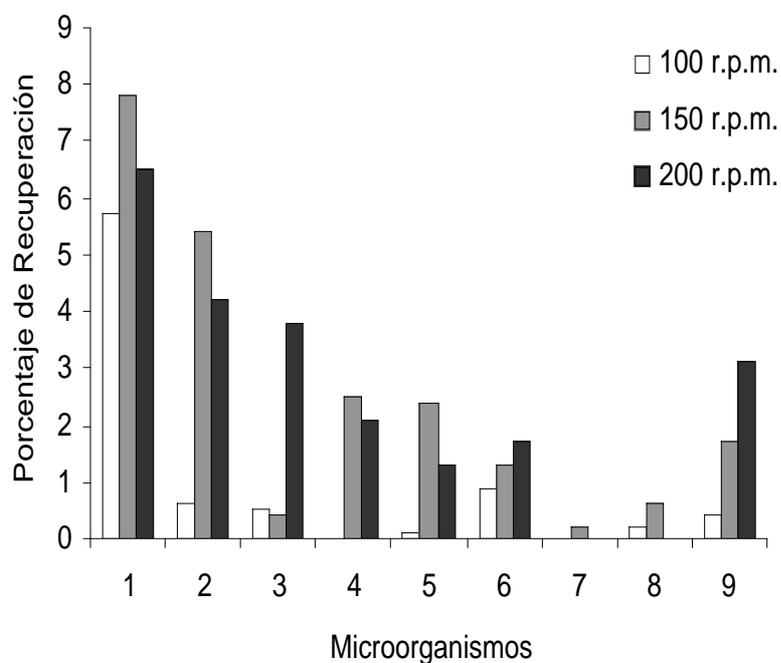


Figura 14. Porcentaje de recuperación individual de los microorganismos, en PCA, en función de la velocidad de lavado (100,150 y 200 r.p.m)

PCA: Sabouraud Dextrosa Agar

1: *Aspergillus niger* 2: *Aspergillus flavus* 3: *Aspergillus fumigatus*
 4: *Penicillium frequentans* 5: *Trichoderma viride* 6: *Paecilomyces variotii*
 7: *Acremonium strictum* 8: *Rhodotorula glutinis* 9: *Bacillus cereus*

4.1.2.1.3. Prueba del tiempo de lavado

Los recuentos de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) de los microorganismos, después de aplicar diferentes tiempos de lavado (5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos), se indican en la Figura 15.

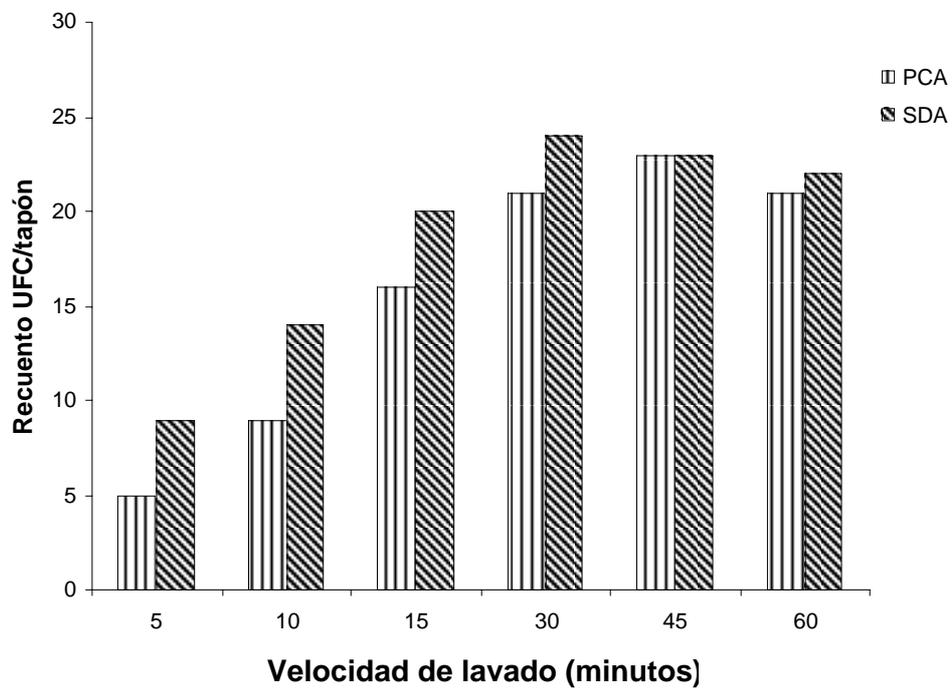


Figura 15. Recuento de las Unidades de Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón), en PCA y SDA, en función del tiempo de lavado

PCA: Plate Count Agar SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

En las Figuras 16 y 17, se resumen los porcentajes de recuperación de cada una de las especies de microorganismos inoculadas previamente a los tapones de corcho, en los medios de cultivo PCA y SDA respectivamente, en función del tiempo de lavado.

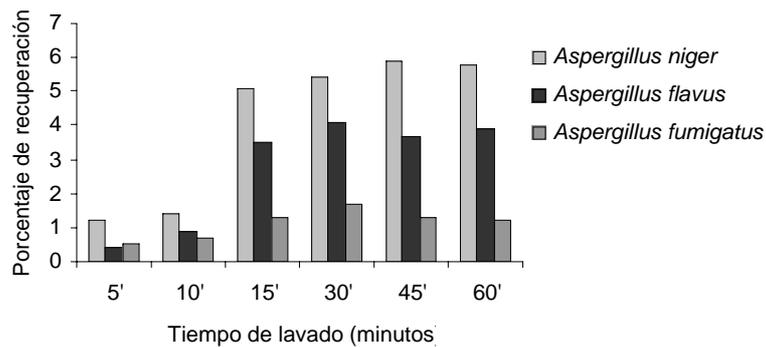
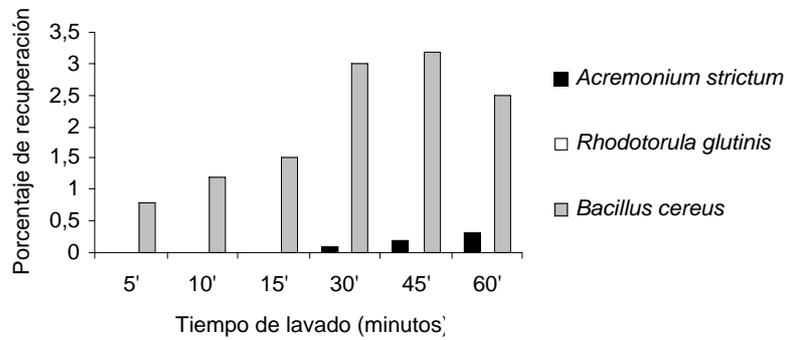
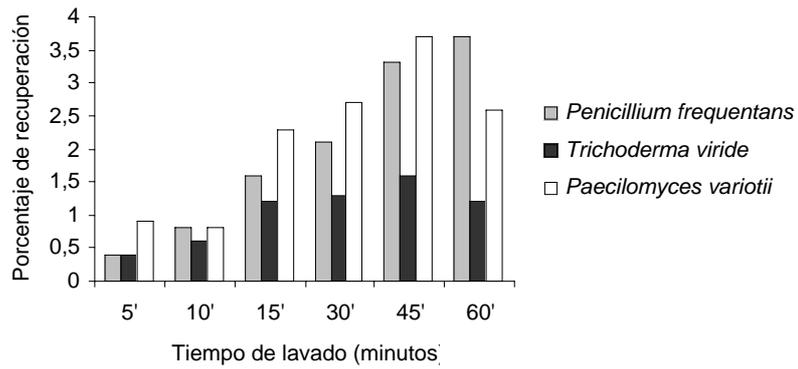


Figura 16. Porcentaje recuperación individual de los microorganismos, en PCA, en función del tiempo de lavado (5, 10, 15, 30, 45, 60 minutos)

PCA: Plate Count Agar

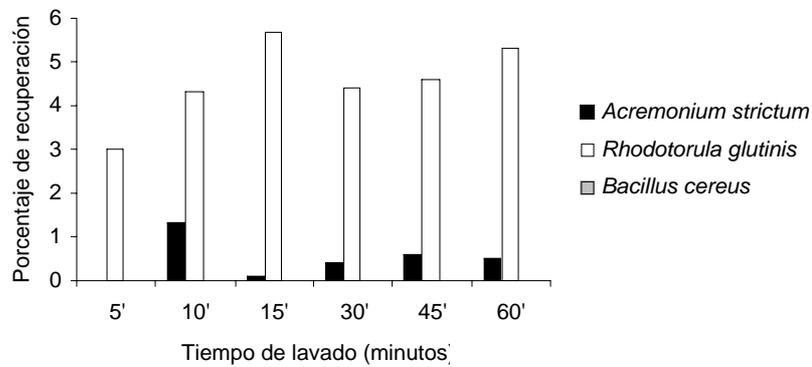
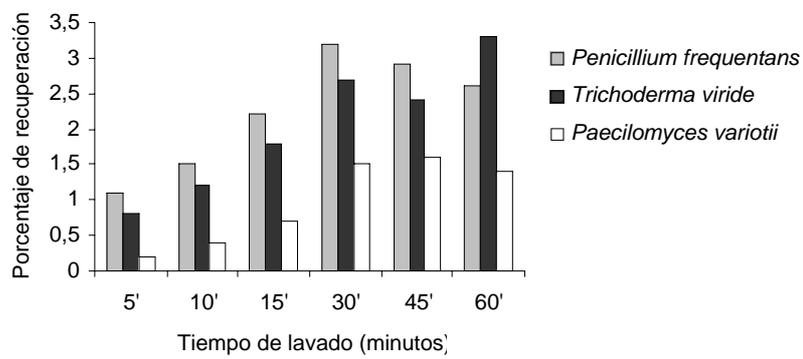
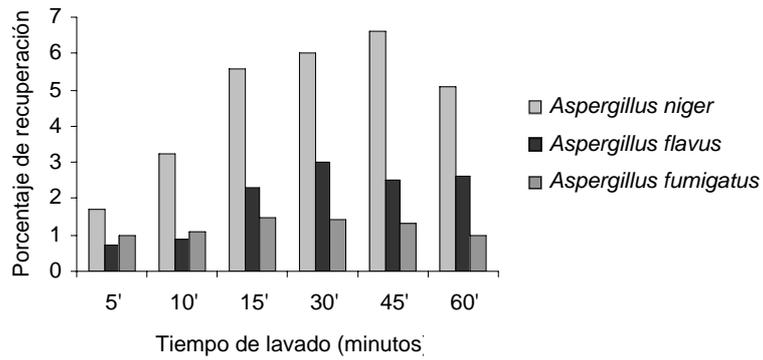


Figura 17. Porcentaje de recuperación individual de los microorganismos, en SDA, en función del tiempo de lavado (5, 10, 15, 30, 45, 60 minutos)

SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

4.1.2.1.4. Prueba de los medios de cultivo

Los recuentos de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón), tras la siembra de los filtros en los medios de cultivo Plate Count Agar (PCA), Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), WL Nutritivo Agar (WLN), Extracto de Malta Agar al 2 % (AEM) y Rosa de Bengala Agar (RBA), se muestran en la Figura 18.

En la tabla 20, se señalan los porcentajes de recuperación individual de los microorganismos inoculados a los tapones de corcho, en función de los diferentes medios de cultivo utilizados.

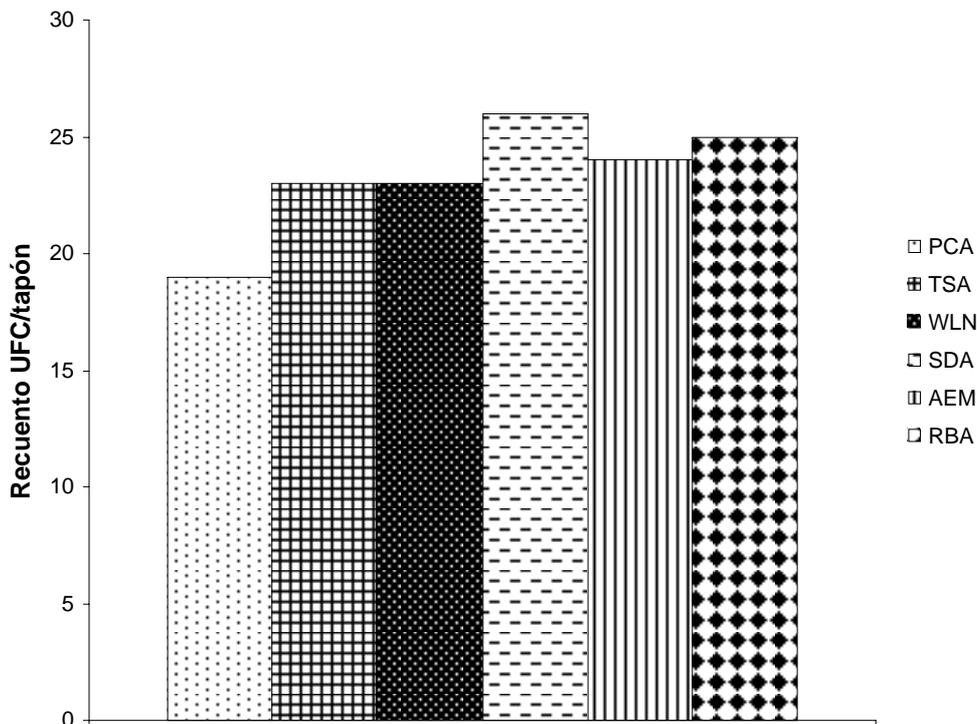


Figura 18. Recuento de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) de los microorganismos en función de los medios de cultivo utilizados

PCA: Plate Count Agar TSA: Triptona de Soja Agar WLN: WL nutritivo Agar

SDA: Sabouraud Dextrosa Agar AEM: Agar Extracto de Malta al 2% RBA: Rosa de Bengala Agar

Tabla 20. Porcentaje de recuperación individual de los microorganismos en función del medio de cultivo

Microorganismo	Porcentaje de Recuperación (%)					
	PCA	TSA	WLN	SDA	AEM	RBA
<i>Aspergillus niger</i>	6,0	6,9	7,6	6,9	7,0	7,2
<i>A. flavus</i>	2,3	2,1	2,7	2,6	2,0	2,6
<i>A. fumigatus</i>	4,6	3,1	0,9	2,1	2,3	2,1
<i>Penicillium frequentans</i>	1,1	1,1	2,4	3,4	2,0	1,7
<i>Trichoderma viride</i>	0,9	0,0	1,6	2,3	2,0	1,6
<i>Paecilomyces variotii</i>	2,6	0,6	1,3	1,1	1,8	2,4
<i>Acremonium strictum</i>	0,1	0,0	0,4	0,6	0,4	0,6
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0,0	0,0	6,0	6,6	6,1	6,9
<i>Bacillus cereus</i>	1,6	8,2	0,0	0,0	0,0	0,0

PCA: Plate Count Agar TSA: Triptona de Soja Agar WLN: WL nutritivo Agar SDA: Sabouraud Dextrosa Agar AEM: Agar Extracto de Malta al 2% RBA: Rosa de Bengala Agar

4.1.2.1.5. Prueba del tiempo de incubación

En la Figura 19, se indican los recuentos de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón), realizados en los cultivos de 24, 48, 72, 96 y 120 horas de incubación en los medios de cultivo TSA y SDA.

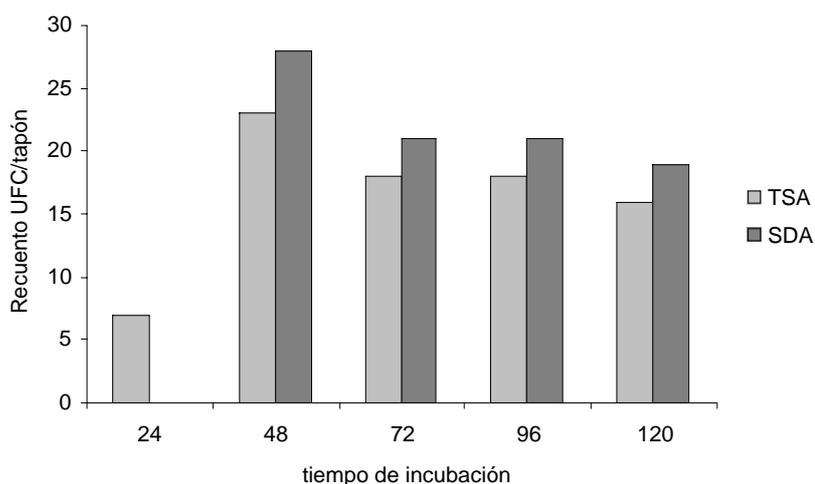


Figura 19. Recuento de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón), en función del tiempo de incubación (24, 48, 72, 96, 120 horas)

TSA: Triptona Soja Agar SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

Los porcentajes de recuperación individuales de los microorganismos, tras el cultivo de los filtros sobre TSA y SDA, en función del tiempo de incubación, se señalan en las Figuras 20 y 21.

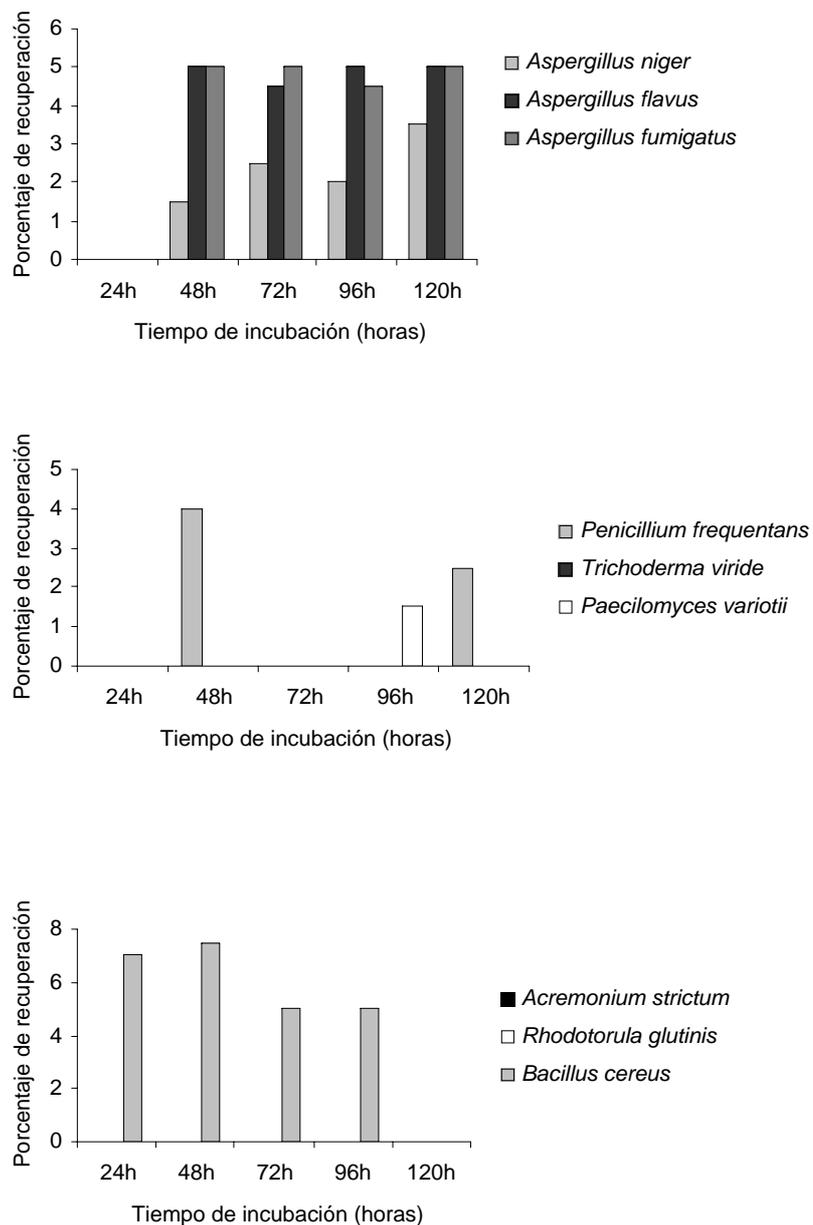


Figura 20. Porcentaje de recuperación individual de los microorganismos, en TSA, en función del tiempo de incubación (24, 48, 72, 96, 120 horas)

TSA: Triptona Soja Agar

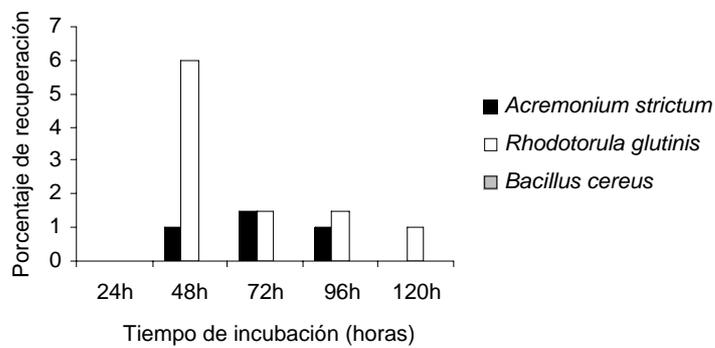
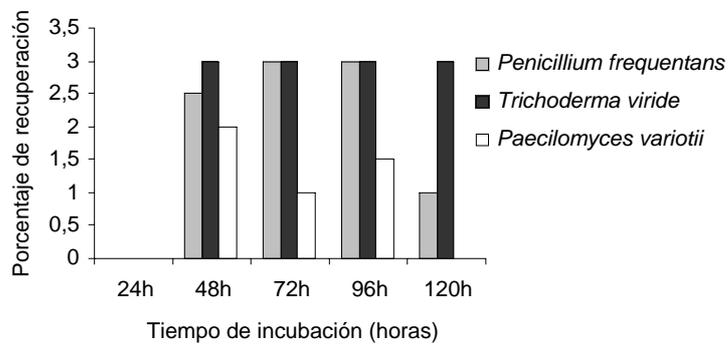
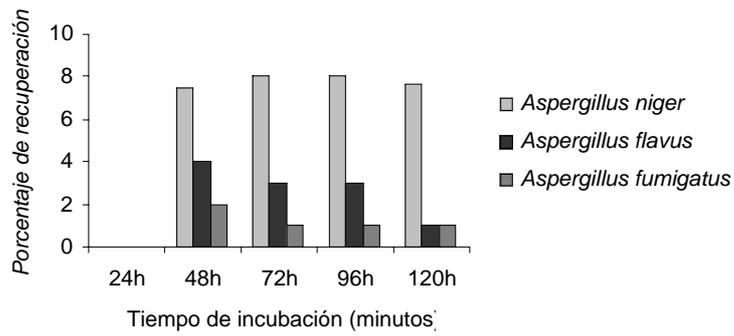
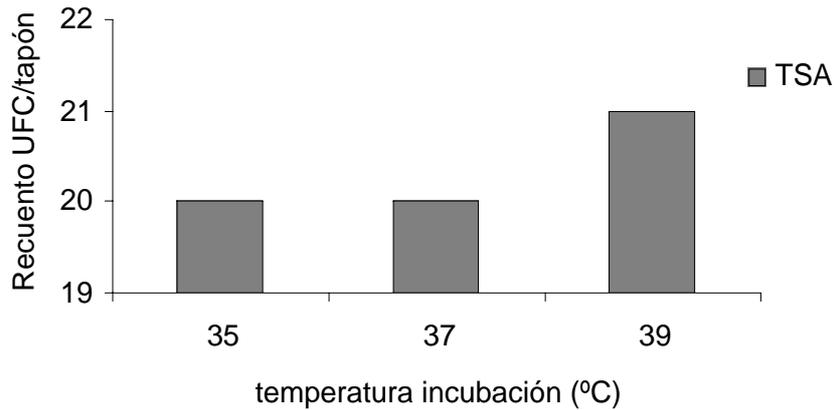


Figura 21. Porcentaje de recuperación individual de los microorganismos, en SDA, en función del tiempo de incubación (24, 48, 72, 96, 120 horas)

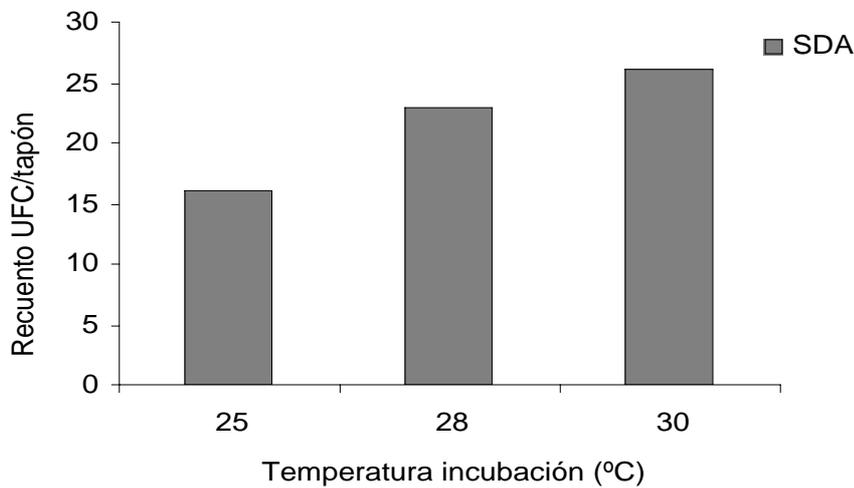
SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

4.1.2.1.6. Prueba de la temperatura de incubación

Los recuentos de las Unidades formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón), obtenidos después de la incubación a 35, 37 y 39 °C para la recuperación de bacterias y a 25, 28 y 30 °C para la recuperación de hongos filamentosos y levaduras, se muestran en la Figura 22.



a)



b)

Figura 22. Recuento de las Unidades formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) de los microorganismos en función de la temperatura de incubación

a) Recuento de bacterias b) Recuento de hongos filamentosos y levaduras

TSA: Triptona Soja Agar SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

En las Figuras 23 y 24, se muestran los porcentajes de recuperación individual de los microorganismos en TSA y SDA respectivamente, en función de la temperatura de incubación.

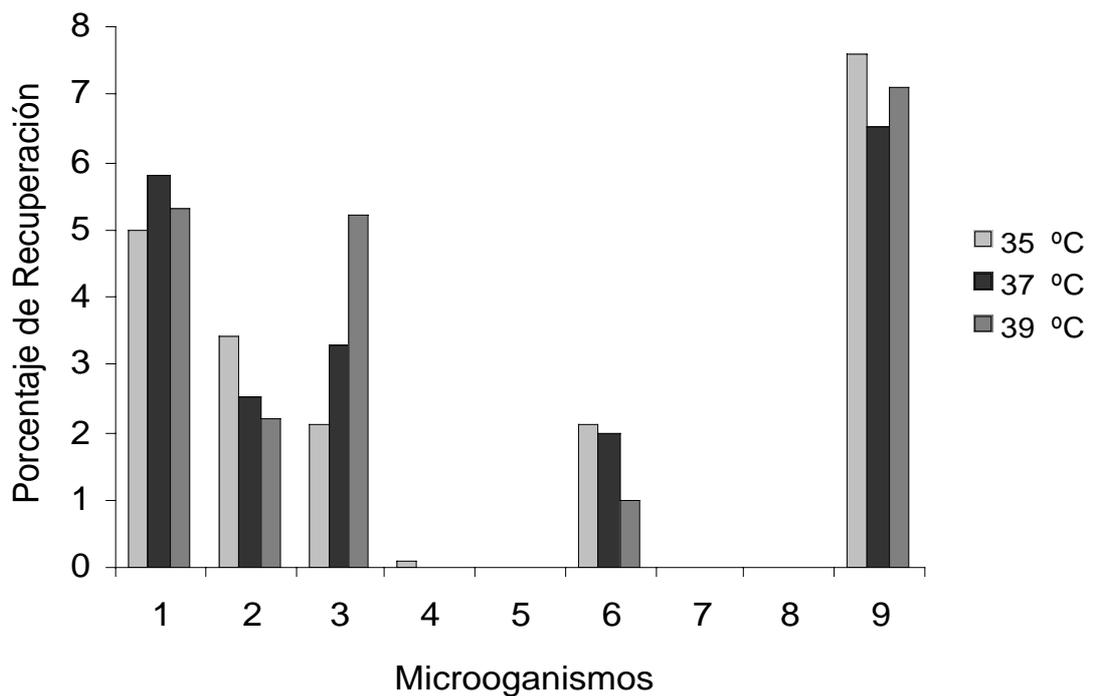


Figura 23. Porcentaje de recuperación individual de los microorganismos, en TSA, en función de la temperatura de incubación (35 °C, 37 °C, 39 °C)

TSA: Triptona Soja Agar

- 1: *Aspergillus niger* 2: *Aspergillus flavus* 3: *Aspergillus fumigatus*
 4: *Penicillium frequentans* 5: *Trichoderma viride* 6: *Paecilomyces variotii*
 7: *Acremonium strictum* 8: *Rhodotorula glutinis* 9: *Bacillus cereus*

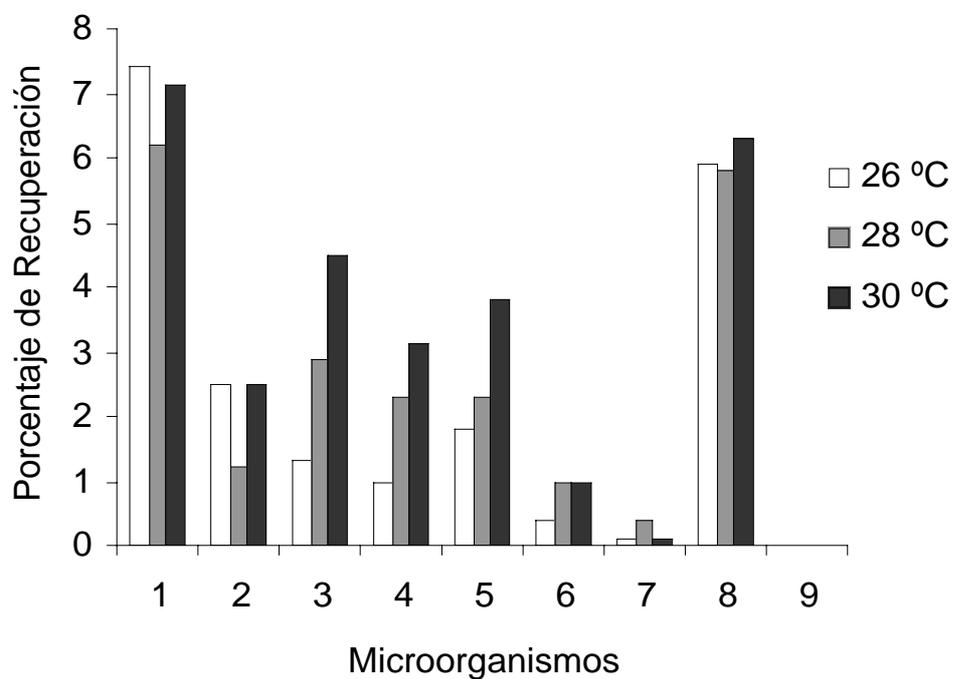


Figura 24. Porcentaje de recuperación individual de los microorganismos, en SDA, en función de la temperatura de incubación (26 °C, 28 °C, 30 °C)

SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

1: *Aspergillus niger* 2: *Aspergillus flavus* 3: *Aspergillus fumigatus*
 4: *Penicillium frequentans* 5: *Trichoderma viride* 6: *Paecilomyces variotii*
 7: *Acremonium strictum* 8: *Rhodotorula glutinis* 9: *Bacillus cereus*

4.1.2.2. Resultados del análisis estadístico en la evaluación de la metodología para el control microbiológico de los tapones de corcho para vinos

Los resultados del análisis estadístico de los datos obtenidos al evaluar los parámetros utilizados para el control microbiológico de los tapones de corcho para vinos, se detallan en las Tablas 21-25.

Tabla 21. p-valores para el ANOVA de los recuentos de las UFC/tapón en Plate Count Agar (PCA) en función del tiempo de lavado

		Tiempo de lavado (Minutos)					
		5	10	15	30	45	60
5	.		*	*	***	***	***
10		.		**	***	***	***
15			.		***	***	***
30				.		NS	NS
45					.		NS
60							.

Significación: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

NS: No significativo

Tabla 22. p-valores para el ANOVA de los recuentos de las UFC/tapón en Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), en función del tiempo de lavado

		Tiempo de lavado (Minutos)					
		5	10	15	30	45	60
5	.		*	**	***	***	***
10		.		**	**	***	***
15			.		***	***	***
30				.		NS	NS
45					.		NS
60							.

Significación: * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001

NS: No significativo

Tabla 23. p-valores para el ANOVA de los recuentos de las UFC/tapón en Plate Count Agar (PCA) y Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) en función de la velocidad de lavado

	Velocidad de lavado (r.p.m.)		
	100	150	200
100	.	*	*
150		.	NS
200			.

Significación: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$
 NS: No significativo

Tabla 24. p-valores para el ANOVA de los recuentos de las UFC/tapón en Triptona Soja Agar (TSA) en función del tiempo de incubación

	Tiempo de incubación (Horas)				
	24	48	72	96	120
24	.	***	**	**	**
48		.	**	**	**
72			.	NS	NS
96				.	NS
120					.

Significación: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$
 NS: No significativo

Tabla 25. p-valores para el ANOVA de los recuentos de las UFC/tapón en Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) en función del tiempo de incubación

	Tiempo de incubación (Horas)				
	24	48	72	96	120
24	.	***	***	***	***
48		.	**	**	**
72			.	NS	**
96				.	**
120					.

Significación: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

NS: No significativo

No existen diferencias significativas en los recuentos de las UFC/tapón en Plate Count Agar (PCA) y Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) cuando se utilizaron suero fisiológico y Solución Ringer _ como soluciones de lavado.

De igual manera, no se encontraron diferencias significativas en los recuentos de las UFC/tapón cuando se probaron diferentes medios de cultivo.

Tampoco se encontraron diferencias significativas en los recuentos de las UFC/tapón cuando se probaron diferentes temperaturas para la incubación de bacterias. Estos mismos resultados se obtuvieron cuando se probaron diferentes temperaturas para la incubación de hongos filamentosos y levaduras.

4.1.3. RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS

4.1.3.1. Comparación de la metodología establecida por la Norma 0.20/95 y la metodología propuesta en este estudio

Los porcentajes de recuperación de los microorganismos inoculados a los tapones de corcho, al utilizar la metodología establecida por la Norma 0.20/95 y la propuesta en este estudio, se indican en la Tabla 26.

Tabla 26. Porcentaje de recuperación de los microorganismos al comparar la Norma 0.20/95 y la metodología propuesta en este estudio

Metodologías	Porcentaje de Recuperación (%)		
	<u>Bacterias</u>		<u>Hongos filamentosos y levaduras</u>
	PCA	TSA	SDA
0.20/95	1,6	–	24
0.20/95 modificada	–	8,6	23

PCA: Plate Count Agar TSA: Triptona Soja Agar SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

- : No es utilizado el medio de cultivo

4.1.3.2. Comparación de la metodología establecida por la Norma ISO 10718:1993 y la metodología propuesta en este estudio

Los recuentos de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón, al aplicar la metodología establecida por la Norma ISO 10718:1993, no se pudieron realizar debido al crecimiento invasivo de todos los microorganismos en todas las placas de Petri.

4.1.3.3. Comparación del método de las diluciones seriadas decimales y la metodología propuesta en este estudio

En la Tabla 27, se señalan los porcentajes de recuperación de los microorganismos cuando se comparó la metodología propuesta en este estudio con el método de las diluciones seriadas.

Tabla 27. Porcentaje de recuperación de los microorganismos utilizando el método de las diluciones decimales seriadas y el método propuesto en este estudio

Inóculo (células/ml)	Porcentaje de Recuperación (%)	
	Diluciones decimales seriadas	0.20/1995 modificada
10^9	47,8	ND
10^7	44,9	ND
10^5	15,7	ND
10^2	0,0	25

ND: No determinado, debido a crecimiento excesivo

4.1.3.4. Comparación del método Sistema Miliflex-100® y la metodología propuesta en este estudio

El porcentaje de recuperación de los microorganismos, al comparar el Método del Sistema Miliflex-100® y el método propuesto en este trabajo, se indican en la Tabla 28.

Tabla 28. Porcentaje de recuperación de los microorganismos utilizando el Método Sistema Miliflex-100® y el método propuesto en este trabajo

Microorganismos	Porcentaje de Recuperación (%)	
	Miliflex-100®	0.20/95 modificada
Hongos filamentosos	15,9	17,6
Levaduras	5,7	6,3
Bacterias	5,1	7,0

4.1.3.5. Metodología propuesta aplicada a diferentes tapones de corcho

En la Tabla 29, se muestran los porcentajes de recuperación de los microorganismos, después de haber sido inoculados a tapones de corcho para vinos espumosos y tapones de corcho para vinos tranquilos.

Tabla 29. Porcentaje de recuperación de los microorganismos en tapones de corcho para vinos tranquilos y para vinos espumosos

Microorganismos	Porcentaje de Recuperación (%)	
	Tapones vinos espumosos	Tapones vinos tranquilos
Hongos filamentosos	18,0	19,7
Levaduras	6,5	7,5
Bacterias	7,2	9,1

4.2. RESULTADOS DEL RECUENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS, LEVADURAS Y BACTERIAS EN MUESTRAS DE TAPONES DE CORCHO PARA VINOS TRANQUILOS Y VINOS ESPUMOSOS

4.2.1. Resultados del recuento de hongos filamentosos, levaduras y bacterias en muestras de tapones de corcho para vinos espumosos y vinos tranquilos

En las Tablas 30 y 31 se muestran los recuentos de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) en las muestras de tapones de corcho para vinos espumosos y vinos tranquilos, respectivamente.

Cabe destacar, que en los medios de cultivo Triptona Soja Agar (TSA) y Mc Conkey Agar, sólo hubo crecimiento de bacterias y en los medios de cultivo Sabouraud dextrosa Agar y Rosa de Bengala Agar, sólo hubo crecimiento de hongos filamentosos y levaduras

Tabla 30. Recuento de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) en muestras de tapones para vinos espumosos

Muestra	Recuentos de UFC/tapón			
	TSA	MK	SDA	RBA
1	16	–	> 100	>100
2	24	–	>100	>100
3	6	–	>100	>100
4	22	1	>100	>100
5	4	–	23	13
6	17	–	22	15

- : No hubo crecimiento

>100: Recuentos mayores de 100 UFC en cada placa de Petri

TSA: Triptona Soja Agar

MK: Mc Conkey Agar

SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

RBA: Rosa de Bengala Agar

Tabla 31. Recuento de las Unidades Formadoras de Colonia por tapón (UFC/tapón) en muestras de tapones de corcho para vinos tranquilos

Muestra	Recuentos de UFC/tapón			
	TSA	MK	SDA	RBA
1	3	–	ND	ND
2	3	–	ND	ND
3	6	–	ND	ND
4	3	–	ND	ND
5	26	–	ND	ND
6	8	–	ND	ND

- : No hubo crecimiento

ND: No determinado, debido al crecimiento invasivo de *Monilia sitophila*

TSA: Triptona Soja Agar

MK: Mc Conkey Agar

SDA: Sabouraud Dextrosa Agar

RBA: Rosa de Bengala Agar

4.2.2. Resultados de la identificación de hongos filamentosos, levaduras y bacterias

Los resultados de la identificación de los hongos filamentosos, levaduras y bacterias aisladas de las muestras de tapones de corcho para vinos tranquilos y vinos espumosos, se presentan en las Tablas 32 y 33, respectivamente.

Tabla 32. Especies de hongos filamentosos, levaduras y bacterias aisladas de tapones de corcho para vinos tranquilos

Hongos filamentosos	Levaduras	Bacterias
<i>Monilia sitophila</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Trichoderma viride</i>		<i>B. circulans</i>
<i>Aspergillus niger</i>		<i>B. lentus</i>
<i>A. fumigatus</i>		<i>B. firmus</i>
		<i>B. pantothenicus</i>
		<i>Nocardia sp</i>
		<i>Agrobacterium sp</i>

Tabla 33. Especies de hongos filamentosos, levaduras y bacterias aisladas de tapones de corcho para vino espumoso

Hongos filamentosos	Levaduras	Bacterias
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Candida ciferri</i>	<i>B. circulans</i>
<i>P. velutinum</i>		<i>B. lentus</i>
<i>Aspergillus niger</i>		<i>B. firmus</i>
<i>A. Fumigatus</i>		<i>Micrococcus sp</i>
<i>Mucor plumbeus</i>		<i>M. luteus</i>
<i>Trichoderma viride</i>		<i>Agrobacterium sp</i>
<i>Fusarium solani</i>		<i>Achromobacter sp</i>
<i>F. moniliforme</i>		<i>Aeromonas sp</i>
<i>Monilia sitophila</i>		<i>Erwinia herbicola</i>
		<i>Acinetobacter lwoffii</i>
		<i>Streptomyces sp</i>

4.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

Los resultados de la evaluación de la actividad enzimática de los microorganismos aislados de los tapones de corcho, se especifican en las tablas 34 y 35. No se indican las enzimas que no fueron detectadas en ningún caso.

Tabla 34. Actividad enzimática de los hongos filamentosos y levaduras aislados

Microorganismos	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Ñ
<i>Alternaria alternata</i>	3	2	1	0	2	0	0	1	2	1	1	0	3	5	4
<i>Penicillium citrinum</i>	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	2
<i>P. velutinum</i>	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
<i>Aspergillus niger</i>	1	1	1	0	1	1	1	2	2	0	1	0	0	3	3
<i>A. fumigatus</i>	1	2	1	0	1	0	0	5	5	0	0	0	0	5	4
<i>Trichoderma viride</i>	1	4	5	2	0	0	0	4	3	0	0	0	0	1	1
<i>Mucor plumbeus</i>	1	2	1	0	1	0	0	4	4	0	0	0	0	1	1
<i>Fusarium solani</i>	0	2	1	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0
<i>F. moniliforme</i>	1	3	2	0	1	0	0	5	5	0	0	0	0	1	0
<i>Monilia sitophila</i>	5	2	2	0	4	1	0	5	5	0	1	1	1	5	0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	0	2	1	0	5	1	0	2	2	0	0	0	0	0	0
<i>Candida ciferri</i>	1	2	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

0 = Reacción negativa, 1 = 5 nanomoles, 2 = 10 nanomoles, 3 = 20 nanomoles, 4 = 3 nanomoles, 5 ≥ 40 nanomoles

A: Fosfatasa alcalina, B: Esterasa (C₁), C: Esterasa lipasa (C₈), D: Lipasa (C₁₄), E: Leucina arilamidasa, F: Valina arilamidasa, G: Cistina arilamidasa, H: Fosfatasa ácida, I: Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa, J: α-galactosidasa, K: β-galactosidasa, L: β-glucoronidasa, M: α-glucosidasa, N: β-glucosidasa, Ñ : N-acetil-β-glucosaminidasa

Tabla 35. Actividad enzimática de las bacterias aisladas

Microorganismo	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
<i>Bacillus cereus</i>	0	2	2	1	0	1	0	1	1	0	0
<i>B. circulans</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>B. lentus</i>	0	2	2	1	0	1	0	1	0	5	0
<i>B. firmus</i>	0	2	1	1	0	1	0	1	0	0	0
<i>B. pantothenicus</i>	1	2	1	5	1	0	0	1	0	1	0
<i>Micrococcus sp</i>	1	2	3	0	0	0	2	1	0	2	0
<i>M. luteus</i>	0	0	0	5	0	0	0	1	0	0	0
<i>Nocardia sp</i>	2	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Agrobacterium sp</i>	0	1	1	1	0	0	0	2	0	0	0
<i>Aeromonas sp</i>	2	1	2	1	0	0	5	1	0	0	1
<i>Erwinia herbicola</i>	0	2	3	1	0	0	0	2	0	0	0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>Streptomyces sp</i>	0	3	2	1	0	1	0	1	0	0	0
<i>Achromobacter sp</i>	1	1	1	1	0	0	0	2	0	0	0

0 = Reacción negativa, 1 = 5 nanomoles, 2 = 10 nanomoles, 3 = 20 nanomoles, 4 = 3 nanomoles, 5 ≥ 40 nanomoles

A: Fosfatasa alcalina, **B:** Esterasa (C₁), **C:** Esterasa lipasa (C₈), **D:** Leucina arilamidasas, **E:** Valina arilamidasas, **F:** α-quimotripsina, **G:** Fosfatasa ácida, **H:** Naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa, **I:** β-galactosidasa, **J:** α-glucosidasa, **K:** β-glucosidasa

Los hongos filamentosos que presentaron mayor actividad enzimática, se ilustran en las Figuras 25 - 28.

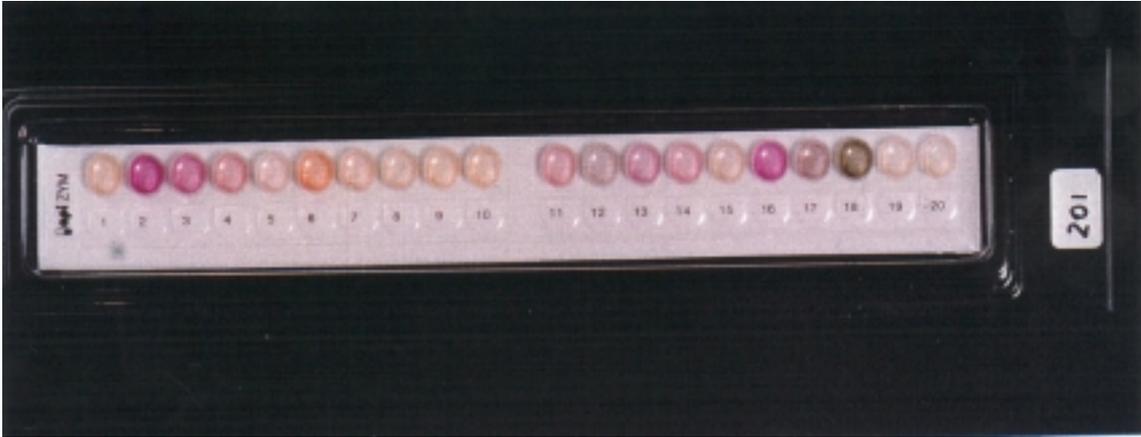


Figura 25. API ZYM® de *Alternaria alternata*

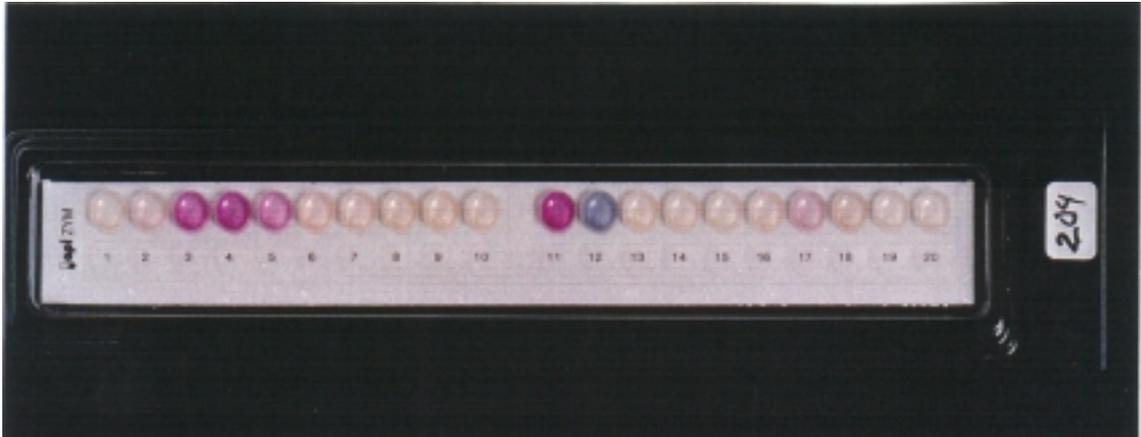


Figura 26. API ZYM® de *Trichoderma viride*

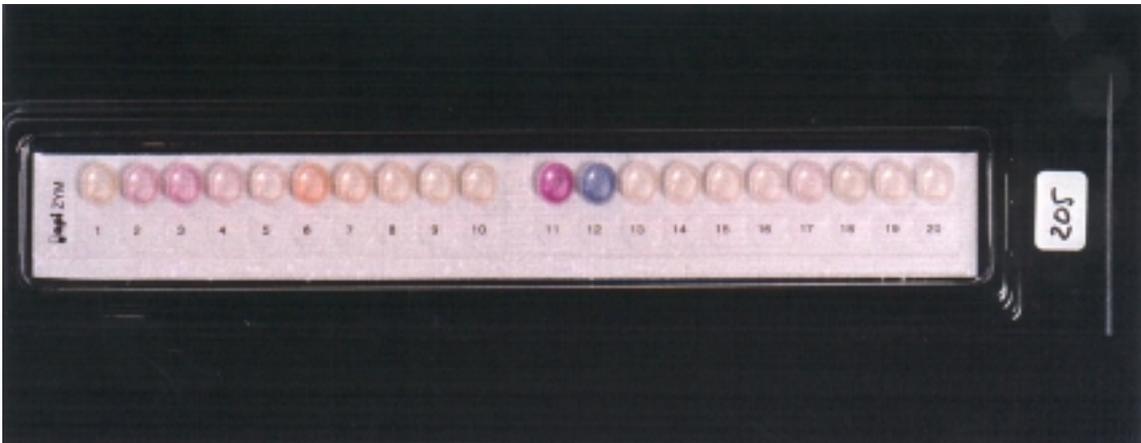


Figura 27. API ZYM® de *Mucor plumbeus*

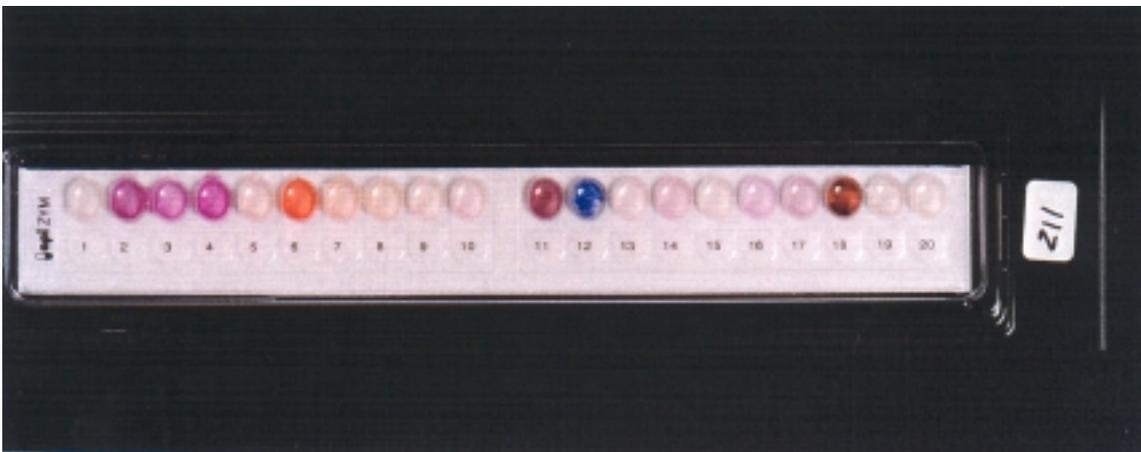


Figura 28. API ZYM® de *Monilia sitophila*

4.4. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

4.4.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS AISLADAS

Los resultados obtenidos al medir los halos inhibitorios producidos por los discos de microorganismos, tanto cuando hacían contacto por el medio de cultivo como por la zona del desarrollo micelial, con los microorganismos sembrados por superficie en las placas de Petri, así como su influencia sobre la esporulación de los hongos filamentosos, se especifican en la Tablas 36 – 63.

Tabla 36. Actividad inhibitoria de *Alternaria alternata* contra hongos filamentosos presentes en las muestras de corcho

Microorganismo	Halo inhibitorio		
	Medio de cultivo (mm)	Zona micelial (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus niger</i>	–	3,0	NIE
<i>Trichoderma viride</i>	4,0	5,0	NIE
<i>Penicillium citrinum</i>	–	3,0	NIE
<i>Penicillium velutinum</i>	3,0	–	NIE

NIE: No Inhibe la Esporulaci3n

-: No se observ3 actividad inhibitoria

Tabla 37. Actividad inhibitoria de *Alternaria alternata* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Zona micelar (mm)
<i>Nocardia sp</i>	4,5	4,5
<i>Erwinia herbicola</i>	5,0	4,0
<i>Agrobacterium sp</i>	2,5	2,5
<i>Bacillus firmus</i>	6,0	6,0
<i>Bacillus cereus</i>	9,5	8,5
<i>Bacillus lentus</i>	8,0	6,0
<i>Bacillus pantothenicus</i>	4,5	5,0
<i>Achromobacter sp</i>	4,0	4,0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1,5	2,5
<i>Micrococcus luteus</i>	6,0	7,0

Alternaria alternata no presentó actividad inhibitoria contra hongos filamentosos no presentes en las muestras de corcho.

Tabla 38. Actividad inhibitoria de *Penicillium citrinum* contra hongos filamentosos y levaduras presentes en las muestras de corcho

Microorganismo	Halo inhibitorio		
	Medio de cultivo (mm)	Zona micelar (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus niger</i>	4,0	–	NIE
<i>Aspergillus fumigatus</i>	7,0	4,0	NIE
<i>Mucor plumbeus</i>	6,0	4,5	NIE
<i>Trichoderma viride</i>	6,0	5,5	NIE
<i>Penicillium velutinum</i>	3,0	3,5	IPE
<i>Fusarium solani</i>	3,0	3,0	NIE
<i>F. moniliforme</i>	3,5	4,0	NIE
<i>Monilia sitophila</i>	4,0	7,0	NIE
<i>Rhodotorula glutinis</i>	–	3,0	–

NIE: No Inhibe la Esporulación IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulación -: No se observó actividad inhibitoria

Tabla 39. Actividad inhibitoria de *Penicillium citrinum* contra hongos filamentosos no presentes en las muestras de corcho

Microorganismo	Halo inhibitorio		Esporulación
	Medio de cultivo (mm)	Zona micelar (mm)	
<i>Aspergillus flavus</i>	6,0	4,0	NIE
<i>Penicillium frequentans</i>	5,0	3,0	NIE
<i>Acremonium strictum</i>	4,5	5,0	IPE

NIE: No Inhibe la Esporulaci3n

IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulaci3n

Tabla 40. Actividad inhibitoria de *Penicillium citrinum* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Zona micelar (mm)
<i>Nocardia sp</i>	1,5	-
<i>Erwinia herbicola</i>	5,5	4,0
<i>Agrobacterium sp</i>	2,5	2,5
<i>Bacillus firmus</i>	6,0	4,5
<i>Bacillus cereus</i>	8,0	6,0
<i>Bacillus lentus</i>	4,0	4,0
<i>Bacillus pantothenicus</i>	4,0	7,0
<i>Achromobacter sp</i>	2,5	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2,5	1,5
<i>Micrococcus luteus</i>	5,0	4,0
<i>Micrococcus sp</i>	7,0	5,0

- : No se observ3 actividad inhibitoria

Tabla 41. Actividad inhibitoria de *Aspergillus niger* contra hongos filamentosos presentes en las muestras de corcho

Halo inhibitorio			
Microorganismo	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4,0	–	NIE
<i>Alternaria alternata</i>	6,5	4,0	IPE
<i>Fusarium moniliforme</i>	5,5	–	NIE
<i>Penicillium velutinum</i>	3,0	3,5	IPE
<i>Rhodotorula glutinis</i>	–	3,5	–

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulación

IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulación

Tabla 42. Actividad inhibitoria de *Aspergillus niger* contra hongos filamentosos no presentes en las muestras de corcho

Halo inhibitorio			
Microorganismo	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus flavus</i>	4,5	3,0	NIE
<i>Penicillium frequentans</i>	7,5	4,0	NIE
<i>Acremonium strictum</i>	7,0	5,0	IPE

NIE: No Inhibe la Esporulación

IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulación

Aspergillus niger no presentó actividad inhibitoria contra hongos filamentosos no presentes en las muestras de corcho.

Tabla 43. Actividad inhibitoria de *Aspergillus niger* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)
<i>Nocardia sp</i>	1,5	–
<i>Agrobacterium sp</i>	2,5	–
<i>Bacillus firmus</i>	7,0	4,0
<i>Bacillus lentus</i>	5,0	4,0
<i>Bacillus pantothenicus</i>	5,0	4,5
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	–	3,5
<i>Micrococcus luteus</i>	4,5	3,5
<i>Micrococcus sp</i>	3,0	4,0
<i>Aeromonas sp</i>	2,5	3,0

- : No se observó actividad inhibitoria

Tabla 44. Actividad inhibitoria de *Trichoderma viride* contra hongos filamentosos presentes en las muestras de corcho

Microorganismo	Halo inhibitorio		
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus fumigatus</i>	9,5	8,5	NIE
<i>Aspergillus niger</i>	–	9,5	IPE
<i>Mucor plumbeus</i>	5,5	8,0	NIE
<i>Penicillium citrinum</i>	9,5	13,0	NIE
<i>Penicillium velutinum</i>	–	5,5	IPE
<i>Fusarium moniliforme</i>	–	5,0	NIE
<i>Fusarium solani</i>	8,0	8,0	NIE
<i>Rhodotorula glutinis</i>	–	17,0	–
<i>Monilia sitophila</i>	–	12,0	NIE

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulación

IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulación

Tabla 45. Actividad inhibitoria de *Trichoderma viride* contra hongos filamentosos no presentes en las muestras de corcho

Microorganismo	Halo inhibitorio		
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus flavus</i>	4,5	10,0	NIE
<i>Penicillium frequentans</i>	6,0	10,0	NIE
<i>Acremonium strictum</i>	7,0	14,5	NIE
<i>Rhizopus arrhizus</i>	–	14,0	IPE

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulación

IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulación

Tabla 46. Actividad inhibitoria de *Trichoderma viride* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)
<i>Bacillus firmus</i>	5,0	4,5
<i>Bacillus lentus</i>	6,0	5,5
<i>Bacillus pantothenicus</i>	4,5	6,5
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2,5	5,0
<i>Micrococcus luteus</i>	5,0	6,0
<i>Micrococcus sp</i>	3,5	5,0
<i>Erwinia herbicola</i>	–	3,0
<i>Aeromonas sp</i>	3,0	3,0

- : No se observó actividad inhibitoria

Tabla 47. Actividad de *Mucor plumbeus* contra hongos filamentosos y levaduras presentes en las muestras de corcho

Halo inhibitorio			
Microorganismo	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus niger</i>	–	–	IPE
<i>Penicillium citrinum</i>	15,0	7,0	NIE
<i>Penicillium velutinum</i>	6,5	6,5	ITE
<i>Fusarium moniliforme</i>	4,0	4,0	NIE
<i>Rhodotorula glutinis</i>	5,0	6,0	–

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulaci3n IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulaci3n

ITE: Inhibe Totalmente la Esporulaci3n

Tabla 48. Actividad inhibitoria de *Mucor plumbeus* contra hongos filamentosos no presentes en las muestras de corcho

Halo inhibitorio			
Microorganismo	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	Esporulaci3n
<i>Penicillium frequentans</i>	3,0	4,0	NIE
<i>Acremonium strictum</i>	5,5	4,0	NIE

- : No se observ3 actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulaci3n

Tabla 49. Actividad inhibitoria de *Mucor plumbeus* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)
<i>Nocardia sp</i>	–	1,0
<i>Agrobacterium sp</i>	3,0	3,0
<i>Bacillus firmus</i>	5,5	5,0
<i>Bacillus lentus</i>	4,0	4,0
<i>Bacillus cereus</i>	9,0	6,5
<i>Bacillus pantothenicus</i>	6,0	6,0
<i>Erwinia herbicola</i>	3,5	4,0
<i>Micrococcus luteus</i>	4,5	4,0
<i>Micrococcus sp</i>	5,5	5,0
<i>Streptomyces sp</i>	6,0	6,5
<i>Achromobacter sp</i>	2,5	1,0

- : No se observó actividad inhibitoria

Tabla 50. Actividad inhibitoria de *Aspergillus fumigatus* contra hongos filamentosos y levaduras presentes en las muestras de corcho

Microorganismo	Halo inhibitorio		
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus niger</i>	–	–	IPE
<i>Penicillium citrinum</i>	5,5	4,5	NIE
<i>Penicillium velutinum</i>	4,0	6,5	ITE
<i>Fusarium moniliforme</i>	4,5	4,0	NIE
<i>Rhodotorula glutinis</i>	5,5	–	–

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulación IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulación

ITE: Inhibe Totalmente la Esporulación

Tabla 51. Actividad inhibitoria de *Aspergillus fumigatus* contra hongos filamentosos no presentes en las muestras de corcho

Microorganismo	Halo inhibitorio		Esporulación
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	
<i>Penicillium frequentans</i>	3,5	5,0	NIE
<i>Rhizopus arrhizus</i>	–	5,0	NIE

- : No se observó actividad inhibitoria
 NIE: No Inhibe la Esporulaci3n

Tabla 52. Actividad inhibitoria de *Aspergillus fumigatus* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)
<i>Nocardia sp</i>	3,5	1,5
<i>Agrobacterium sp</i>	2,5	–
<i>Bacillus firmus</i>	5,0	4,0
<i>Bacillus lentus</i>	4,0	4,0
<i>Bacillus cereus</i>	5,0	9,0
<i>Bacillus pantothenicus</i>	5,5	5,0
<i>Micrococcus luteus</i>	6,0	5,5
<i>Micrococcus sp</i>	5,0	4,5
<i>Achromobacter sp</i>	2,5	3,5
<i>Aeromonas sp</i>	2,5	3,0

- : No se observ3 actividad inhibitoria

Tabla 53. Actividad inhibitoria de *Fusarium moniliforme* contra hongos filamentosos y levaduras presentes en las muestras de corcho

Halo inhibitorio			
Microorganismo	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus niger</i>	–	6,5	IPE
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6,5	6,5	NIE
<i>Penicillium citrinum</i>	3,0	4,0	NIE
<i>Penicillium velutinum</i>	3,0	–	ITE
<i>Mucor plumbeus</i>	2,0	2,0	NIE
<i>Rhodotorula glutinis</i>	5,0	5,0	–

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulaci3n IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulaci3n

ITE: Inhibe Totalmente la Esporulaci3n

Tabla 54. Actividad inhibitoria de *Fusarium moniliforme* contra hongos filamentosos no presentes en las muestras de corcho

Halo inhibitorio			
Microorganismo	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	Esporulaci3n
<i>Aspergillus flavus</i>	4,0	–	NIE
<i>Penicillium frequentans</i>	3,5	3,0	NIE
<i>Rhizopus arrhizus</i>	4,5	4,0	NIE
<i>Acremonium strictum</i>	–	3,0	NIE

- : No se observ3 actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulaci3n

Tabla 55. Actividad inhibitoria de *Fusarium moniliforme* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)
<i>Nocardia sp</i>	2,0	1,5
<i>Bacillus firmus</i>	3,5	3,0
<i>Bacillus lentus</i>	3,5	4,5
<i>Bacillus pantothenicus</i>	5,5	4,5
<i>Micrococcus sp</i>	6,5	7,5
<i>Aeromonas sp</i>	1,5	2,5

- : No se observó actividad inhibitoria

Tabla 56. Actividad inhibitoria de *Fusarium solani* contra hongos filamentosos presentes en las muestras de corcho

Microorganismo	Halo inhibitorio		
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus niger</i>	2,5	2,5	NIE
<i>Aspergillus fumigatus</i>	8,0	6,5	NIE
<i>Penicillium citrinum</i>	6,0	8,0	NIE
<i>Penicillium velutinum</i>	4,0	5,0	ITE
<i>Mucor plumbeus</i>	1,5	4,0	NIE

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulaci3n IPE: Inhibe Parcialmente la esporulaci3n

Tabla 57. Actividad inhibitoria de *Fusarium solani* contra hongos filamentosos no presentes en las muestras de corcho

Microorganismo	Halo inhibitorio		Esporulación
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	
<i>Aspergillus flavus</i>	15,5	8,0	NIE
<i>Penicillium frequentans</i>	5,5	4,5	NIE
<i>Rhizopus arrhizus</i>	4,0	3,5	NIE
<i>Acremonium strictum</i>	11,0	10,5	NIE

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulación

Tabla 58. Actividad inhibitoria de *Fusarium solani* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)
<i>Nocardia sp</i>	1,5	–
<i>Agrobacterium sp</i>	3,0	2,5
<i>Bacillus firmus</i>	4,0	3,5
<i>Bacillus lentus</i>	3,5	3,0
<i>Bacillus cereus</i>	4,5	3,5
<i>Bacillus pantothenicus</i>	3,5	3,0
<i>Micrococcus luteus</i>	4,5	4,0
<i>Micrococcus sp</i>	3,5	4,0
<i>Achromobacter sp</i>	3,5	2,0
<i>Erwinia herbicola</i>	3,5	3,5

- : No se observó actividad inhibitoria

Tabla 59. Actividad inhibitoria de *Penicillium velutinum* contra hongos filamentosos presentes en las muestras de corcho

Microorganismo	Halo inhibitorio		
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus niger</i>	–	–	IPE
<i>Fusarium moniliforme</i>	4,0	5,5	NIE

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulaci3n IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulaci3n

Penicillium velutinum no present3 actividad inhibitoria contra hongos filamentosos no presentes en las muestras de corcho.

Tabla 60. Actividad inhibitoria de *Penicillium velutinum* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)
<i>Nocardia sp</i>	1,5	–
<i>Agrobacterium sp</i>	3,0	–
<i>Bacillus firmus</i>	5,0	–
<i>Bacillus lentus</i>	6,5	–
<i>Micrococcus sp</i>	4,0	3,0
<i>Achromobacter sp</i>	4,5	-
<i>Erwinia herbicola</i>	4,5	2,0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2,5	–
<i>Aeromonas sp</i>	2,0	–

- : No se observ3 actividad inhibitoria

Tabla 61. Actividad inhibitoria de *Rhodotorula glutinis* contra hongos filamentosos presentes y no presentes en las muestras de corcho

Microorganismo	Halo inhibitorio		Esporulación
	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	
<u>Presentes en corcho</u>			
<i>Fusarium moniliforme</i>	2,5	–	NIE
<i>Penicillium velutinum</i>	–	–	IPE
<u>No presentes en corcho</u>			
<i>Penicillium frequentans</i>	3,0	2,5	NIE

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulación IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulación

Tabla 62. Actividad inhibitoria de *Rhodotorula glutinis* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Crecimiento microbiano (mm)
<i>Nocardia sp</i>	1,5	1,5
<i>Agrobacterium sp</i>	3,0	3,0
<i>Bacillus firmus</i>	4,0	4,0
<i>Bacillus lentus</i>	5,5	5,5
<i>Bacillus pantothenicus</i>	4,5	4,5
<i>Micrococcus luteus</i>	4,5	4,0
<i>Micrococcus sp</i>	3,5	3,5
<i>Achromobacter sp</i>	3,0	3,5
<i>Erwinia herbicola</i>	3,0	4,0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2,5	3,5

- : No se observó actividad inhibitoria

Tabla 63. Actividad inhibitoria de *Monilia sitophila* contra hongos filamentos presentes en las muestras de corcho

Halo inhibitorio			
Microorganismo	Medio de cultivo (mm)	Zona miceliar (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus niger</i>	–	–	IPE
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5,5	7,0	NIE

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulaci3n IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulaci3n

Se debe destacar que *Monilia sitophila*, no present3 actividad inhibitoria contra hongos filamentosos no presentes en las muestras de corcho ni contra las bacterias aisladas de estos. As3 mismo, *Candida ciferri*, no present3 actividad inhibitoria contra ning3n microorganismo.

4.4.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS BACTERIAS AISLADAS

La actividad inhibitoria de las bacterias contra otros microorganismos aislados de las muestras de corcho, fue analizada de la forma descrita en el punto 4.4.1, y se expresan los resultados en las tablas 64- 75.

Tabla 64. Actividad inhibitoria de *Nocardia sp* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Crecimiento bacteriano (mm)
<i>Bacillus firmus</i>	3,0	2,5
<i>Bacillus lentus</i>	2,5	3,0
<i>Bacillus cereus</i>	3,5	3,0
<i>Micrococcus luteus</i>	6,0	6,0
<i>Micrococcus sp</i>	5,0	5,0
<i>Aeromonas sp</i>	2,5	2,5

- : No se observó actividad inhibitoria

Tabla 65. Actividad inhibitoria de *Nocardia sp* contra hongos filamentosos

Microorganismo	Halo inhibitorio		
	Medio de cultivo (mm)	Crecimiento bacteriano (mm)	Esporulación
<i>Penicillium citrinum</i>	–	–	IPE
<i>Mucor plumbeus</i>	3,0	2,5	NIE
<i>Fusarium solani</i>	2,0	4,0	IPE

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulación IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulación

Tabla 66. Actividad inhibitoria de *Agrobacterium sp* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Crecimiento bacteriano (mm)
<i>Bacillus firmus</i>	8,5	4,5
<i>Achromobacter sp</i>	3,0	3,0
<i>Micrococcus sp</i>	11,5	7,5
<i>Erwinia herbicola</i>	3,0	4,0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2,0	1,5

- : No se observó actividad inhibitoria

Tabla 67. Actividad inhibitoria de *Agrobacterium sp* contra hongos filamentosos y levaduras

Microorganismo	Halo inhibitorio		
	Medio de cultivo (mm)	Crecimiento bacteriano (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	IPE
<i>Penicillium citrinum</i>	-	4,0	NIE
<i>Mucor plumbeus</i>	5,5	3,0	IPE
<i>Trichoderma viride</i>	7,0	9,5	NIE
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	2,5	-

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulación IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulación

Tabla 68. Actividad inhibitoria de *Acinetobacter lwoffii* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Crecimiento bacteriano (mm)
<i>Bacillus firmus</i>	5,0	2,0
<i>Achromobacter sp</i>	4,0	5,0
<i>Micrococcus sp</i>	–	5,5
<i>Erwinia herbicola</i>	6,0	2,0

- : No se observó actividad inhibitoria

Tabla 69. Actividad inhibitoria de *Acinetobacter lwoffii* contra hongos filamentosos

Microorganismo	Halo inhibitorio		
	Medio de cultivo (mm)	Crecimiento bacteriano (mm)	Esporulación
<i>Mucor plumbeus</i>	4,0	4,0	NIE
<i>Trichoderma viride</i>	–	–	IPE
<i>Monilia sitophila</i>	2,0	3,0	NIE

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulación IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulación

Tabla 70. Actividad inhibitoria de *Achromobacter sp* contra hongos filamentosos

Microorganismo	Halo inhibitorio		
	Medio de cultivo (mm)	Crecimiento bacteriano (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus niger</i>	4,0	4,0	NIE
<i>Penicillium citrinum</i>	–	–	IPE
<i>Mucor plumbeus</i>	2,0	3,0	NIE

- : No se observó actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulación IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulación

Achromobacter sp, sólo presentó actividad inhibitoria contra *Bacillus pantothenicus*, observándose un halo inhibitorio de 5,0 mm cuando estaba en contacto por el medio de cultivo y de 4,0 mm cuando estaba en contacto por la zona de crecimiento bacteriano.

Tabla 71. Actividad inhibitoria de *Bacillus lentus* contra bacterias

Microorganismo	Halo inhibitorio	
	Medio de cultivo (mm)	Crecimiento bacteriano (mm)
<i>Bacillus pantothenicus</i>	4,5	4,5
<i>Micrococcus luteus</i>	3,0	3,0
<i>Micrococcus sp</i>	4,0	3,5
<i>Aeromonas sp</i>	3,0	1,5

Bacillus lentus no presentó actividad inhibitoria contra hongos filamentosos y levaduras.

Tabla 72. Actividad inhibitoria de *Aeromonas sp* contra hongos filamentosos

Microorganismo	Halo inhibitorio		
	Medio de cultivo (mm)	Crecimiento bacteriano (mm)	Esporulación
<i>Aspergillus niger</i>	4,5	2,0	IPE
<i>Trichoderma viride</i>	3,0	2,5	IPE

IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulaci3n

Aeromonas sp, no present3 actividad inhibitoria contra bacterias.

Tabla 73. Actividad inhibitoria de *Streptomyces sp* contra hongos filamentosos

Microorganismo	Halo inhibitorio		
	Medio de cultivo (mm)	Crecimiento bacteriano (mm)	Esporulaci3n
<i>Mucor plumbeus</i>	3,0	2,5	NIE
<i>Trichoderma viride</i>	–	–	IPE
<i>Monilia sitophila</i>	2,0	3,0	NIE

- : No se observ3 actividad inhibitoria

NIE: No Inhibe la Esporulaci3n IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulaci3n

Streptomyces sp, no present3 actividad inhibitoria contra bacterias.

Tabla 74. Actividad inhibitoria de bacterias contra hongos filamentosos

Bacterias contra Hongos		Halo inhibitorio			
		Medio de cultivo (mm)	Crecimiento bacteriano (mm)	Esporulación	
<i>Micrococcus sp</i>	vs	<i>Aspergillus niger</i>	-	-	IPE
<i>Erwinia herbicola</i>	vs	<i>Monilia sitophila</i>	-	2,0	NIE
<i>Bacillus pantothenicus</i>	vs	<i>Monilia sitophila</i>	-	2,0	NIE

- : No se observó actividad inhibitoria

IPE: Inhibe Parcialmente la Esporulaci3n

Tabla 75. Actividad inhibitoria de bacterias contra bacterias

Bacterias contra bacterias		Halo inhibitorio		
		Medio de cultivo (mm)	Crecimiento bacteriano (mm)	
<i>Micrococcus sp</i>	vs	<i>Achromobacter sp</i>	3,0	3,0
<i>Erwinia herbicola</i>	vs	<i>Bacillus lentus</i>	-	3,5
<i>Bacillus circulans</i>	vs	<i>Nocardia sp</i>	5,0	-

- : No se observ3 actividad inhibitoria

Bacillus cereus, *Bacillus firmus* y *Micrococcus luteus* no presentaron actividad inhibitoria contra hongos filamentosos, levaduras ni bacterias.

En la Figuras 29 y 30 se ilustran algunas actividades inhibitorias de los microorganismos aislados de los tapones de corcho.



Figura 29. Actividad inhibitoria de los microorganismos aislados

- a) Actividad inhibitoria de *Aspergillus niger* y *Trichoderma viride* contra *Aspergillus fumigatus* (1), *Mucor plumbeus* (2), *Penicillium citrinum* (3), *Fusarium solani* (4) y *Fusarium moniliforme* (5)
- b) Actividad inhibitoria de *Alternaria alternata* y *Penicillium citrinum* contra *Micrococcus luteus* (2), *Bacillus firmus* (V₁) y *Nocardia sp* (V₇)

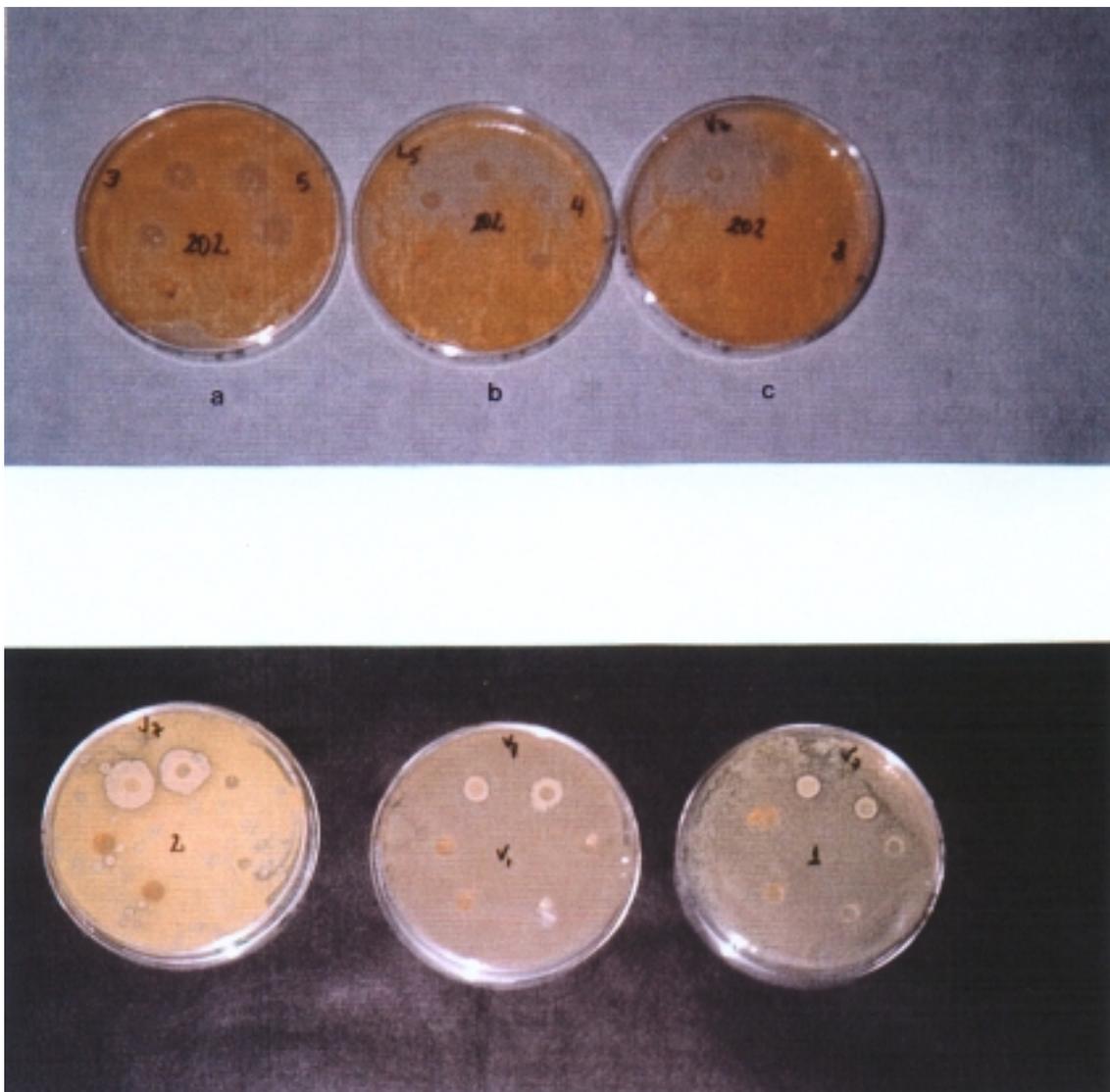


Figura 30. Actividad inhibitoria de los microorganismos asilados

- a) *Agrobacterium sp* (3) y *Achromobacter sp* (5) contra *Penicillium citrinum* (202)
- b) *Streptomyces sp* (L5) y *Acinetobacter lwoffii* (4) contra *Penicillium citrinum* (202)
- c) *Nocardia sp* (V7) y *Bacillus circulans* (8) contra *Penicillium citrinum* (202)
- d) *Nocardia sp* (V7) contra *Micrococcus luteus* (2), *Bacillus firmus* (V1) y *Bacillus cereus* (1)

4.5. RESULTADOS DE LAS CROMATOGRAFÍAS EN CAPA FINA

Se obtuvieron huellas cromatográficas de los discos de los hongos filamentosos y levaduras aisladas, cuando se utilizó la mezcla Benceno/Metanol/Acido acético en proporción 98:8:4.

Cabe destacar, que *Candida ciferri*, no presentó huellas cromatográficas con ninguno de los solventes utilizados.

En las Figuras 31 y 32 se detallan los resultados de las cromatografías realizadas a los hongos filamentosos y levaduras.

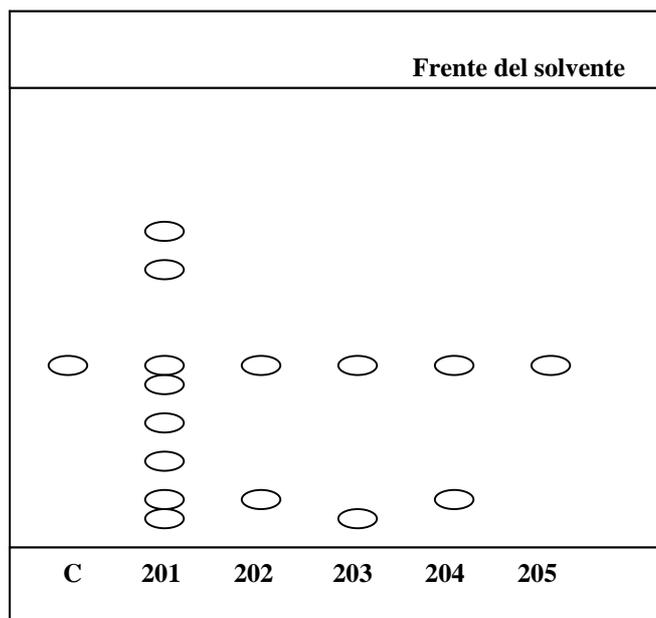


Figura 31. Cromatografía en capa fina de hongos filamentosos y levaduras aislados de los tapones de corcho

C: Control (Agar extracto de malta al 2 %) 201: *Alternaria alternata* 202: *Penicillium citrinum*
203: *Aspergillus niger* 204: *Trichoderma viride* 205: *Mucor plumbeus*

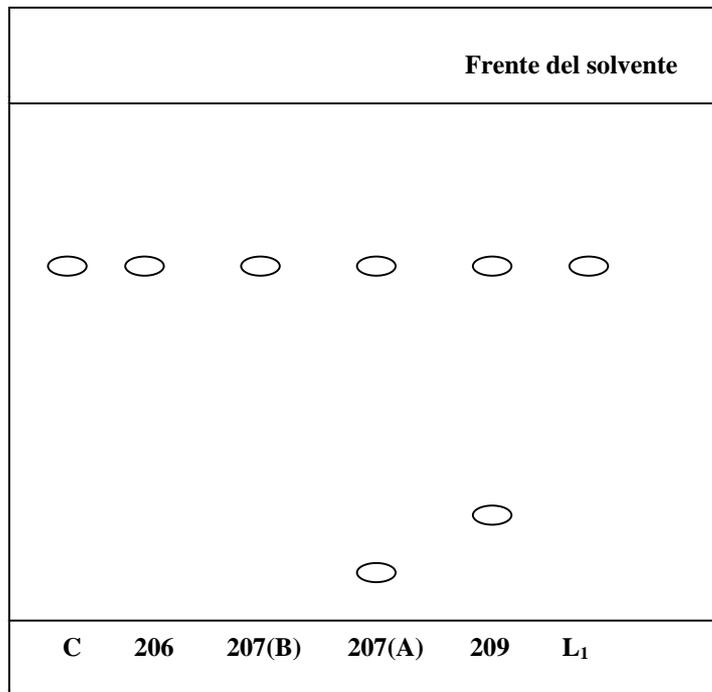


Figura 32. Cromatografía en capa fina de los hongos filamentosos y levaduras aislados de los tapones de corcho

C: Control (Agar extracto de malta al 2 %) **206:** *Aspergillus fumigatus* **207(B):** *Fusarium solani*
207 (A): *Fusarium moniliforme* **209:** *Penicillium velutinum* **L₁:** *Rhodotorula glutinis*

En la tabla 76, se especifican los Rf obtenidos de las huellas cromatográficas de los hongos filamentosos aislados de los tapones de corcho.

Tabla 76. Rf de huellas cromatográficas de los hongos filamentosos aislados

Microorganismo	Rf
<i>Alternaria alternata</i>	0.07
	0,10
	0,15
	0,20
	0,24
	0,50
	0,54
<i>Penicillium citrinum</i>	0,11
<i>Penicillium velutinum</i>	0,16
<i>Aspergillus niger</i>	0,06
<i>Trichoderma viride</i>	0,10
<i>Fusarium moniliforme</i>	0,12

4.6. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS FRACCIONES DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS OBTENIDAS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Los resultados obtenidos de la actividad inhibitoria de las fracciones de los hongos filamentosos obtenidas por cromatografía en capa fina se detallan en la Tabla 77.

Tabla 77. Actividad inhibitoria de las fracciones de los hongos filamentosos

Hongos filamentosos contra microorganismos	Halo inhibitorio (mm)
<i>Penicillium citrinum</i> vs <i>Micrococcus luteus</i>	1,5
<i>Fusarium moniliforme</i>	1,0
<i>Aspergillus niger</i> vs <i>Bacillus lentus</i>	1,0
<i>Nocardia sp</i>	1,5
<i>Trichoderma viride</i> vs <i>Bacillus firmus</i>	1,5
<i>Penicillium velutinum</i> vs <i>Achromobacter sp</i>	6,5
<i>Bacillus lentus</i>	5,0
<i>Fusarium moniliforme</i> vs <i>Erwinia herbicola</i>	0,5
<i>Agrobacterium sp</i>	0,5
<i>Aspergillus niger</i>	0,5

4.7. RESULTADOS DEL ESTUDIO DEL ESTUDIO DEL METABOLISMO SECUNDARIO DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

4.7.1. Resultados de la producción de micotoxinas

4.7.1.1. Resultados de la producción de micotoxinas de *Alternaria alternata*

En las Figuras 33 y 34 se muestran los resultados obtenidos del estudio de la producción de micotoxinas por *Alternaria alternata* a través de cromatografía en capa fina.

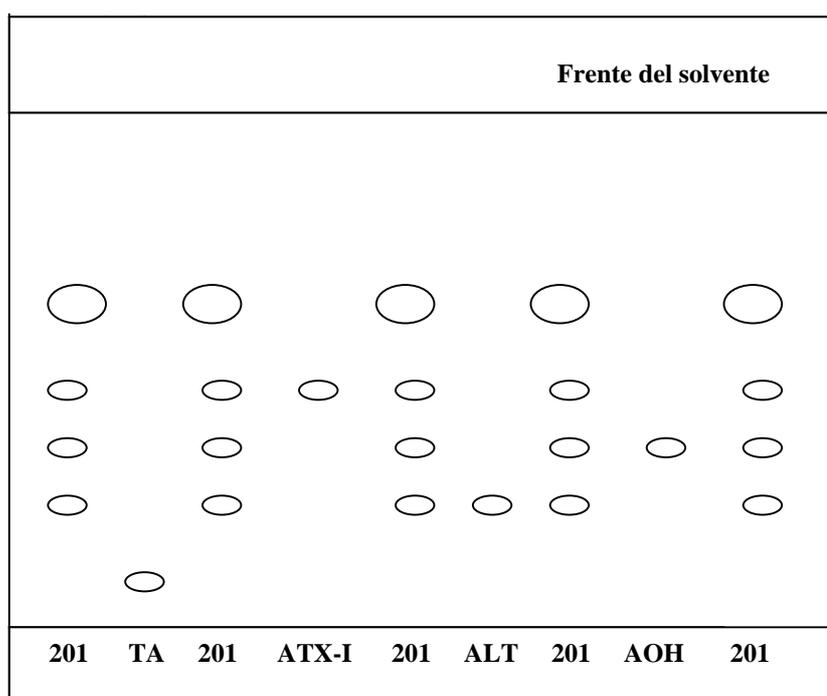


Figura 33. Cromatografía en capa fina de micotoxinas producidas por *Alternaria alternata*.

201: *Alternaria alternata* TA: Acido tenuazoico ATX-I: Alvertoxina I ALT: Altenueno AOH: Alternariol

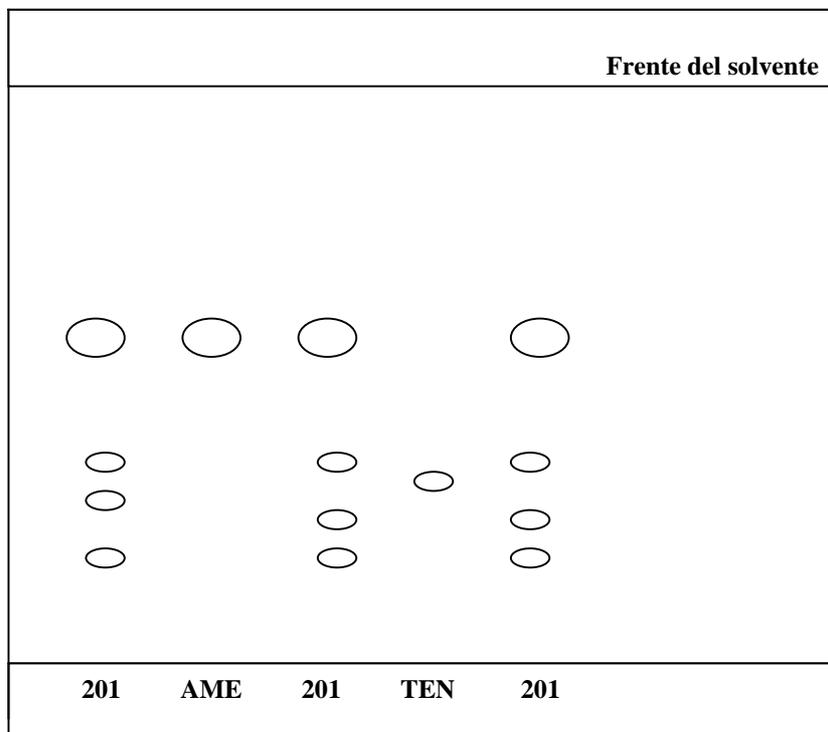


Figura 34: Cromatografía en capa fina de micotoxinas producidas por *Alternaria alternata*

201: *Alternaria alternata* AME: Alternariol monometil éter TEN: Tentoxina

Tabla 78. Actividad inhibitoria de las fracciones de *Alternaria alternata*

Fracción	Microorganismo	Halo inhibitorio (mm)
201 A vs	<i>Penicillium velutinum</i>	0,5
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1,0
201 B vs	<i>Penicillium velutinum</i>	2,5
	<i>Micrococcus sp</i>	0,5
	<i>Bacillus pantothenicus</i>	1,0
201 C vs	<i>Bacillus lentus</i>	2,0
	<i>Nocardia sp</i>	0,5
AOH vs	<i>Penicillium velutinum</i>	1,0
	<i>Bacillus lentus</i>	0,5
	<i>Bacillus pantothenicus</i>	0,5
	<i>Bacillus cereus</i>	1,0
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2,0
	<i>Micrococcus luteus</i>	3,5
	<i>Micrococcus sp</i>	1,0
AME vs	<i>Aspergillus niger</i>	1,5
	<i>Penicillium velutinum</i>	1,5
	<i>Bacillus pantothenicus</i>	1,0
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1,5
	<i>Micrococcus sp</i>	1,5
ALT vs	<i>Penicillium velutinum</i>	0,5
	<i>Bacillus pantothenicus</i>	1,0
	<i>Agrobacterium sp</i>	1,5
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	3,0
	<i>Micrococcus luteus</i>	0,5
	<i>Micrococcus sp</i>	1,5
ALT-I vs	<i>Penicillium velutinum</i>	0,5
	<i>Nocardia sp</i>	1,0
	<i>Bacillus pantothenicus</i>	2,0
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1,5
	<i>Micrococcus sp</i>	1,0

AOH: Alternariol AME: Alternariol monometil éter ALT: Altenueno ATX-I: Alvertoxina I

4.7.1.2. Resultados de la producción de micotoxinas de *Penicillium citrinum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*

Los resultados de las cromatografías en capa fina, a través de las cuales se estudió la producción de citrinina por *Penicillium citrinum* y la producción de Fumonisina B₁ por *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*, se muestran en la Figura 35.

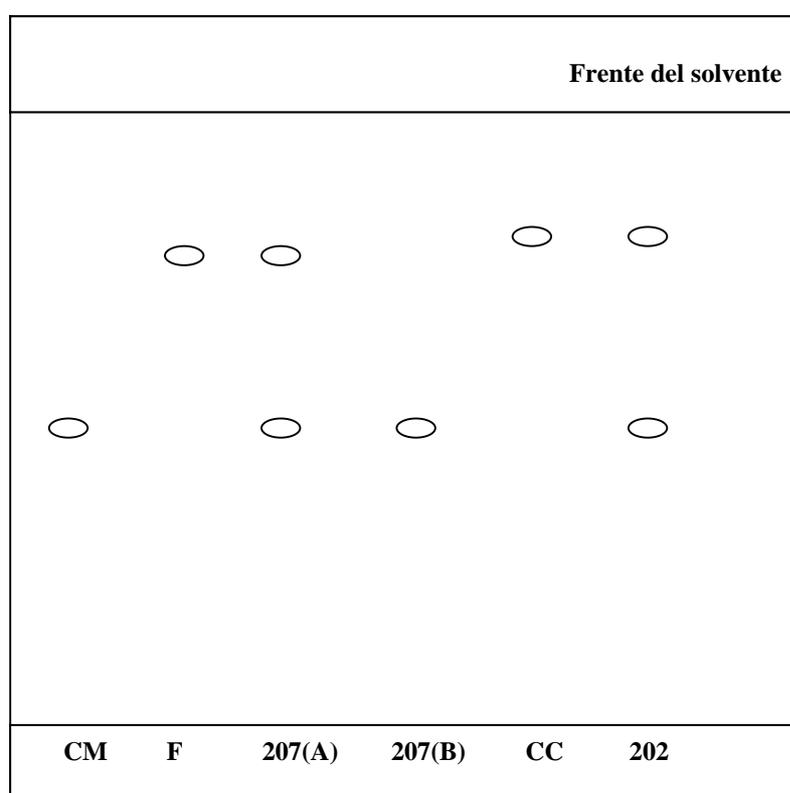


Figura 35. Cromatografía en capa fina de micotoxinas producidas por *Penicillium citrinum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*

CM: Control (Agar extracto de malta al 2%) F: Control Fumonisina B₁
207A: *Fusarium moniliforme* 207B: *Fusarium solani* CC: Control Citrinina
202: *Penicillium citrinum*

5. DISCUSIÓN

La discusión de los resultados se ha dividido en tres partes: La primera parte corresponde a la discusión de los resultados de la evaluación de las metodologías para el control microbiológico de los tapones de corcho, la segunda parte corresponde a la discusión de los resultados del recuento e identificación de los microorganismos aislados de las muestras y la tercera parte se refiere a la discusión de los resultados de la actividad metabólica de los microorganismos aislados.

5.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS TAPONES DE CORCHO

5.1.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PREPARACIÓN DE LOS TAPONES CONTROL

Todos los microorganismos utilizados para la inoculación de los tapones de corcho control forman parte de la microbiota de este producto y tienen gran importancia en la calidad de los mismos y de los vinos en contacto con ellos (Calvo y Agut 1996, Danesh *et al* 1997).

5.1.1.1. Discusión de los resultados de la inoculación de los tapones control por aerosol

Los resultados al aplicar el método de inoculación por aerosol, demuestran que no es el método apropiado para la preparación de tapones control, ya que los recuentos de las Unidades Formadoras de Colonia/tapón (UFC/tapón) en todas las mezclas aplicadas resultaron inferiores a 10.

5.1.1.2. Discusión de los resultados de la inoculación de tapones control por inmersión

Cuando se aplicó el método de inoculación de los tapones de corcho por inmersión, se observó que el mayor recuento de microorganismos (4×10^6 UFC/tapón) y como consecuencia el mayor porcentaje de recuperación de éstos en los tapones de corcho (35,8 %) se obtiene cuando los tapones de corcho están en contacto con el inóculo formado por la mezcla de *Aspergillus* y de *Penicillium* a una concentración de 10^7 UFC/ml durante 6 horas. Este mayor porcentaje de recuperación en los tapones coincidió con el bajo porcentaje de recuperación de microorganismos en el líquido decantado, lo que puede ser debido a que en este período de tiempo una mayor cantidad de microorganismos quede adherido al substrato.

Resultados semejantes se obtuvieron cuando el inóculo estaba formado por todas las especies de hongos filamentosos, levaduras y bacterias estudiadas, en el mismo período de tiempo y a la misma concentración. Se recuperaron en los tapones de corcho 7×10^6 UFC/tapón (44,9 %) y $1,2 \times 10^6$ UFC/ml (7,5 %) en el líquido decantado. Cabe destacar que de este 44,9 % de microorganismos recuperados en los tapones, el 41,7 % corresponde a hongos filamentosos.

Estos resultados indican que el tiempo óptimo en que los tapones de corcho deben estar en contacto con el inóculo es de 6 horas, ya que se observa en ambos casos la relación de los bajos porcentajes de recuperación de los microorganismos en el líquido decantado con el porcentaje de recuperación más elevado de éstos, en los tapones de corcho contaminados durante este período de tiempo, observándose diferencias significativas de los recuentos de microorganismos cuando los tapones están en contacto durante 6 horas con el inóculo y los recuentos obtenidos cuando se aplican otros tiempos de inoculación (3, 9 y 24 horas).

Es de hacer notar que cuando los tapones de corcho estuvieron en contacto con el inóculo durante 24 horas, el crecimiento de los microorganismos fue prácticamente nulo con todos los inóculos ensayados. Una posible explicación de este hecho, sería las propias características del substrato, ya que los microorganismos pueden haber penetrado en las lenticelas y quedar atrapados dentro de ellas, tal como lo han

demostrado Calvo *et al* en 1993, Calvo *et al* en 1995 y Rocha *et al* en 1996 y por tanto no se recuperan por el método de siembra aplicado.

En la recuperación individual de los microorganismos aplicados por inmersión en un lapso de 6 horas, se observa que el mayor porcentaje de recuperación se obtuvo para *Trichoderma viride* (14,4 %) y el menor porcentaje entre las cepas recuperadas correspondió a *Bacillus cereus* (0,7 %). No se recuperaron *Aspergillus fumigatus* ni *Paecilomyces variotii*.

El poder antagónico sobre otros hongos de *Trichoderma viride*, ha sido ampliamente estudiado (Barron 1972). Este poder antagónico está determinado por las propiedades antibióticas frente a otros hongos filamentosos y a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas que posee *T. viride*; y así mismo, por su habilidad saprofítica competitiva con otros microorganismos (Domsch *et al* 1980). Estas características parecen favorecer su crecimiento en detrimento del de otros microorganismos que componían la mezcla para inocular los tapones de corcho.

La competitividad entre los microorganismos y la producción de sustancias inhibidoras por algunos de ellos es común en cultivos mixtos (Mossel *et al* 1995), esto puede ser la causa de que no fuera recuperado *P. variotii* y *A. fumigatus* en los tapones de corcho después de la inoculación. Así también, cabe destacar, que al comparar el diámetro de los conidios de los hongos filamentosos utilizados en los inóculos y que son descritos por Samson *et al* en 1984, se pudo observar que los conidios de *A. fumigatus* tienen un diámetro menor al de los conidios de los demás hongos filamentosos y que la superficie lisa de los conidios de *P. variotii*, podría dificultar la adhesión al substrato de estos microorganismos.

Aspergillus niger fue el microorganismo que se recuperó en mayor proporción cuando se aplicaron mezclas de *Aspergillus* y de *Penicillium* en concentraciones de 10^9 y de 10^5 UFC/ml ($4,5 \times 10^8$ y 13×10^3 UFC/tapón respectivamente), correspondiendo estas cifras con los porcentajes de recuperación más elevados en comparación a los otros hongos filamentosos. Se observaron diferencias significativas entre el recuento de *A. niger* con los otros microorganismos inoculados.

Este hongo filamentoso posee ligeras propiedades antagónicas a otros hongos (Domsch *et al* 1980), lo que podría explicar su alto porcentaje de recuperación cuando se aplicó una mezcla de *Aspergillus* y de *Penicillium* en concentraciones de 10^9 y de 10^5 UFC/ml.

Cuando se inocularon los tapones de corcho con una suspensión de 10^9 UFC/ml de todas las especies de hongos filamentosos e igual concentración de levaduras y de bacterias, se observó que el mayor recuento de UFC/tapón se obtuvo con los hongos filamentosos ($9,5 \times 10^8$ UFC/tapón) a diferencia de las levaduras y bacterias de las que se obtuvo un recuento de 1×10^8 UFC/tapón en ambos casos. Existen diferencias significativas entre el recuento de hongos filamentosos y el recuento de levaduras y bacterias a esta concentración.

Se obtuvieron similares resultados cuando se inocularon los tapones de corcho con la misma mezcla de microorganismos, pero a una concentración de 10^5 UFC/ml. El mayor recuento de UFC/tapón corresponde a los hongos filamentosos (18×10^3 UFC/tapón). Dado que los recuentos para las bacterias fue de 5×10^3 UFC/tapón y los recuentos para las levaduras fue de $3,5 \times 10^3$ UFC/tapón, no existen diferencias significativas entre los recuentos de estos microorganismos.

En consecuencia, puede resumirse que el mayor porcentaje de recuperación, lo obtienen los hongos filamentosos cuando se aplicaron las suspensiones de todos los microorganismos a concentraciones de 10^9 y de 10^5 UFC/ml (39,6 % y 8,9 % respectivamente) y el menor porcentaje de recuperación (1,8 %) lo obtuvieron las levaduras, cuando se aplicó el inóculo a una concentración de 10^5 UFC/ml.

La sensibilidad de las levaduras a sustancias antibióticas y productos metabólicos de hongos filamentosos, sumado al invasivo crecimiento de estos últimos influye en la competitividad de las levaduras cuando se encuentran en poblaciones microbianas complejas, como es el caso de la microbiota del corcho (Danesh *et al* 1997), estas circunstancias podrían ser la causa de la baja recuperación de *Rhodotorula glutinis* cuando se aplicaron suspensiones de células de todos los microorganismos a diferentes concentraciones.

Se debe destacar que se obtienen mejores porcentajes de recuperación cuando se aplican a los tapones, inóculos a concentraciones elevadas, tanto en la mezcla de *Aspergillus* y de *Penicillium* como en la mezcla de todos los microorganismos, por tanto puede indicarse que existe una relación directa entre la concentración del inóculo y el porcentaje de recuperación obtenido.

5.1.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE REFERENCIA

5.1.2.1. Prueba de las soluciones de lavado

Los recuentos de las UFC/tapón de los microorganismos cuando se utilizaron solución fisiológica y solución Ringer _ como soluciones de lavado, tanto en Plate Count Agar (PCA) como Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), no presentaron diferencias significativas. Esto quiere decir que ambas soluciones de lavado pueden ser utilizadas indistintamente en la aplicación de la metodología de análisis microbiológico de este producto.

El mayor porcentaje de recuperación se obtuvo para *Aspergillus niger* tanto en PCA como en SDA con antibiótico, cuando se utilizó solución fisiológica o solución Ringer _ como soluciones de lavado. Así mismo, los menores porcentajes de recuperación fueron para *Acremonium strictum*, *Paecilomyces variotii* y *Aspergillus fumigatus*, en ambos medios de cultivo y con las dos soluciones de lavado. *Bacillus cereus* no fue recuperado en SDA, en ningún caso, ya que este medio de cultivo adicionado de antibiótico es selectivo para el aislamiento y diferenciación de hongos y además, debido a su bajo pH y alta concentración de glucosa dificulta el crecimiento de las bacterias (Sancho *et al* 1989).

5.1.2.2. Prueba de la velocidad de lavado

No se observaron diferencias significativas en el recuento de los microorganismos inoculados previamente a los tapones de corcho, cuando se utilizaron velocidades de

lavado de 150 o de 200 r.p.m., en ambos medios de cultivo (PCA y SDA). Se puede observar que el recuento de las UFC/tapón es significativamente inferior cuando se utiliza una velocidad de lavado de 100 r.p.m., tanto a partir de cultivos en PCA como en SDA. Esto indica que velocidades de lavado superiores a 100 r.p.m. pueden favorecer el desprendimiento de los microorganismos del sustrato.

De igual forma que con las soluciones de lavado, *A. niger*, es el microorganismo que obtiene el mayor porcentaje de recuperación en todas las velocidades de lavado aplicadas. Los microorganismos con menor porcentaje de recuperación en PCA son *Acremonium strictum* y *Rhodotorula glutinis* con las tres velocidades de lavado, en SDA, *Acremonium strictum* tiene el menor porcentaje de recuperación y *Bacillus cereus* no se recupera.

5.1.2.3. Prueba del tiempo de lavado

Se puede observar que se obtienen mayores recuentos de microorganismos a partir de los 30 minutos de lavado y no se observan diferencias significativas en los recuentos de las UFC/tapón a partir de este tiempo. Aplicando el tiempo de lavado propuesto en este estudio se acortaría el tiempo de aplicación establecido por la Norma Catalana 0.20/95.

Los resultados obtenidos de la determinación de los porcentajes de recuperación de cada uno de los microorganismos inoculados son comparables a los ya señalados para las pruebas de las soluciones y velocidad de lavado.

5.1.2.3. Prueba de los medios de cultivo

Los recuentos de las UFC/tapón, tras la siembra de los filtros en los diferentes medios de cultivo, se mantienen uniformes y no se observan diferencias significativas entre ellos.

Cabe destacar que cuando se utilizó Triptona de Soja Agar (TSA) como medio de cultivo, la totalidad del recuento a las 24 horas de incubación correspondió sólo a bacterias. La composición de este medio a base de peptona de soja y peptona de caseína

aunada a un pH ligeramente alcalino, proporciona condiciones favorables para el crecimiento y aislamiento de bacterias.

El recuento de las UFC/tapón en los diferentes medios de cultivo probados para el aislamiento de hongos filamentosos y levaduras: Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), WL Nutritivo Agar (WLN), Extracto de malta Agar al 2 % (AEM) y Rosa de Bengala Agar (RBA), indican que todos son apropiados para tal fin. Sin embargo, se puede observar recuentos ligeramente más elevados en SDA y no se debe restar importancia al medio RBA, ya que es un medio de cultivo específico para la determinación de hongos filamentosos y levaduras en muestras de alimentos, que además inhibe el crecimiento expansivo de *Zygomycetes* (Sancho *et al* 1989).

5.1.2.5. Prueba del tiempo de incubación

Se pudo observar que el tiempo óptimo de incubación es de 24- 48 horas para bacterias y hongos, a partir de este tiempo algunos hongos filamentosos de crecimiento expansivo no permiten la observación y el recuento de otros microorganismos.

El mayor porcentaje de recuperación en TSA a las 24 horas de incubación es para *Bacillus cereus* y en SDA, sigue siendo para *Aspergillus niger*.

5.1.2.6. Prueba de la temperatura de incubación

No se observaron diferencias significativas en el recuento de las bacterias y en el recuento de los hongos filamentosos y levaduras cuando se incubaron a diferentes temperaturas, por lo que se puede utilizar $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, como temperaturas de incubación en TSA para bacterias y en SDA para hongos, respectivamente.

Los mayores porcentajes de recuperación en SDA, al igual que a lo largo de todos los ensayos, se obtiene para *A. niger*. Las posibles causas de este hecho, pueden radicar en las características de los conidios de este hongo filamentosos, lo que le facilita su

adhesión al sustrato y a las propiedades antagónicas a otros microorganismos, que ya fueron comentadas.

5.1.2.7. Resumen de los resultados de la evaluación del método de referencia

Después de analizar los resultados obtenidos en la evaluación del método de referencias (Norma Catalana 0.20/95), se puede indicar, a modo de resumen, que la metodología propuesta en el presente estudio, para el análisis microbiológico de tapones de corcho para vinos, es la siguiente: Se pueden utilizar solución fisiológica estéril o solución Ringer _ estéril como solución de lavado, lavar los tapones por 30 minutos a 150 o 200 r.p.m., los filtros se deben sembrar sobre TSA a $37\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por 24 horas para la recuperación y recuento de bacterias y sobre SDA a $28\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ por 48 horas para la recuperación y recuento de hongos filamentosos y levaduras.

5.1.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS

5.1.3.1. Comparación de la metodología establecida por la Norma 0.20/95 y la metodología propuesta en este estudio

Al comparar los resultados obtenidos al aplicar la metodología establecida por la Norma 0.20/95 y la metodología propuesta en este estudio, se observa que se obtienen mayores porcentajes de recuperación de las bacterias cuando se aplica la metodología propuesta. Sin embargo, se observa que los porcentajes de recuperación de hongos filamentosos y levaduras son semejantes en las dos metodologías.

Básicamente la diferencia entre ambos métodos es la utilización de diferentes medios de cultivo para la recuperación de las bacterias. A pesar de que los dos medios de cultivo utilizados, Plate Count agar (PCA) en la Norma 0.20/95 y Triptona de soja agar (TSA) en la metodología propuesta, son medios de cultivos básicos para la recuperación y recuento de bacterias, el menor porcentaje de recuperación de estos microorganismos en PCA se puede deber a que la concentración peptona y dextrosa de este medio de cultivo

puede favorecer el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras en detrimento del crecimiento de las bacterias.

5.1.3.2. Comparación de la metodología propuesta por la Norma ISO 10718:1993 y la metodología propuesta en este estudio

El crecimiento invasivo de todos los microorganismos, en especial de los hongos filamentosos, impidió el recuento de éstos sobre las placas de medios de cultivo, cuando se aplicó la metodología establecida por la Norma ISO 10718:1993 para el análisis microbiológico de los tapones de corcho para vinos.

Estos resultados se pueden deber al hecho de que la mencionada Norma utiliza extracto de malta añadido de ácido tartárico y etanol como solución de lavado (con el propósito de investigar la presencia de microorganismos capaces de crecer en medio alcohólico y ácido como son los vinos) y un tiempo de lavado de 24 horas. El extracto de malta es un medio líquido de enriquecimiento para hongos que unido al largo tiempo de lavado, facilita el desarrollo de los hongos y en consecuencia, aumenta considerablemente el número de microorganismos existentes en las muestras, obteniéndose de esta forma resultados irreales.

Así mismo, se debe tener en cuenta la importancia que tiene la presencia de otros microorganismos que no son capaces de desarrollarse en los vinos, por su poca capacidad de supervivencia en medios alcohólicos, pero sí en los tapones y cuyos productos metabólicos pueden contaminar los vinos en contacto con ellos y que aplicando la metodología propuesta por la Norma no pueden ser detectados.

El recuento y la diversidad de especies de hongos filamentosos encontrados en vinos y sus respectivos tapones de corcho indican una mayor frecuencia en los tapones de corcho que en los vinos y la detección de compuestos organoclorados en los últimos se encuentra relacionado con el grado de colonización del tapón por los hongos filamentosos (Navascués 1998).

5.1.3.3. Comparación del método de las diluciones decimales seriadas y la metodología propuesta en este estudio

Cuando se comparan ambas metodologías, se puede observar que se obtienen porcentajes de recuperación aceptables en el método de las diluciones decimales seriadas con inóculos a concentraciones elevadas de microorganismos (10^9 y 10^7 células/ml), no así, en la metodología propuesta, ya que el crecimiento invasivo de los hongos filamentosos sobre los filtros impide el recuento de las UFC/tapón a estas concentraciones.

En cambio, se observa que es posible realizar los recuentos de microorganismos con la metodología propuesta, cuando los inóculos tienen una baja concentración de microorganismos (10^2 células/ml de inóculo), en comparación con la nula recuperación de microorganismos (0 %) por el método de las diluciones decimales seriadas.

Estos resultados corresponden con los principios de cada uno de los métodos, ya que uno diluye la carga microbiana presente en las muestras y el otro concentra a través del filtrado sobre membranas los microorganismos presentes, por lo que se recomienda la utilización del método de las diluciones decimales seriadas para muestras muy concentradas y el uso de la metodología propuesta en este estudio para muestras poco contaminadas, que debe ser lo adecuado en tapones de corcho para uso enológico.

5.1.3.4. Comparación del método Miliflex-100® y la metodología propuesta en este estudio

Los porcentajes de recuperación de los microorganismos inoculados a los tapones de corcho, son semejantes cuando se aplican ambas metodologías, esto se debe a que también son semejantes en los parámetros que utilizan para el análisis microbiológico, diferenciándose sólo en la composición de los medios de cultivo utilizados, lo cual no afecta los resultados obtenidos, por lo que los dos métodos pueden ser utilizados para el análisis microbiológico de tapones de corcho para vinos.

5.1.3.5. La metodología propuesta aplicada a diferentes tipos de tapones de corcho

Como se ha explicado anteriormente, los tapones de corcho para vinos tranquilos provienen de un proceso de fabricación diferente a los tapones de corcho para vinos espumosos, por lo que se ha creído apropiado aplicar la metodología propuesta a los dos tipos de tapones a fin de establecer la aplicabilidad de esta metodología a los dos tipos de muestras.

No se observan diferencias significativas entre los porcentajes de recuperación de los microorganismos cuando se aplica la metodología propuesta a los tipos de tapones de corcho.

5.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DEL RECuento E IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN MUESTRAS DE CORCHO PARA VINOS TRANQUILOS Y VINOS ESPUMOSOS

5.2.1. RECuento DE HONGOS FILAMENTOSOS, LEVADURAS Y BACTERIAS EN LAS MUESTRAS DE TAPONES DE CORCHO

Los recuentos de las UFC/tapón de las bacterias en las muestras de tapones para vinos espumosos oscilaron entre 4 y 24 UFC/tapón, valores que se ajustan a los límites aceptables por la Norma Catalana 0.10/95 para este producto (< 30 UFC/tapón). Cabe resaltar, el crecimiento de 1 UFC/tapón en la muestra N° 4, sembrada en Agar Mc Conkey, lo que indica la presencia de Enterobacterias en esta muestra.

Los recuentos de las UFC/tapón de hongos filamentosos y levaduras en estas muestras fueron superiores a 100, en 4 de las 6 muestras y en las dos restantes los recuentos fueron superiores a 10 UFC/tapón, el cual es el límite aceptable por la mencionada Norma. Estos resultados demuestran que los elevados recuentos de microorganismos en estos productos pueden estar originado en las características del proceso de producción de los mismos, ya que no se incluye el lavado de los tapones semielaborados.

En cuanto a los recuentos de las UFC/tapón de las bacterias en las muestras de tapones de corcho para vinos tranquilos, se observa que también se encuentran dentro de los límites de aceptabilidad por la Norma Catalana y que éstos coinciden en la mayoría de las muestras con los resultados obtenidos por Calvo y Agut en 1996, Navascués en 1998 y Pi en 1997.

Se debe destacar que la muestra N° 2 estaba adicionada de SO₂, sustancia utilizada para retrasar el crecimiento de microorganismos en los tapones de corcho, pero los resultados obtenidos en los recuentos de los microorganismos en esta muestra no difieren con los obtenidos en la mayoría de las muestras, estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Davis *et al* en 1982 en los cuales la adición de SO₂ no influye en la disminución de la microbiota presente en los tapones de corcho para vinos.

A pesar de que a simple vista, se observó que la cantidad de hongos filamentosos era menor en las muestras de tapones para vinos tranquilos, el crecimiento de *Monilia sitophila* impidió el recuento de las UFC/tapón en la totalidad de las muestras.

Monilia sitophila es un hongo filamentoso, común en suelo y vegetales, cuyo micelio vegetativo caracterizado por hifas erectas y laxas, crece extremadamente rápido, ocupando las placas de cultivo en pocos días (Barron 1972, Ellis y Ellis 1985).

5.2.2. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS, LEVADURAS Y BACTERIAS

Los hongos filamentosos y levaduras aisladas de las muestras de tapones de corcho para vinos espumosos y vinos tranquilos corresponden con los descritos por diversos autores como pertenecientes a la microbiota del corcho.

Estos hongos filamentosos y levaduras también son aislados de suelo, aire, diversas materias vegetales en descomposición, son importantes contaminantes de alimentos y algunas especies son patógenas de plantas y animales, incluido el hombre (Barron 1972,

Cosalari *et al* 1995, Domsch *et al* 1980, Frazier y Westhoff 1993, Pitt y Hocking 1985, Ramírez 1982, Samson *et al* 1984).

Cabe destacar, que no se evidenció *Penicillium frequentans*, uno de los hongos filamentosos, reportado por algunos autores (Castera-Rossignol 1983, Lefebvre *et al* 1983, Schaeffer *et al* 1978), como el más frecuentemente aislado de este sustrato. Sin embargo, la ausencia de *Penicillium frequentans* en las muestras procesadas en este estudio coincide con lo reportado por Navascués en 1998.

Se observó una mayor diversidad de especies de hongos filamentosos y levaduras en las muestras de tapones para vinos espumosos que en las muestras de vinos tranquilos, que puede estar originada por la falta de lavado de este producto, como ya se comentó.

Las levaduras aisladas pertenecen a los géneros *Rhodotorula* y *Candida*, estos grupos de microorganismos fueron descritos por Bureau *et al* en 1974 como causantes de gustos anormales en champañas.

De igual forma, se observó una mayor diversidad de especies bacterianas en las muestras de tapones para vinos espumosos, destacando las especies de *Bacillus* (*B. cereus*, *B. firmus*, *B. lentus*, *B. circulans*, *B. pantothenicus*), presentes en la mayoría de las muestras, tanto de tapones para vinos espumosos como para vinos tranquilos.

Bacillus es un género bacteriano formado por bacilos Gram-positivos formadores de endosporas muy resistentes a condiciones adversas. Su hábitat es el suelo y juega un papel importante como contaminante de alimentos y también es conocido como productor de enfermedades en el hombre (Andersson *et al* 1995, Dufrenne *et al* 1994, Frazier y Westhoff 1993, Holt 1986).

Las restantes bacterias aisladas de los tapones de corcho, corresponden a una de variedad de cocos Gram-positivos (*Micrococcus sp* y *M. luteus*), cocos Gram-negativos (*Acinetobacter lowffii*), Bacilos Gram-positivos (*Nocardia sp* y *Streptomyces sp*) y Bacilos Gram-negativos (*Agrobacterium sp*, *Achromobacter sp* y *Aeromonas sp*), incluyendo en este último grupo a *Erwinia herbicola*, que correspondió a la Enterobacteria aislada en Mc Conkey. En su totalidad, estas bacterias son aisladas del

medio ambiente (agua, suelos, plantas); sin embargo, pueden ser patógenas para el hombre, animales y plantas (Barrow y Felthman 1993, Frazier y Westhoff 1993, Krovacek *et al* 1995, Merino *et al* 1995).

Cabe destacar que *Streptomyces sp* es conocido como un microorganismo que degrada la lignina por medio de mecanismos oxidativos que involucran desmetilaciones de anillos aromáticos, sus rupturas y ataques oxidativos sobre cadenas fenilpropiónicas, produciendo finalmente guayacol, con el consabido “sabor a corcho” de los vinos. Sin embargo, la descomposición química de la lignina, también puede ser responsable de bajas concentraciones de guayacol en los vinos madurados (Petty y Crawford 1984, Simpson 1990).

De forma general, la acidez, el contenido en carbohidratos, la concentración de etanol, la concentración de taninos, la cantidad de dióxido de azufre y la ausencia de aire en los vinos en contacto con los tapones de corcho y en consecuencia con los microorganismos mencionados anteriormente, hace improbable el desarrollo de éstos, pero sin embargo, debe tenerse en cuenta que algunos microorganismos como bacterias acéticas (oxidan el alcohol a ácido acético), bacterias lácticas (producen ácido a partir de glucosa y fructosa), levaduras silvestres (procedentes de las uvas utilizadas para elaborar el mosto) y algunos hongos filamentosos (*Mucor*, *Penicillium* y *Aspergillus*), son capaces de originar alteraciones en los vinos. Las alteraciones observadas con mayor frecuencia son: Agriado, turbidez, ennegrecimiento y pardeamiento al aire (Frazier y Westhoff 1993, Ubeda y Briones 1999).

Así mismo, la relación que existe entre la presencia de distintas cepas de *Penicillium* y las concentraciones de compuestos organoclorados como el 2,4,6-tricloroanisol en los tapones de corcho con el “gusto a corcho” en los vinos están ampliamente documentada; sin embargo, debe tenerse en cuenta que el 2,4,6-tricloroanisol también puede ser originado por la degradación de compuestos fenólicos por parte de otros hongos como pueden ser: *Paecilomyces varitii* y *Phanerochaete chrysosporum* (Joshi y Gold 1993, Valli y Gold 1991, Whitfield *et al* 1991b).

5.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE ACTIVIDAD METABÓLICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

A continuación se discutirán los resultados obtenidos del estudio de la actividad enzimática, de la actividad inhibitoria y de la producción de micotoxinas

5.3.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

5.3.1.1. Actividad enzimática de los hongos filamentosos y levaduras aislados

Las enzimas producidas por todas las especies de hongos filamentosos y levaduras aislados fueron: esterasa (C_1), esterasa lipasa y naftol- A-S-BI-fosfohidrolasa, son producidas por la mayoría de ellos: Fosfatasa alcalina y β -glucosidasa.

Las esterases son enzimas extracelulares producidas por hongos filamentosos, levaduras y bacterias, las cuales actúan rompiendo los enlaces ésteres, atravesando polisacáridos de la pared celular y la lignina y de ese modo permite que la pared celular donde actúan se haga más accesible a la acción de las hidrolasas, las cuales actúan hidrolizando compuestos de altos pesos moleculares como carbohidratos y proteínas (Christov y Prior 1993, Mc Dermid *et al* 1997, Smith 1983).

Las lipasas son enzimas lipolíticas originadas, entre otros, por microorganismos, cuya propiedad más importante es la hidrólisis de ésteres de ácidos grasos, para la obtención de energía y crecimiento celular. Pueden ser producidas por hongos filamentosos y levaduras, entre ellos destacan las especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Candida*. En el ámbito industrial las lipasas son utilizadas para elaborar diferentes sabores y fragancias (Balcão *et al* 1996, Mannesse *et al* 1997, Talon *et al* 1996).

En la degradación de la celulosa a glucosa, juega un papel primordial la β -glucosidasa. Esta enzima se encuentra asociada a la celulasa, la cual es un complejo enzimático

formado por endo y exoglucanasas que son indispensables para la completa hidrólisis de la celulosa (Dass *et al* 1997, Pedraza-Reyes y Gutierrez-Corona 1997, Ratledge 1994, Sternberg 1976).

Los hongos filamentosos que presentaron mayor actividad enzimática fueron: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* y *Monilia sitophila*.

Se debe resaltar la marcada actividad fosfatasa ácida y naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa (40 nanomoles) que se detectó en *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium moniliforme* y *Monilia sitophila*.

Como se ha indicado anteriormente, los tapones de corcho representan un substrato adecuado para el crecimiento de los hongos filamentosos y levaduras aislados de las muestras y si sumamos a esta característica la elevada actividad enzimática presentada por estos microorganismos, se puede esperar que la calidad de los tapones de corcho se vea afectada.

Mención especial merece *Monilia sitophila*, este hongo filamentosos es considerado un contaminante indeseable tanto de las planchas de corcho como de los tapones ya terminados, debido a su crecimiento invasivo, esta característica aunada a su marcada actividad hidrolasa, fosfatasas y β -glucosidasa hace que el crecimiento de este microorganismo deba ser controlado.

5.3.1.2. Actividad enzimática de las bacterias aisladas

La actividad enzimática de las bacterias aisladas, se caracterizó por una moderada producción de naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa por parte de todas las especies, seguida de la producción de leucina arilamidasa, esterasa (C₁) y esterasa lipasa.

La bacteria que mayor actividad enzimática presentó fue *Aeromonas sp*; este resultado coincide con la caracterización enzimática, por el sistema API ZYM, de *Aeromonas*

aislada del medio ambiente por Waltman *et al* en 1982 y con la actividad enzimática descrita para ese microorganismo por Merino *et al* en 1995.

Cabe destacar que ninguno de los microorganismos aislados presentaron las siguientes actividades: tripsina, α -manosidasa y β -manosidasa.

5.3.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

Como ya se ha mencionado, la microflora presente en los tapones de corcho es variada y compleja. La presencia o ausencia de ciertos microorganismos en este sustrato va a depender de diversos factores, entre ellos se pueden mencionar: la humedad, la temperatura, la velocidad de crecimiento y las relaciones de sinergismo o antagonismo que se pueden dar entre ellos (Adams y Moss 1997).

Así mismo, la producción de metabolitos como enzimas, antibióticos y toxinas pueden influir en la capacidad de unos microorganismos para inhibir el crecimiento de otros.

5.3.2.1. Actividad inhibitoria de los hongos filamentosos y levaduras aisladas

Los resultados obtenidos demuestran que los hongos filamentosos aislados de las muestras que poseen mayor actividad contra otros hongos filamentosos y levaduras presentes en los tapones de corcho son *Penicillium citrinum* y *Trichoderma viride*, destacando esta última, por su capacidad adicional de inhibir parcialmente la esporulación de *Aspergillus niger* y de *Penicillium velutinum* y por la producción de halos inhibitorios de mayor tamaño cuando estaba en contacto por su zona micelial con los otros microorganismos.

Trichoderma viride, es un hongo filamentosos que se caracteriza por un crecimiento extremadamente rápido (colonias de 4,5 a 7,5 cm en 5 días) y especialmente por su actividad antagonista y parasitaria para otros hongos filamentosos, levaduras y bacterias; particularmente contra *Fusarium solani* y especies de *Mucor* y *Rhizopus*

(Domsch *et al* 1980, Samson *et al* 1984), lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio. Así mismo, *Trichoderma viride* ejerce su capacidad inhibitoria produciendo compuestos con actividad antibiótica y antifúngicas tales como la tricodermina, tricotecina y la tricotoxina A (Samson *et al* 1984).

Igualmente, *Penicillium citrinum* también ha sido descrito como un hongo filamentoso con actividad antagonista contra hongos y bacterias y como productor de metabolitos con propiedades fungistáticas y antibióticas como son la citrinina y la sideramina (Samson *et al* 1984).

De manera general, se observa que la mayoría de los hongos filamentosos y levaduras aisladas de las muestras presentan actividad inhibitoria contra los hongos filamentosos no presentes en las muestras, destacando *T. viride*, seguido de *P. citrinum*, *A. niger*, *F. moniliforme* y *F. solani*. Ésta puede ser la causa por la cual no se aislaron *Penicillium frequentans*, *Aspergillus flavus*, *Acremonium strictum* y *Rhizopus arrhizus* en las muestras, a pesar de que forman parte de la microbiota del corcho.

El hongo filamentoso que resultó ser más sensible a la actividad inhibitoria de otros hongos filamentosos fue *Penicillium velutinum*, ya que además de observarse halos inhibitorios, su capacidad esporulativa se ve afectada parcial o totalmente en la mayoría de los casos. De modo contrario, *T. viride* resultó ser el hongo filamentoso más resistente a la actividad inhibitoria de los otros hongos.

Los hongos filamentosos y levaduras que presentaron mayor actividad inhibitoria contra las bacterias fueron: *Penicillium citrinum* y *Mucor plumbeus*, seguidos de *Alternaria alternata*, *Fusarium solani* y *Rhodotorula glutinis*; sin embargo, todos los hongos, a excepción de *Candida ciferri*, tienen actividad inhibitoria contra las bacterias aisladas.

Las especies del género *Bacillus*, particularmente *B. lentus* y *B. cereus* son los más sensibles a la actividad inhibitoria de los hongos filamentosos. En el caso contrario, se encuentra *Aeromonas sp*, la cual resultó ser la bacteria más resistente.

5.3.2.2. Actividad inhibitoria de las bacterias aisladas

La escasa actividad inhibitoria de las bacterias aisladas contra los hongos filamentosos y levaduras se observó de forma general en comparación con los resultados obtenidos de la actividad inhibitoria de estos últimos contra las bacterias.

Sin embargo, se observó que *Agrobacterium sp*, fue la bacteria que presentó mayor actividad inhibitoria contra los hongos filamentosos y levaduras. Así mismo, se debe destacar, que la actividad inhibitoria de algunas bacterias, se caracterizó por inhibir parcialmente la capacidad de esporulación de algunos hongos filamentosos en contacto con ellas; particularmente, *A. niger* y *T. viride* se muestran sensibles en su capacidad de esporulación.

La mayor actividad inhibitoria contra otras bacterias, la presentaron *Nocardia sp* y *Agrobacterium sp*. Por el contrario, *Bacillus cereus*, *B. firmus* y *Micrococcus luteus* no presentaron actividad inhibitoria contra hongos filamentosos, levaduras ni bacterias.

Se debe resaltar, la poca actividad inhibitoria de *Monilia sitophila* (sólo contra *A. niger* y *A. fumigatus*), así como también su resistencia ante los demás microorganismos. Los resultados obtenidos demuestran que este microorganismo no produce halos inhibitorios en la mayoría de los microorganismos enfrentados a ella, pero tampoco se observa que éstos influyan en su crecimiento, lo que indica que existe una competencia por el espacio, evidenciada por su crecimiento invasivo. Esta característica ha de tomarse en cuenta, ya que este hongo filamentosos se encontró presente en todas las muestras analizadas en este estudio.

5.3.3. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS CROMATOGRAFÍAS EN CAPA FINA

El objetivo de esta prueba fue investigar la producción de compuestos por parte de los hongos filamentosos y levaduras, que difundieran al medio de cultivo y posteriormente determinar la actividad inhibitoria de los mismos frente a otros microorganismos.

Las huellas cromatográficas obtenidas tras la realización de las cromatografías en capa fina de los discos de cultivos fúngicos, revelaron la separación de 7 fracciones con diferentes Rf originadas por *Alternaria alternata* y una fracción originadas de cada una de las siguientes especies: *Penicillium citrinum*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Fusarium moniliforme* y *Penicillium velutinum*. Se observó una fracción común a todas las especies probadas que correspondió al control (disco de agar extracto de malta al 2 %).

No se observaron huellas cromatográficas de *Mucor plumbeus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *Rhodotorula glutinis* ni *Candida ciferri*.

5.3.3.1. Actividad inhibitoria de las fracciones de los hongos filamentosos obtenidas por cromatografía en capa fina

La actividad inhibitoria de las fracciones producidas por los hongos filamentosos contra otros microorganismos, resultó ser bastante menor a la obtenida cuando se pusieron en contacto directo los discos de los microorganismos frente a las cepas en estudio.

Estos resultados se pueden deber, a que la cantidad de inóculo, en este caso fue menor, ya que no estaban presentes los hongos filamentosos y la concentración de las sustancias difundidas al medio del cultivo pudo ser más baja.

Sin embargo, estas fracciones presentaron actividad inhibitoria contra los microorganismos que ya habían mostrado su sensibilidad ante los discos de los hongos filamentosos ensayados, a excepción de *Erwinia herbicola* y *Agrobacterium sp* que no mostraron sensibilidad ante los discos de *Fusarium moniliforme*, pero sí frente a la fracción originada por él.

5.3.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS

5.3.4.1. Producción de micotoxinas de *Alternaria alternata*

Al comparar las 7 fracciones de *Alternaria alternata* obtenidas por cromatografía en capa fina con los controles de ácido tenuazoico, altertoxina I, alternariol, alternariol monometil éter y tentoxina, se puede observar que la cepa de *A. alternata* aislada sólo produce: altertoxina I, altenueno, alternariol y alternariol monometil éter. Las 3 fracciones restantes no fueron identificadas y fueron denominadas 201A, 201B y 201C.

A. alternata no produjo ácido tenuazoico ni tentoxina, en las condiciones experimentales de este estudio. La producción de tentoxina está condicionada a una cantidad limitada de fosfato en el medio de cultivo (Ramm *et al* 1994), lo que ha podido influir en estos resultados.

El ácido tenuazoico, es descrito por Stinson *et al* en 1980, como una micotoxina que puede ser producida en cultivos por numerosas especies de *Alternaria* aisladas de diversas fuentes y es considerado como la sustancia tóxica más importante de *A. alternata*, aunque su producción se ve influenciada por la concentración de nitrógeno en el medio de cultivo. Sin embargo, la *A. alternata* aislada en este estudio no produjo ácido tenuazoico.

De forma general, la producción de micotoxinas por *A. alternata* se encuentra condicionada a una alta actividad de agua, a la temperatura de incubación, el pH del substrato y el tipo de substrato en el cual crece el microorganismo (Burroughs *et al* 1976, Magan *et al* 1984)

Al analizar los resultados obtenidos de la actividad inhibitoria de las fracciones de *A. alternata*, se puede observar que estas coinciden con la actividad inhibitoria de los discos de cultivo de este microorganismo.

Así mismo se debe destacar que las micotoxinas producidas tienen actividad inhibitoria sobre diversos microorganismos, especialmente el arternariol y el altenueno ejercen su acción inhibitoria sobre una mayor cantidad de hongos filamentosos y bacterias que alternariol monometil éter y altertoxina I. Los microorganismos más sensibles a la acción inhibitoria de las micotoxinas producidas por *Alternaria alternata* fueron: *Penicillium velutinum*, *Bacillus pantothenicus*, *Acinetobacter sp* y *Micrococcus sp*.

5.3.4.2. Producción de micotoxinas por *Penicillium citrinum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*

Los resultados obtenidos demuestran la producción *in vitro* de citrinina por *Penicillium citrinum* y de fumonisina B₁ por *Fusarium moniliforme*, ya que las fracciones separadas por cromatografía en capa fina de estos hongos, coinciden con los controles para tales micotoxinas. *Fusarium solani* no produjo fumonisina B₁.

La citrinina posee propiedades antibióticas, bacteriostáticas, antifúngicas y antiprotozoarias (Franco *et al* 1996), por lo que es posible que la actividad inhibitoria que presentan los discos de *Penicillium citrinum* cuando hacían contacto con otros microorganismos, por la zona del medio de cultivo, se deba a la difusión de la citrinina producida al medio de cultivo.

Al igual que las micotoxinas producidas por *A. alternata*, la producción de citrinina y de fumonisina B₁ dependen de la actividad de agua (*F. moniliforme* no produce fumonisinas a una actividad de agua por debajo de 0,87), el pH del medio, la temperatura y el período de incubación de *Penicillium citrinum* y *Fusarium moniliforme* (Alberts *et al* 1990, Montani *et al* 1988, Sweeney y Dobson 1998, Wheeler *et al* 1991).

CONCLUSIONES

1. Los porcentajes de recuperación de los microorganismos inoculados a los tapones de corcho control por el método de inmersión, son directamente proporcionales a la concentración de éstos en el inóculo inicial.
2. El tiempo óptimo de contacto de los tapones de corcho control con el inóculo, por el método de inmersión, para todas las mezclas de microorganismos y en todas las concentraciones utilizadas fue de 6 horas.
3. La metodología para el análisis microbiológico de tapones de corcho para vinos, propuesta en este estudio, indica que se pueden utilizar solución fisiológica estéril o solución Ringer $\frac{1}{4}$ estéril como solución de lavado, lavar los tapones por 30 minutos a 150 o 200 r.p.m., los filtros se deben sembrar en triptona de soja agar (TSA) a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para la recuperación y recuento de bacterias y en Sabouraud dextrosa agar (SDA) adicionado de antibiótico a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas para la recuperación y recuento de hongos filamentosos y levaduras.
4. La comparación de la metodología propuesta en este estudio con otras metodologías indica que el crecimiento invasivo de los microorganismos impide el recuento de los mismos cuando se aplica la Norma ISO 10718:1993, que el método de las diluciones decimales seriadas es apropiado para muestras muy contaminadas y que no se observan diferencias en los recuentos cuando se aplica el Sistema Miliflex-100[®].
5. Los recuentos de las UFC/tapón de las bacterias en las muestras de tapones de corcho para vinos espumosos y vinos tranquilos se ajustan a los límites aceptables por la Normas Catalanas 0.10/95 y 0.20/95 para este producto.
6. Los recuentos de las UFC/tapón de los hongos filamentosos y levaduras en las muestras de tapones de corcho para vinos espumosos y vinos tranquilos no cumplen los límites de aceptabilidad de las Normas Catalanas 0.10/95 y 0.20/95.

7. Los géneros y especies de hongos filamentosos, levaduras y bacterias aislados de las muestras de tapones de corcho coinciden con la microbiota descrita previamente para este sustrato.
8. Todos los microorganismos aislados presentan actividad enzimática naftol-A-S-BI-fosfohidrolasa. Los microorganismos que presentan mayor variedad enzimática son: *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* y *Monilia sitophila*.
9. Los microorganismos que presentan mayor actividad inhibitoria contra los hongos filamentosos, levaduras y bacterias estudiadas son: *Penicillium citrinum* y *Trichoderma viride*.
10. Bajo las condiciones experimentales aplicadas en este estudio y a partir de las cepas aisladas, *Alternaria alternata* es capaz de producir: altertoxina I, altenueno, alternariol y alternariol monometil éter. *Penicillium citrinum*, citrinina y *Fusarium moniliforme*, fumonisina B₁.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams M.R. y Moss M.O. (1997). Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia S.A. España. 464 pp.
- Agut M. (1992). Estudio de la influencia de factores mediales y enzimáticos sobre la capacidad antibiótica del género *Arthrinium*. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Barcelona. España. 282 pp.
- Agut M., Mola R. y Calvo M.A., (1996). Microfungal diversity in catalonian oak forests, Spain. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 133-134.
- Alberts J.F., Gelderblom W.C.A., Thiel P.G., Marasas W.F.O., Van Schalkwyk D.J. y Behrend Y. (1990). Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1729-1733.
- Alexopoulos C.J. y Mims C.W. (1985). Introducción a la Micología. John Wiley & Sons, INC. USA. 638 pp.
- Andersson A., Ronner U. y Granum P.E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?. *International Journal of Food Microbiology* **28**: 145-155.
- Armendariz J. (1996). Control de calidad del corcho. *Vitivinicultura* **74-75**: 50-52.
- Azzena M., Falqui A. y Filigheddu G. (1996). Experiments on cork oak propagation by grafting. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 127-128.

- Balcão V.M., Paiva A.L. y Malcata F.X. (1996). Bioreactor with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology* **18**: 392-416.
- Barron G. L. (1972). The genera of Hyphomycetes from soil. Robert E. Krieger Publishing Company. USA. 364 pp.
- Barrow G.I., Feltham R.K. (Ed). (1993). Cowan and Steel's. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press. Gran Bretaña. 331 pp.
- Beldman G., Searle-Van Leeuwen M., Rombouts F. y Voragen F. (1985). The cellulase of *Trichoderma viride*. Purification, characterization and comparison of all detectable endoglucanases, exoglucanases and β -glucosidases. *European Journal of Biochemistry* **146**:301-308.
- Bertrand A. y Barrios M.L. (1994). Contamination de bouchons par les produits de traitements de palettes de stockage des bouteilles. *Revue Française d' Oenologie* **149**: 29-32.
- Boidron J.N., Lefebvre A., Riboulet J.M. y Ribereau-Gayon P (1986). Les substances volatiles susceptibles d'être cédées au vin par le bouchon de liège. *Sciences del Aliments* 4: 609-616.
- Bourgeois C.M., Mescle J.F. y Zucca J. (1996). Microbiología alimentaria-aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Editorial Acribia, S.A. España. 437 pp.
- Brock T.D. y Madigan M.T. (1993). Microbiología. Prentice Hall Hispanoamericana S.A. Mexico. 956 pp.
- Bu'Lock J. D. (1965). Aspects of secondary metabolism in fungi. En "Biogenesis of antibiotic substances" Vanek Z. y Hostalek Z. Academic Press. USA. pp 61-71.

- Bureau G., Charpentier-Massonnay M. y Pansu M. (1974). Étude des goûts anormaux apportés par le bouchon sur le vin de champagne. *Revue Française d'Oenologie* **56**: 22-24.
- Burroughs R., Seitz M., Sauer D.B. y Mohr H.E. (1976). Effect of substrate on metabolite production by *Alternaria alternata*. *Applied and Environmental Microbiology* **31**(5): 685-690.
- Buser H.R., Zanier C y Tanner H. (1982). Identification of 2,4,6-trichloroanisole as a potent compound causing cork taint in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **30**: 359-362.
- Calvo M A., Agut M. (1996). Microbiological aspects of cork. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 33-66.
- Calvo M.A., Agut M., Larrondo J., Esteban C. y Codina J. (1995). Identification of fungal hyphae and conidia in samples of altered cork. *Microbios*. **81**: 41-44.
- Calvo M.A., Larrondo J. y Agut M. (1993). Microbiología de los tapones de corcho. *Aecork News* **12**: 18-19.
- Cano M. (1995). La botella de cava. *Aecork News*. **18**: 12-19.
- Cantagrel R. y Vidal J.P. (1990). Recherche des composés responsables du goût de bouchon dans les cognacs. *Bulletin de L'O.I.V.* **709-710**: 253-277.
- Carvalho F., Bastos M.L., Remião F. y Ferreira M.A. (1995). Determination of oxalates in cork stoppers by HPLC with electrochemical detection. *American Journal of Enology and Viticulture* **46**: 63-66.
- Casas G. (1989). Micología general. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca. Venezuela. 486 pp.

- Casolari C. Nanetti A., Cavallini G.M. Rivasi F. Favio U. y Mazzoni A. (1995). Keratomycosis with an unusual etiology (*Rhodotorula glutinis*): a case report. *Microbiologica* **15**(1). 83-87.
- Castera-Rossignol A. (1983). Controle microbiologique des bouchons. Bouchons steriles, conditions de conservation des bouchons. *Connaissance de la Vigne et du Vin* **17**(3): 183-193.
- Codina J., Esteban C., Calvo M.A. y Agut M. (1993). Influence of microorganisms in cases of cork taint. *Industrie delle Bevande* **22**(128): 561-563.
- Codina J., Esteban C., Calvo M.A. y Agut M. (1994). Degradación microbiológica de los compuestos orgánicos presentes en el corcho. III Symposium Internacional de Metodología Analítica en el Campo del Medio Ambiente. Barcelona. España.
- Colagrande O. (1996). Problems relative to the use of cork in bottle closures. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 3-10
- Colón L.S., Jiménez N.M. y Zlotnik H. (1992). Properties of a partially purified acid phosphatase from pathogenic *Nocardia brasiliensis*. *Mycopathologia* **118**: 85-93.
- Curtis R.F., Land D.G., Griffiths N.M., Gee M., Robinson D., Peel J.L., Dennis C. y Gee J.M. (1972). 2,3,4,6-tetrachloroanisole association with musty taint in chickens and microbiological formation. *Nature* **235**: 223-224.
- Chatonnet P., Dubourdieu D. y Boidron J.N. (1992). Incidence des conditions de fermentation et d'élevage des vins blancs secs en barriques sur leur composition en substances cédées par le bois de chêne. *Sciences des Aliments* **12**: 665-685.
- Chikamatsu G., Shirai K., Kato M., Kobayashi T. y Tsukagoshi N. (1999). Structure and expression properties of the endo- β -1,4,-glucanase A gene from the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters* **175**: 239-245.

- Christov L.P. y Prior B.A. (1993). Esterases of xylan-degrading microorganisms: Production, properties, and significance. *Enzyme and Microbial Technology* **15**: 460-475.
- Daily N.M., Lee T.H. y Fleet G.H. (1984). Growth of fungi on wine corks and its contribution to corky taints in wine. *Food Technology in Australia* **36**: 22-24.
- Danesh P., Caldas F.M., Figueredo J.J. y San Romao M.V. (1997). Mycobiota in portuguese “normal” and “green” cork throughout manufacturing process of stoppers. *Journal of Applied Microbioly* **82**: 689-694.
- Dass M.K.L., Prasad J.S. y Ahmad S.K. (1997). Endoglucanase production by paper-degrading mycoflora. *Letters in Applied Microbiology* **25**: 313-315.
- Davis C.R., Fleet G.H. y Lee T.H. (1982). Inactivation of wine cork microflora by commercial sufur dioxide treatment. *American Journal of Enology and Viticulture* **33**: 124-127.
- Davis M.D. y Stack M.E. (1991). Mutagenicity of Stemphylytoxin III, a metabolite of *Alternaria alternata*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**(1): 180-182.
- De Castro J.J. (1990). Introducción a la enología. Servicio Editorial Vasco. España. 144 pp.
- Demain A.L. y Piret J.M. (1981). Why secondary metabolism?. En “Microbiology”. Ed. D. Schelessinger. American Society for Microbiology. USA. 363-366.
- Dettori S., Falqui A., Filigheddu M.R., Manchinu M. y Mannoni S. (1996). Enviromental and genetic influences on sardian cork quality. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 123-126.
- Dombrink-Kurtzman M.A. y Dvorak T.J. (1999). Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 622-627.

- Domsch K.H., Grams W. y Anderson T.H. (1980). Compendium of soil fungi. Academic Press. USA. 859 pp.
- Dufrenne J., Soentoro P., Tatini S. y Notermans S. (1994) Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. *International Journal of Food Microbiology* **23**: 99-109.
- Ellis M.B. y Ellis J.P. (1985). Microfungi on land plants. An identification Handbook. Croom Helm. Gran Bretaña. 818 pp.
- Evans T.J. Butzke C.E. y Ebeler S.E. (1997). Analysis of 2,4,6-trichloroanisole in wines using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography* **786**: 293-298.
- Fábrega A., Agut M. y Calvo M.A. (2000). Optimización del método de detección del ácido tenuazoico: Micotoxina producida por el género *Alternaria*. *Afinidad* **487**:175-179.
- Falco G. y Sampo S. (1993). Influence of preventive mycological and organoleptical controls on the cork quality. *Industria delle Bevande* **22**: 549-550.
- Filtenborg O. Frisvad J.C. y Thrane U. (1996). Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology* **33**(1): 85-102.
- Franco C.M., Fente C.A., Vazquez B., Cepeda A., Lallaoui L., Prognom P. y Mahuzier G. (1996). Simple and sensitive high-performance liquid chromatography-fluorescence method for the determination of citrinin. Application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. *Journal of Chromatography* **723**: 69-75.
- Frazier W.C. y Westhoff D.C. (1993). Microbiología de los alimentos. Editorial Acirbia, S.A. España. 522 pp.

- Fumi M. D., Caldentey P., Mazzoleni V. y Careri M. (1996). Volatile metabolite produced by microorganisms isolated from the cork. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 141-143.
- Gallo E. (1996). Considerations on modern treatments of cork stoppers. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 86-89.
- Gola G., Negri G. y Cappelletti C. (1965). Tratado de Botánica. Editorial Labor. España. 1160 pp.
- Gould G.W., Abee T., Granum P.E. y Jones M.V. (1995). Physiology of food poisoning microorganisms and the major problems in food poisoning control. *International Journal of Food Microbiology* **29**: 121-128.
- Griffin G.F. y Chu F.S. (1983). Toxicity of the *Alternaria* metabolites alternariol, alternariol methyl ether, altenuene, and tenuazoic acid in the chicken embryo assay. *Applied and Environmental Microbiology* **46**(6): 1420-1422.
- Grilli M. (1996). Cork: Origin, structure, function. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 11-15.
- Hass H., Redl B., Friedlin E. y Stöffler G. (1992). Isolation and analysis of the *Penicillium chrysogenum* phoA gene encoding a secreted phosphate-repressible acid phosphatase. *Gene* **113**: 129-133.
- Holt J.G. (Editor Jefe). (1986). Bergey`s Manual[®] of Systematic Bacteriology. Volume 2. Williams & Wilkins Co. USA. 1599 pp.
- ICMSF. (1991). El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos. Su aplicación en las industrias de alimentos. Editorial Acirbia, S.A. España. 332 pp.
- International Standardization Organism. (1993). Bouchons en liège- Dénombrement des levures, moisissures e bactéries- Méthode de referencia N° 10718:1993. Suiza.

- Institut Català del Suro. (1995). Norma Catalana per a taps de suro aglomerat amb disc de suro per a vins escumosos N° 0.10/95. España.
- Institut Català del Suro. (1995). Norma Catalana per a taps de suro natural per a vins tranquils N° 0.20/95. España.
- Jäger J., Diekmann J., Lorenz D. y Jakob L. (1996). Corkborne bacteria and yeast as potential producers of off-flavours in wine. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 135-140 pp.
- Jayaraman P. y Kalyanasundaram I. (1994). Changes in moisture content, mycoflora and aflatoxin content of rice bran during storage. *Mycopathologia* **126**: 115-120.
- Joshi D.K. y Gold M.H. (1993). Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1779-1785.
- Juanola A. (1995). El cava. *Aecork News* **18**: 2-7.
- Kent T. (1983). Degradation and conversion of lignocelluloses. En “The filamentous fungi. Fungal technology”. (Volume 4). Edward Arnold Publishers. Gran Bretaña. 267-295 pp.
- Krovacek K., Dumontet S, Eriksson E y Baloda S.B. (1995). Isolation, and virulence profiles, of *Aeromonas hydrophila* implicated in an outbreak of poisoning in Sweden. *Microbiology and Immunology* **39**(9): 655-661.
- Laszlavik M., Lajos G., Sándor M. y László E. (1995). Phenolic compounds in *Quercus rubur* and *Quercus petrea* barrels: HPLC analysis and diode array detection. *American Journal of Enology and Viticulture* **46**(1): 67-78.

- Lefebvre A., Riboulet J.M., Boidron J.N. y Ribéreau-Gayon P. (1983). Incidence des micro-organismes du liège sur les altérations olfatives du vin. *Sciences des Aliments* **3**: 265-278.
- Leonowicz A., Matuszewska A., Luterek J., Ziegenhagen D., Wotjas-Wasilewska M., Cho N., Hofrichter M. y Rogalski J. (1999). Biodegradation of lignin by white rot fungi. *Fungal genetics and biology* **27**:175-185.
- Lupien J.R. (1997). Food packaging, international standards related to food safety and quality, and trade. *Food Additives and Contaminants* **17**: 519-527.
- Madigan M.T., Martinko J.M. y Parker J. (1998). Biología de los microorganismos. Prentice Hall, Ibérica. España. 1064 pp.
- Magan N., Cayley G. y Lacey J. (1984). Effect of water and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and wheat grain. *Applied and Environmental Microbiology* **47**: 1113-1117.
- Mannesse M.L.M., Haas G.H., Van der Hijdent H.T.W.M., Egmond M.R. y Verheij H.M. (1997). Microbial Lipases: Structures, function and industrial applications. *Biochemical Society Transactions* **25**:165-174.
- Masson G., Puech J.L. y Moutounet M. (1996). Composition chimique du bois de chêne de tonnellerie. *Bulletin de L'O.I.V* **785-786**: 634-655.
- Maujean A., Millery P. y Lemaesquier H. (1985). Explications biochimiques et metaboliques de la confusion entre gout de bouchon et gout de mosi. *Revue Française d'Oenologie* **99**: 55-62.
- Mazzoleni V., Caldentey P., Careri M., Mangia A. y Colagrande O. (1994). Volatile components of cork used for production of wine stoppers. *American Journal of enology and viticulture* **45**: 401-406.

- Mazzoleni V., Caldentey P., Silva A. (1996). Influence of some processing stages on the presence of phenolic compounds in the cork. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 64-68.
- McDermid K.P. MacKrnzie C.R. y Forsberg C.W. (1997). Esterase activities of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology* **56**(1): 127-132.
- Merino S., Rubires X., Knochel S. y Tomás J.M. (1995). Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *International Journal of Microbiology* **28**: 157-168.
- Molinas M., Caritat A. (1996). Cork growth in relation to climatic factors. Proceedings of the 2nd International Symposium on cork. Italia. 22-25.
- Montani M., Vaamonde G., Resnik S.L. y Buera P. (1988). Temperature influence on *Penicillium citrinum* Thom growth and citrinin accumulation kinetics. *International Journal of Food Microbiology* **7**: 119-122.
- Moreau M. (1977). Alterations des bouchons par quelques moisissures. *Revue Française d'Oenologie* **66**: 63-67.
- Moreau M. (1978). La mycoflore des bouchons de liège. *Revue de Mycologie* **42**: 155-189.
- Moreau M., Moreau C. y Le Bras M.A. (1976). Quelques moisissures responsables d'alterations des bouchons de champagne. *Industries Alimentaires et Agricoles* **93**(3): 317-320.
- Moss M.O. (1994). Hongos micotoxigénicos. En "Intoxicaciones Alimentarias" Eley A.R. Editorial Acribia, S.A. España. 81-101 pp.
- Mossel D.A.A. y Moreno B. (1985). Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y calidad de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. España. 375 pp.

- Mossel D.A.A., Corry J.E.L., Struijk C.B. y Baird R.M. (1995). Essentials of the microbiology of foods. John Wiley & Sons. USA.
- Muroli A. (1996). Programme of genetic improvement of cork oak. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 26-32.
- Nair M.G. (1998). Fumonisin and human health. *Annals of Tropical Pediatrics* **18**: 47-52.
- Navascués E. (1998). Origen y presencia en vinos alterados de compuestos organoclorados relacionados con el metabolismo microbiano. Tesis Doctoral Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Orvehed M., Häggblom P. y Söderhäll K. (1988). Nitrogen inhibition of mycotoxin production by *Alternaria alternata*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**: 2361-2364.
- Parés R. y Juárez A. (1997). Bioquímica de los microorganismos. Editorial Reverté S.A. España. 380 pp.
- Pascual M.R. (1992). Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Ediciones Diaz de Santos. España. 360 pp.
- Pedraza-Reyes M. y Gutiérrez- Corona F. (1997). The difunctional enzyme chitosanase-cellulase produced by the gram-negative microorganism *Myxobacter sp* Al-1 is highly similar to *Bacillus subtilis* endoglucanases. *Archives of Microbiology* **168**: 321-327.
- Pettey T.M. y Crawford D.L. (1984). Enhancement of lignin degradation in *Streptomyces* spp by protoplast fusion. *Applied and Environmental Microbiology* **47**: 439-440.

- Pi M. (1997). Estudi microbiològic de taps de suro natural per a vi tranquil. Treball experimental del programa de tercer cicle de Microbiologia. Departament de Genètica y Microbiologia. Universitat Autònoma de Barcelona. España.
- Pí M., Agut M. y Calvo M.A. (1996). Hazard analysis and critical control points (HACCP) in the flow chart of the manufacturing of semi-elaborated cork stoppers. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 145-146.
- Pintus A., Ruiu R. y Pampiro F. (1996). Forest, cultivation and production aspects of corks oak. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 16-20
- Pitt J.I., Hocking A.D. (1985). Fungi and food spoilage. Academic Press. Australia. 413 pp
- Ramirez C. (1982). Manual and atlas of the *Penicillia*. Elsevier Biomedical Press. Holanda. 874 pp.
- Ramm K., Ramm M., Liebermann B y Reuter G. (1994). Studies of the biosynthesis of tentoxin by *Alternaria alternata*. *Microbiology* **140**: 3257-3266.
- Raper K.B. y Fennell D.I. (1965). The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins Co. USA. 686 pp.
- Raper K.B. y Thom C. (1949). The manual of *Penicillia*. Williams & Wilkins Co. USA. 875 pp.
- Ratledge C. (Editor). (1994). Biochemistry of microbiological degradation. Kluwer Academic Publishers. Holanda. 590 pp.
- Riboulet J.M. (1982). Contribution a l'étude chimique et microbiologique des "gouts de bouchon" dans les vins. These 3^{me}. Cycle. Université de Bordeaux II. France.

- Riboulet J.M. (1992). Le bouchon de liège et la qualité. *Revue Française d' Oenologie* **138**: 43-45.
- Rigaud J., Issanchou S., Sarris J. y Langlois D. (1984). Incidence des composés volatils issus du liège sur le “gout de bouchon” des vins. *Sciences des Aliments* **4**: 81-93.
- Rocha S., Delgadillo I. y Ferrer Correia A.J. (1996). Etudes des attaques microbiologiques du liège *Quercus suber* L. *Revue Française d' Oenologie* **96**: 31-34.
- Samson R.A., Hoekstra E.S. y Oorschot C.A.A. (1988). Introduction food-borne fungi. Centralbureau voor Schimmelcultures. Holanda. 299 pp.
- Sancho J., Baldris R. y Sánchez M. (1989). Manual de medios de cultivo para microbiología. Adsa=Micro. España. 506 pp.
- Santosh T.R., Balasubramanian K.K. y Lalitha K. (1999). Enhancement of β -galactosidase of *Trigonella foenum-graecum* by exposure to the allelochemical mimosine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 462-467.
- Schaeffer A., Meyer J.P. Guillerm A. (1978). Etude sur l'origine du “goût de bouchon” dans les vins. *Revue Française d' Oenologie* **70**: 25-29.
- Simpson R.F. (1990). Cork taint in Wine: A review of the causes. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal* **5**: 286-296.
- Smith J.E. y Hacking A. (1983). Fungal toxicity. En “The filamentous fungi. Fungal technology” (volumen 4). Edward Arnold Publishers. Gran Bretaña. 239-265 pp.
- Stack M.E. y Prival M.J. (1986). Mutagenicity of the *Alternaria* metabolites altertoxins I, II, and III. *Applied and Environmental Microbiology* **52**(4): 718-722.

- Sternberg D. (1976). Beta-glucosidase of *Trichoderma*: its biosynthesis and role in saccharification of cellulose. *Applied and Environmental Microbiology* **31**: 648-654.
- Stinson E.E., Bills D.D., Osman S.F., Siciliano J., Ceponis M.J. y Heisler E.G. (1980). Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes, and blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **28**: 960-963.
- Suárez J.A., Navascués E., Calderón F., Vila J., Colomo B. y García-Vallejo C. (1997). Présence de champignons et concentration de chloroanisoles pendant le processus de fabrication des bouchons de liège pour l'embouteillage des vins. *Bulletin de L'O.I.V.* **793-794**: 235-245.
- Sweeney M.J. y Dobson A.D.W. (1998). Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* **43**: 141-158.
- Sweeney M.J. y Dobson A.D.W. (1999). Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* **175**: 149-163.
- Talon R., Montel M.C. y Berdague J.L. (1996). Production of flavor esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*. *Enzyme and Microbial Technology* **19**: 620-622.
- Tindale C.R., Witfield F.B. Levingston S.D. y Nguyen T.H.L. (1989). Fungi isolated packaging materials: Their role in the production of 2,4,6-trichloroanisole. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **49**: 4337-447.
- Tribaut-Sohier I. y Valade M. (1996). Le bouchage liège en champagne. Proceedings of the 2nd International Symposium on Cork. Italia. 69-73.
- Ubeda J.F. y Briones A.I. (1999). Microbiological quality control of filtered and non-filtered wines. *Food Control* **10**: 41-45.

- Valli K. y Gold M.H. (1991). Degradation of 2,4-dichlorophenol by lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Bacteriology* **173**(1): 345-352.
- Vanne L., Karwoski M., Karppinen S. y Sjöberg A.M. (1996). HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms. *Food Control* **7**: 263-276.
- Voss K.A., Plattner R.D., Bacon C.W. y Norred W.P. (1990). Comparative studies of hepatotoxicity and fumonisin B₁ and B₂ content of water and chloroform/metanol extracts of *Fusarium moniliforme* strain MRC 826 culture material. *Mycopathologia* **112**: 81-92.
- Waltman W.D., Shotts E.B. y Hsu T. (1982). Enzymatic Characterization of *Aeromonas hydrophila* complex by API ZYM system. *Journal of Clinical Microbiology* **16**: 692-696.
- Wheeler K.A., Hurdman B.F. y Pitt H. (1991). Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* **12**: 141-150.
- Whitfield F.B., Shaw K.J. y Nguyen T.H.L. (1986). Simultaneous determination of 2,4,6-trichloroanisole, 2,3,4,6-tetrachloroanisole and pentachloroanisole in foods and packaging materials by high-resolution gas chromatography-multiple ion monitoring-mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **37**: 85-96.
- Witfield F.B., McBride R.L. y Nguyen T.H.L. (1987). Flavour perception of chloroanisoles in eater and selected processed foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **40**: 357-365.
- Witfield F.B., Nguyen T.H.L. y Last J.H. (1991a). Effect of relative humidity and chlorophenol content on the fungal conversion of chlorophenols to chloroanisoles

in fibreboard cartons containing dried fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **54**: 595-604.

- Witfield F.B., Nguyen T.H.L. y Tindale R. (1991b). Effect of relative humidity and incubation time on the O-methylation of chlorophenols in fibreboard by *Paecilomyces variotii*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **55**: 19-25.
- Zimmerli B. y Dick R. (1996). Ochratoxin A in table wine and grape-juice: Occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants* **13**(6): 655-668.