



RESUMEN

El presente trabajo de tesis tuvo como finalidad evaluar la flora micológica del maíz seco y su harina producidos en la parroquia San Juan - Cantón Gualaceo con el fin de aportar con información sobre la calidad de estos alimentos. Además se evaluaron los siguientes factores para el desarrollo de la flora micológica: temperatura, actividad acuosa, almacenamiento; así como también el crecimiento en distintos medios de cultivos y el uso de la desinfección del grano como parte de la técnica de siembra. La detección, recuento y aislamiento de hongos se realizó de acuerdo a la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad para la harina y en el caso del grano por la técnica de siembra directa, con y sin desinfección de la superficie del grano utilizándose el agar MEA (Agar Extracto de Malta), PDA (Agar Papa Dextrosa) y DRBC (Agar Rosa de Bengala Diclorán) y sometiendo a dos tratamientos térmicos (18°C vs 25°C).

Se encontró que la micoflora presente en las muestras analizadas corresponde a los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Aspergillus* y levaduras, siendo el género predominante *Penicillium* tanto en el grano como en la harina.

La temperatura óptima para el crecimiento fue 25°C; y a su vez el crecimiento fue mejor sin desinfectar las superficies del grano. El crecimiento micológico varió dependiendo del medio, siendo PDA el más óptimo para *Penicillium* y *Rhizopus*, mientras que para *Fusarium* y *Aspergillus* no hubo diferencia. Igualmente se encontró que la actividad acuosa influyó en forma proporcional al crecimiento micológico y que el almacenamiento controlado influyó positivamente en su disminución.

Palabras Claves: Flora micológica, maíz seco, harina.



ABSTRACT

The aim of this thesis work was to evaluate the mycoflora of dried maize kernels and its flour produced at the Community of San Juan – Gualaceo canton in order to support with information about the quality of those foodstuffs. In addition, the following factors related to the mycoflora growth were evaluated: temperature, water activity, storage; as well as the growth in different media and the use of disinfection of the kernels as part of the fungi sowing technique. Detection, quantification and isolation was done according to the technique of “counting in plate by sowing in deep” for the flour and for the kernels following the direct sowing technique, with and without disinfections using MEA agar (Malt Extract Agar), PDA (Potato Dextrose Agar) and DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar). The cultures were subjected to two thermal treatments (18°C vs 25°C). It was found that the mycoflora corresponded to the genera *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Aspergillus* and yeast. The genus *Penicillium* was the most prevalent in both kernels and flour. The optimal temperature for growth was 25°C, and it was better when the kernel’s surface were not disinfected. The growth also varied according to the media, and the PDA resulted to be the most optimal for *Penicillium* and *Rhizopus*, whereas for *Fusarium* and *Aspergillus* no difference was observed. At the same time, it was found that the water activity influenced proportionally to the mycoflora growth and that the controlled storage influenced positively on the decreasing growth.

Keywords: Mycoflora, dried maize kernels, flour.



INDICE DE CONTENIDO

CAPÍTULO 1: GENERALIDADES DEL MAÍZ	1
1.1 INTRODUCCIÓN	1
1.2 CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DEL MAÍZ	2
1.3 COMPOSICIÓN DEL MAÍZ	2
1.4 CLASIFICACIÓN DEL MAÍZ	4
1.5 CLIMA DE CULTIVO	5
1.6 CICLO DEL CULTIVO	5
1.7 SIEMBRA	5
1.8 COSECHA	6
1.9 MANEJO DE LA POSTCOSECHA	6
1.9.1 Secado	6
1.9.2 Limpieza, clasificación y desgrane	6
1.9.3 Almacenamiento	7
1.10 USOS	7
1.11 PRINCIPALES PAÍSES EN PRODUCCIÓN, SUPERFICIE Y RENDIMIENTO	7
1.12 CONSUMO	7
1.13 MAÍZ EN EL ECUADOR	7
1.13.1 Superficie, producción y rendimiento de maíz en el Ecuador	7
1.14 VALOR NUTRITIVO DEL MAÍZ ECUATORIANO	8
CAPÍTULO 2: FLORA MICOLÓGICA	10
2.1 INTRODUCCIÓN	10
2.2 GENERALIDADES DE LOS HONGOS	11
2.3 CONDICIONES PARA SU CRECIMIENTO	11
2.3.1 Humedad y agua disponible	12
2.3.1.1 Humedad relativa de equilibrio (HRE)	12
2.3.1.2 Actividad acuosa (aw)	13
2.4 PREVENCIÓN DE LOS HONGOS	15



2.4.1	Métodos químicos	15
2.4.2	Métodos físicos	15
2.4.2.1	Control de humedad y temperatura	15
2.4.2.2	Condición del grano	16
2.4.2.3	Materias y organismos extraños	16
2.5	HONGOS CONTAMINANTES DE CEREALES	16
2.5.1	Hongos de campo	16
2.5.2	Hongos de almacén	17
2.6	HONGOS CONTAMINANTES DEL MAIZ	17
2.6.1	GÉNERO ASPERGILLUS	17
2.6.1.1	Generalidades	17
2.6.1.2	Morfología	18
2.6.1.2.1	Estudio macroscópico	18
2.6.1.2.2	Estudio microscópico	18
2.6.1.3	Cultivos	20
2.6.1.4	Identificación	21
2.6.1.5	Ambiente	21
2.6.2	GÉNERO PENICILLIUM	22
2.6.2.1	Generalidades	22
2.6.2.2	Morfología	23
2.6.2.2.1	Estudio macroscópico	23
2.6.2.2.2	Estudio microscópico	24
2.6.2.3	Cultivos	26
2.6.2.4	Identificación	27
2.6.3	GÉNERO FUSARIUM	27
2.6.3.1	Generalidades	27
2.6.3.2	Morfología	30
2.6.3.2.1	Estudio macroscópico	30
2.6.3.2.2	Estudio microscópico	31
2.6.3.3	Cultivos	32
2.6.3.4	Identificación	33



2.6.4 GÉNERO RHIZOPUS	33
2.6.4.1 Generalidades	33
2.6.4.2 Morfología	33
2.6.4.2.1 Estudio macroscópico	33
2.6.4.2.2 Estudio microscópico	34
2.6.4.3 Cultivos	35
2.6.4.4 Identificación	35
CAPITULO 3: METODOLOGÍA	36
3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN	36
3.2 MUESTREO	36
3.3 ÁREA DE ESTUDIO	36
3.4 TAMAÑO DE LA MUESTRA	37
3.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	37
3.6 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	37
3.7 INSTRUMENTOS ADICIONALES PARA RECOLECCIÓN DE DATOS	37
3.8 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA EL CULTIVO	38
3.8.1 Agar Papa Dextrosa (PDA)	38
3.8.2 Agar Rosa de Bengala Diclorán (DRBC)	39
3.8.3 Agar Extracto de malta (MEA)	39
3.8.4 Preparación de los medios	40
3.8.5 Interpretación de resultados	41
3.8.6 Preparación de la solución de Hipoclorito de Sodio al 0,4%	41
3.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ACUOSA (AW)	41
3.10 CONTROL DE LA TEMPERATURA AMBIENTAL	42
3.11 VALORACIÓN DEL CRECIMIENTO FÚNGICO	43
3.11.1 Azul de Lactofenol	44
3.12 DESCRIPCIÓN DE LOS ANÁLISIS REALIZADOS	44
3.12.1 Determinación de la micoflora	44
3.12.1.1 Procedimiento para los granos secos de maíz	44



3.12.1.2 Procedimiento para la harina de maíz _____	45
3.13 IDENTIFICACIÓN DEL TIPO DE HONGO _____	47
3.13.1 Aspergillus _____	48
3.13.1.1 Análisis macroscópico _____	48
3.13.1.2 Análisis microscópico _____	48
3.13.2 Penicillium _____	48
3.13.2.1 Análisis macroscópico _____	48
3.13.2.2 Análisis microscópico _____	49
3.13.3 Fusarium _____	49
3.13.3.1 Análisis macroscópico _____	49
3.13.3.2 Análisis microscópico _____	49
3.13.4 Rhizopus _____	49
3.13.4.1 Análisis macroscópico _____	49
3.13.4.2 Análisis microscópico _____	49
3.14 ANÁLISIS ESTADÍSTICO _____	50
CAPITULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	51
4.1 FLORA MICOLÓGICA DEL MAÍZ EN GRANO _____	51
4.1.1 Flora micológica diferencial por productor _____	52
4.1.2 Flora micológica diferencial por número de colonias crecidas _____	53
4.1.3 Flora micológica diferencial por medio de cultivo _____	54
4.2 INFLUENCIA DE DIVERSOS FACTORES EN EL CRECIMIENTO	
MICOLÓGICO DEL MAÍZ EN GRANO _____	56
4.2.1 Influencia de la actividad de agua _____	56
4.2.2 Influencia del almacenamiento _____	58
4.2.3 Influencia de la desinfección del grano previo al cultivo _____	59
4.2.4 Influencia de la temperatura _____	60
4.2.5 Efecto conjunto de la temperatura, almacenamiento controlado y	
actividad acuosa en el crecimiento de la micoflora en el maíz en grano _____	61
4.3 FLORA MICOLÓGICA DE LA HARINA DE MAÍZ _____	65
4.3.1 Recuento estándar en placa y flora micológica diferencial _____	65



4.3.1.1	Diferencias entre productores	66
4.3.1.2	Flora micológica diferencial por medio de cultivo	67
4.3.2	Influencia de la actividad de agua	67
4.3.3	Efecto de la temperatura	68
4.4	EFFECTO CONJUNTO DE LA TEMPERATURA Y ACTIVIDAD ACUOSA EN EL CRECIMIENTO DE LA MICROFLORA EN LA HARINA DE MAÍZ	69
4.5	PRÁCTICAS AGRÍCOLAS	69
CAPITULO 5: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		72
Referencias		75
Anexos		78
Glosario		116

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Superficie cosechada de maíz en las provincias de la Sierra ecuatoriana.1	
Tabla 2. Composición química del porcentaje de proteína y de almidón	9
Tabla 3. Cuadro resumen de las 400 siembras realizadas en cada uno de los medios de cultivo.	51
Tabla 4. Géneros de micoflora identificada a nivel global, expresado en porcentaje (%)	52
Tabla 5. Géneros de micoflora identificada según el productor, expresado en porcentaje (%).	53
Tabla 6. Géneros de micoflora identificada según el número de colonias por cultivo, expresado en porcentaje (%).	54
Tabla 7. Géneros de micoflora identificada según el medio de cultivo utilizado, expresado en porcentaje (%).	55
Tabla 8. Géneros de micoflora identificada según el número de colonias y medio de cultivo utilizado, expresado en porcentaje (%).	55
Tabla 9. Valores de la actividad acuosa (Aw) en el maíz en grano de las muestras recién recolectadas (primera medición) y después de 2 meses de almacenamiento controlado (segunda medición).	57
Tabla 10. Influencia de la Aw en el crecimiento de la micoflora diferenciada en maíz en grano.	57
Tabla 11. Influencia del almacenamiento controlado en el crecimiento de la micoflora diferenciada en maíz en grano.	59
Tabla 12. Influencia de la desinfección del grano previo al cultivo en el crecimiento de la micoflora diferenciada en maíz en grano.	60
Tabla 13. Influencia de la temperatura en el crecimiento de la micoflora diferenciada en maíz en grano.	61
Tabla 14. Modelo de regresión lineal de los factores que afectan el crecimiento micológico en el maíz en grano.	61
Tabla 15. Modelo de regresión logística de los factores que afectan el crecimiento micológico en el maíz en grano.	63
Tabla 16. Recuento estándar en placa de la harina de maíz, sembrados en MEA, PDA y DRBC a diferentes temperaturas de incubación (18°C vs. 25°C)	65
Tabla 17. Valores de la actividad acuosa (Aw) en la harina de maíz después de 2 meses de almacenamiento controlado.	67
Tabla 18. Modelo de regresión lineal de los factores que afectan el crecimiento micológico de la harina de maíz.	69
Tabla 19. Principales prácticas agrícolas referentes al maíz en la parroquia San Juan – Cantón Gualaceo, expresado en porcentaje (%).	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del grano de maíz: corte longitudinal.	4
Figura 2. Porcentaje de superficie sembrada y producción, según región y provincia.....	8
Figura 3. Contenido de humedad de diferentes granos y semillas en equilibrio con humedad relativa de 65% - 90% y hongos que generalmente crecen bajo esas condiciones de humedad.....	13
Figura 4. Actividad acuosa requerida para el crecimiento de hongos.	14
Figura 5. Aspecto macroscópico de las colonias del género <i>Aspergillus</i>	18
Figura 6. Aspecto de conidióforos del género <i>Aspergillus</i>	19
Figura 7. Vista microscópica del género <i>Aspergillus</i> teñida con azul de lactofenol, permite visualizar las cabezas aspergiliares con fiálides que sólo ocupan la parte superior de la vesícula, y las conidias incoloras.....	20
Figura 8. Temperatura y actividad acuosa requeridas para el desarrollo de algunas especies de <i>Aspergillus</i>	22
Figura 9. Temperatura y actividad del agua necesarias para el crecimiento de algunas especies de <i>Penicillium</i>	23
Figura 10. Aspecto macroscópico de colonias del género <i>Penicillium</i>	24
Figura 11. Aspecto de la disposición de fiálides del género <i>Penicillium</i>	25
Figura 12. Vista microscópica del género <i>Penicillium</i> , tinción azul de lactofenol. .	26
Figura 13. Temperatura y actividad del agua requeridas para el crecimiento de algunas especies de <i>Fusarium</i>	29
Figura 14 Aspecto macroscópico de colonia del género <i>Fusarium</i>	30
Figura 15 Estructuras características del género <i>Fusarium</i>	31
Figura 16. Macroconidios teñidos con azul de lactofenol.	32
Figura 17. Cultivo de <i>Rhizopus</i> spp. Agar Sabouraud Dextrosa.	34
Figura 18 . Vista microscópica del género <i>Rhizopus</i>	35
Figura 19. Medios de cultivo preparados	40
Figura 20. Medidor de Actividad Acuosa.....	42
Figura 21. Toma de la temperatura ambiente del laboratorio.	42
Figura 22. Placa con azul de Lactofenol.	43
Figura 23. Colonias de <i>Fusarium</i> spp.	43
Figura 24. Siembra directa del grano.....	45
Figura 25. Siembra en placa por profundidad	47



LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Ficha de recolección de datos para la caracterización del maíz..... 78
ANEXO 2. Ficha de recolección de datos sobre prácticas agrícolas..... 79
ANEXO 3. Esquema general de siembra en maíz en grano y su harina 80
ANEXO 4. Historial de Resultados 81
ANEXO 5. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529- 10:98. Control microbiológico de Mohos y Levaduras viables. Recuentos en placa por siembra en profundidad. 90
ANEXO 6. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529- 2:99. Control microbiológico de los alimentos toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico..... 95
ANEXO 7. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2051:1995. Granos y Cereales. Maíz molido sémola, harina, critz. Requisitos. 111



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Dalia Rocio Pérez Culcay , autora de la tesis “**DETERMINACIÓN DE LA FLORA MICOLÓGICA DEL MAÍZ SECO Y SU HARINA EN LA PARROQUIA SAN JUAN - CANTÓN GUALACEO**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 02 de Mayo de 2013

Dalia Rocio Pérez Culcay
0104540760

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Dalia Rocio Pérez Culcay, autora de la tesis “**DETERMINACIÓN DE LA FLORA MICOLÓGICA DEL MAÍZ SECO Y SU HARINA EN LA PARROQUIA SAN JUAN - CANTÓN GUALACEO**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 02 de Mayo de 2013

Dalia Rocio Pérez Culcay
0104540760

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, María Elena Zárate Ochoa, autora de la tesis “**DETERMINACIÓN DE LA FLORA MICOLÓGICA DEL MAÍZ SECO Y SU HARINA EN LA PARROQUIA SAN JUAN - CANTÓN GUALACEO**”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 02 de Mayo de 2013

María Elena Zárate Ochoa
0705227692

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, María Elena Zárate Ochoa, autora de la tesis **“DETERMINACIÓN DE LA FLORA MICOLÓGICA DEL MAÍZ SECO Y SU HARINA EN LA PARROQUIA SAN JUAN - CANTÓN GUALACEO”**, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 02 de Mayo de 2013

María Elena Zárate Ochoa
0705227692

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“DETERMINACIÓN DE LA FLORA MICOLÓGICA DEL MAÍZ SECO
Y SU HARINA EN LA PARROQUIA SAN JUAN - CANTÓN
GUALACEO”**

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORAS:

DALIA ROCIO PÉREZ CULCAY
MARÍA ELENA ZÁRATE OCHOA

DIRECTORA DE TESIS:

BIOQ. FARM. JOHANA ORTIZ

ASESORA DE TESIS:

DRA. PAULINA ESCOBAR

CUENCA-ECUADOR

2013



DEDICATORIA

Dedico este proyecto de tesis a Dios y a mi Familia.

A Dios porque ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar a pesar de las adversidades, sin desfallecer.

A mis padres y hermanos, pilares fundamentales en mi vida quienes han velado por mi bienestar y educación, siendo mi apoyo en todo momento. Depositando su entera confianza en cada reto que se me presentaba sin dudar ni un solo instante en mi inteligencia y capacidad. Es por ellos que soy lo que soy ahora. Sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora.

De manera especial a mi madre, Dalia, su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ella un gran ejemplo a seguir y destacar, no solo para mí sino para mis hermanos y familia en general.

Por último pero no menos importante a aquellas personas que también contribuyeron y confiaron en mí a lo largo de mi formación académica y personal, profesores y amigos.

“Todo lo que la mente puede concebir y creer, la mente puede alcanzar”. - Napoleón Hill

Dalia

La familia es una de las joyas más preciadas que uno puede tener, sin su apoyo no se puede conseguir la fuerza necesaria para lograr las metas. Este documento es un esfuerzo grande que involucra a muchas personas cercanas a mí. Es por eso que dedico este trabajo a toda mi familia en especial **A MIS PADRES**, Raúl y María Eugenia por ser el pilar fundamental en mi vida, por ser fuente de motivación, por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me han infundado siempre, porque creyeron en mí. Va por ustedes, porque siempre están a mi lado sin condiciones, pero más que nada, por su amor.

“Cuanto mayor sea el esfuerzo, mayor es la gloria”. - Pierre Corneille

Ma. Elena



AGRADECIMIENTO

Esta tarea no se habría podido realizar sin la colaboración de muchas personas que nos brindaron su ayuda; siempre resultará difícil agradecer a todos aquellos que de manera directa o indirectamente, participaron en el desarrollo de esta investigación, leyendo, opinando, corrigiendo, acompañándonos en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad. Por tanto, queremos agradecerles a todos ellos cuanto han hecho por nosotras, para que este trabajo saliera adelante de la mejor manera posible.

En primer lugar, agradecemos a Dios porque siempre nos iluminó y nos guió a lo largo de nuestra carrera, por ser nuestra fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarnos una vida llena de aprendizajes y sobre todo de felicidad.

A nuestras familias, principalmente a nuestros padres por apoyarnos en todo momento, por ser más de lo que les pedimos y de lo que en algunas ocasiones merecíamos. Por dar más de lo que necesitábamos. Sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A nuestros hermanos por ser parte importante de nuestra vida y representar la unidad familiar.

Debemos agradecer de manera especial y sincera a la Bioq. Farm. Johana Ortiz y a la Dra. Paulina Escobar por aceptarnos para realizar esta tesis de grado bajo su dirección. Su apoyo y confianza en nuestro trabajo y su capacidad para guiar nuestras ideas ha sido un aporte invaluable. Les agradecemos también el habernos facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de este trabajo y, por último pero no menos importante, al Ingeniero José Egüez, profesional experto por brindarnos su apoyo, el mismo que fue determinante para nuestro desempeño.

Gracias a todos.



INTRODUCCIÓN

La disponibilidad de alimentos de buena calidad sanitaria es un requerimiento generalizado, cuya demanda aumenta a medida que la población gana conciencia de la importancia para la salud de consumir alimentos no contaminados por agentes patógenos o sustancias tóxicas.

Diversas clases de contaminantes pueden estar presentes en casi todos los tipos de alimentos, incluyéndose los granos y sus derivados. En el Ecuador, el maíz destaca por su gran utilización como alimento de consumo humano gracias a su aporte nutricional, sobre todo en la Sierra ecuatoriana. Todos los granos, incluyendo el maíz pueden ser colonizados por estos hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, que bajo ciertas condiciones pueden producir crecimientos de mohos visibles causándoles un grave deterioro. El daño físico no lo es todo, ya que estos hongos pueden producir toxinas como resultado de su metabolismo secundario las cuales constituyen un riesgo para la salud humana y animal en varios puntos de la cadena de producción, almacenamiento o industrialización.

La inocuidad de los granos de maíz y de sus subproductos es elemental, especialmente por su alto consumo en la región estudiada; por lo que los objetivos de este trabajo fueron evaluar la contaminación por hongos de granos de maíz recién cosechados y posteriores a su almacenamiento conjuntamente con su harina en la parroquia de San Juan, cantón Gualaceo. Así como también determinar y comparar el tipo de flora micológica del grano de maíz y su harina a distintas temperaturas de crecimiento, teniendo en cuenta la influencia de la actividad de agua en el desarrollo de la flora micológica.

A black and white photograph of several ears of corn in a basket. The corn is arranged in a way that shows the texture of the husks and the kernels. The lighting is soft, creating a warm and natural atmosphere. The text is overlaid in a clean, white, sans-serif font.

Capítulo I

Generalidades del maíz

CAPÍTULO 1

1. GENERALIDADES DEL MAIZ

1.1 Introducción

El maíz es considerado como una fuente importante de elementos nutritivos para los seres humanos y animales, y a partir de éste se puede obtener almidón, aceite, proteínas, entre otros. (1)

El cultivo del maíz se originó en el continente americano aunque su crecimiento puede darse en cualquier parte del mundo. Este cereal, junto con el trigo y el arroz, son considerados los productos de mayor producción a nivel mundial. (1)

En el Ecuador, el maíz constituye un componente básico de la alimentación. (1) El consumo anual de maíz en el Ecuador para el 2007 fue de 4,43 Kg/persona, cifras que resultan muy bajas en relación al resto de países en América del Sur. (2) La tabla 1 resume la superficie cosechada de maíz en las provincias de la Sierra ecuatoriana.

Tabla 1. Superficie cosechada de maíz en las provincias de la Sierra ecuatoriana.

Provincia	Superficie cosechada (Ha)
Carchi	964
Imbabura	6789
Pichincha	13199
Cotopaxi	38840
Tungurahua	4682
Chimborazo	12906
Bolívar	31620
Cañar	3252

Azuay	28270
Loja	61184
Total	201706

Fuente: Sistema de Información Geográfica para el Sector Agropecuario (SIGAGRO), 2009.

1.2 Características botánicas del maíz

El maíz (*Zea mays*) es una planta perteneciente a la familia de las gramíneas que consta de un sistema radicular fasciculado, potente y de rápido desarrollo. El tallo puede llegar a medir hasta 4 m, aunque puede variar según el tipo de maíz. Las hojas son anchas y tiene flores femeninas y masculinas. Las flores femeninas aparecerán en las axilas de algunas hojas y están agrupadas en una espiga rodeada de largas brácteas. Las flores masculinas aparecen en la extremidad del tallo y están agrupadas en panículas. En la extremidad de la espiga aparecen largos estilos denominados barbas los mismos que se oscurecen después de la fecundación. (3) (4)

La fecundación de las flores femeninas puede hacerse por polen de las mismas plantas o de otras, por lo que el resultado de la aparición de granos de diferente coloración se debe a una fecundación realizada por polen de otras plantas.

La mazorca tiene una parte central llamada zuro, la misma que es comúnmente conocida como corazón. Esta parte representa un 15 al 30 % del peso de la espiga.

En una mazorca se puede encontrar centenares de granos, los mismos que se encuentran ubicados en hileras de forma longitudinal. (4)

1.3 Composición del maíz

El grano de maíz consta de las siguientes partes: 1) el pericarpio que se caracteriza por su elevado contenido en fibra, aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23%) y



lignina (0.1%) (5); II) el endospermo que contiene un nivel elevado de almidón (88%), proteínas (8%) y un contenido relativamente bajo de grasa (0.8%) (6); y III) el germen se caracteriza por el alto contenido en grasa (33%), proteínas (18,5%) y minerales (10,5%).

El componente principal del grano de maíz es el almidón, que corresponde el 72-73% del peso del grano. Otros hidratos de carbono que forman parte del grano son azúcares sencillos (glucosa, sacarosa y fructosa) en cantidades que varían del 1 al 3%. La sacarosa, el azúcar más importante, se encuentra esencialmente en el germen. Las proteínas constituyen el siguiente componente en importancia del grano. La calidad nutricional del maíz está determinada por la composición en aminoácidos de sus proteínas, siendo deficiente de lisina y triptófano y con una mayor cantidad de leucina.

El contenido de ácidos grasos saturados, palmítico (11%) y esteárico (2%) en el aceite de maíz es bajo, sin embargo presenta valores elevados de ácidos grasos poli insaturados, fundamentalmente ácido linoleico (44%), y cantidades muy reducidas de ácidos α -linolénico (1%) y araquidónico (0.4%) (7). El aceite de maíz también contiene una cantidad importante de ácidos grasos monoinsaturados como el ácido oleico (37%).

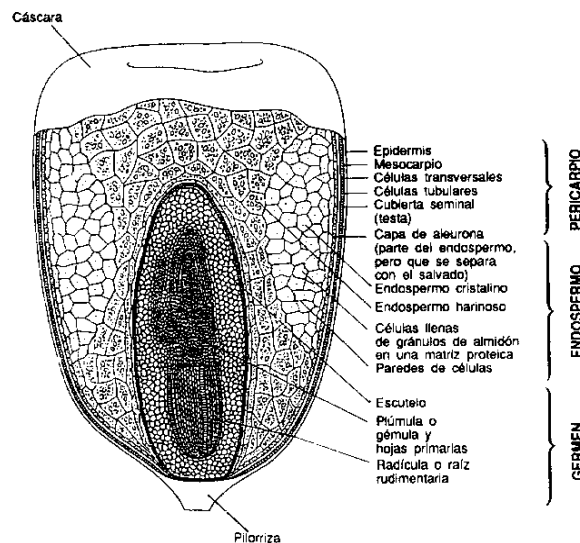
Los hidratos de carbono complejos se encuentran principalmente en el pericarpio, en las paredes celulares del endospermo y en menor medida, en las del germen.

La fibra dietética total corresponde al 12-15% (12% de fibra insoluble y 1,3% de la soluble). Su contenido de ceniza es aproximadamente de 1,3%. El germen proporciona casi el 78% de todos los minerales del grano siendo el más abundante el fósforo, en forma de fitato de potasio y magnesio. En menor proporción se encuentra potasio, calcio, magnesio, sodio, hierro, cobre, manganeso y zinc.

El grano de maíz contiene dos vitaminas liposolubles, provitamina A o carotenoides (en el maíz amarillo) encontrándose en su mayoría en el endospermo, con pequeñas cantidades en el germen; y la vitamina E que se

encuentra mayoritariamente en el germen. Las vitaminas hidrosolubles se localizan sobre todo en la capa de aleurona del grano de maíz y en menor medida, en el germen y el endospermo. El contenido de tiamina y riboflavina esta determinado primordialmente por el ambiente y las prácticas de cultivo más que por la estructura genética. La niacina es una de las vitaminas más estudiadas en el maíz, por su relación con la pelagra en poblaciones que consumían elevadas cantidades de este cereal, enfermedad favorecida por los bajos niveles de niacina del grano, a la cantidad de triptófano asimilable y a la elevada concentración de leucina. Una característica propia de esta vitamina es que se encuentra formando un complejo denominado niacinógeno y que el organismo animal no puede asimilarla; sin embargo, existen algunas técnicas de elaboración que lo hidrolizan permitiendo su asimilación. En el grano de maíz hay además una carencia de vitamina B₁₂, y el grano maduro posee muy pequeñas cantidades de vitamina C y de otras vitaminas como ácido fólico o ácido pantoténico. (1)

Figura 1. Estructura del grano de maíz: corte longitudinal.



Fuente: Wheat Flour Institute. Chicago, 1964

1.4 Clasificación del Maíz

El maíz se clasifica en los siguientes tipos: (3)



- Dentado. (*Zea mays indentata*).
- Cristalino (duro) (*Zea mays indurata*). Amarillo, blanco, mezclado, otros.
- Amiláceo (suave) (*Zea mays amylacea*). Amarillo, blanco, mezclado, otros.
- Reventón (*Zea mays everta*). Amarillo, blanco, mezclado, otros.
- Dulce (*Zea mays sacharata*).
- Cubierto o tunicado (*Zea mays tunicata*).
- Ceroso (*Zea mays cerea*).
- Morocho (*Zea mays* var. *Indurata Bailey*)
- De proteína de alta calidad (OPM).
- Otros.

1.5 Clima de cultivo

El maíz se cultiva entre los 2200 a 3100 msnm. Las variedades son diferentes para cada zona. La mayoría de los productores de la Sierra ecuatoriana siembran desde septiembre hasta mediados de enero, coincidiendo con el inicio del periodo de lluvias, para obtener de esta forma un mayor grado de germinación y producción. (8)

1.6 Ciclo del cultivo

Este periodo depende de la variedad y del propósito, si es para choclo 150 días o grano seco 250 días. En el caso de las variedades mejoradas, el ciclo del cultivo llega hasta los 270 días. (8)

1.7 Siembra

Las semillas de calidad para la siembra son aquellas que cumplen con los requisitos de pureza física, pureza varietal, poder de germinación y calidad sanitaria. Además, el suelo debe prepararse con anticipación utilizando maquinaria o manualmente con el fin de oxigenar el terreno, eliminar las malezas y algunas plagas. Además la preparación del suelo facilita la descomposición de residuos de las cosechas que quedaron en el campo y que se nivele la superficie donde se va a sembrar. El surcado para la siembra debe hacerse a una distancia de 80 cm



entre surcos y la profundidad de los hoyos no debe ser mayor a los 5 cm para que exista una buena germinación y que todas las plantas emerjan al mismo tiempo.

Se recomienda realizar un abonamiento por una sola vez en el ciclo del cultivo. Se puede utilizar; compost, lombrinaza (humus de lombriz), gallinaza, pollinaza y estiércol de vaca bien descompuesto. Adicionalmente al abono, se recomienda utilizar un Biofertilizante, el cual tiene la capacidad de promover el crecimiento de los cultivos. (8)

1.8 Cosecha

La época de cosecha varía de acuerdo con la variedad, temperatura, altitud y si se va a comercializar en estado tierno o como grano seco.

Para la cosecha en estado tierno o choclo se recoge las mazorcas cuando el grano está bien formado, lleno y algo lechoso, y se guarda en sacos ralos para ser comercializados.

La cosecha en grano seco se realiza cuando en la base del grano se observa una capa negra (madurez fisiológica). (8)

1.9 Manejo de la postcosecha

1.9.1 *Secado.* Las mazorcas deben ser secadas al sol sobre lonas o sobre tendales, volteándolos periódicamente para que el secado sea uniforme y adquiera una humedad del 12%.

Cuando el grano va a ser utilizado para semilla, el secado no se debe realizar directo sobre un piso de cemento porque aumenta la temperatura del grano lo que provoca su muerte. (8)

1.9.2 *Limpieza, clasificación y desgrane.* Las mazorcas que estén enfermas y las impurezas (tuzas, pelos del maíz, hojas y tallos) deben eliminarse ya que pueden ser portadores de hongos e insectos.

Las mazorcas deben desgranarse cuando los granos estén completamente secos (12% de humedad). (2)



1.9.3 *Almacenamiento.* El grano debe ser almacenado cuando alcance una humedad inferior al 12%; en lugares frescos (10-12°C) y secos, libres de humedad y de gorgojos. (8)

1.10 Usos

Se conoce que cada ecuatoriano consume el maíz ya sea en fresco como choclo, en seco como tostado, harinas, mote, canguil y en bebidas como la chicha.

El maíz también puede utilizarse para la alimentación animal como forraje para ganado ovino, bovino y equino. Así también, sirve para la preparación de alimentos concentrados para la crianza de aves, cerdos y especies menores. (8)

1.11 Principales países en producción, superficie y rendimiento

Cada año en el mundo se producen 645'414.836,10 TM (promedio para el periodo 2000-2009) de maíz. El continente que abarca la mayor producción es América con cerca del 54.49% total de la producción mundial, le sigue Asia con el 27.34%, Europa ocupa el tercer lugar con 11.23% y entre África y Oceanía suman tan solo el 6,94% del total mundial. Siendo América el continente con mayor cantidad de superficie agraria, dedicado al cultivo de maíz, aproximadamente con un 40.13% del total mundial y un rendimiento de 6.44 TM/ha. (9)

1.12 Consumo

El país que mayor volumen anual consume de maíz es México con 12'996.136,96 TM en promedio (2000-2007), en segundo lugar se encuentra China con 8'976.256,06 TM y en tercer lugar Indonesia con 6'165.832,87 TM. (9)

1.13 Maíz en el Ecuador

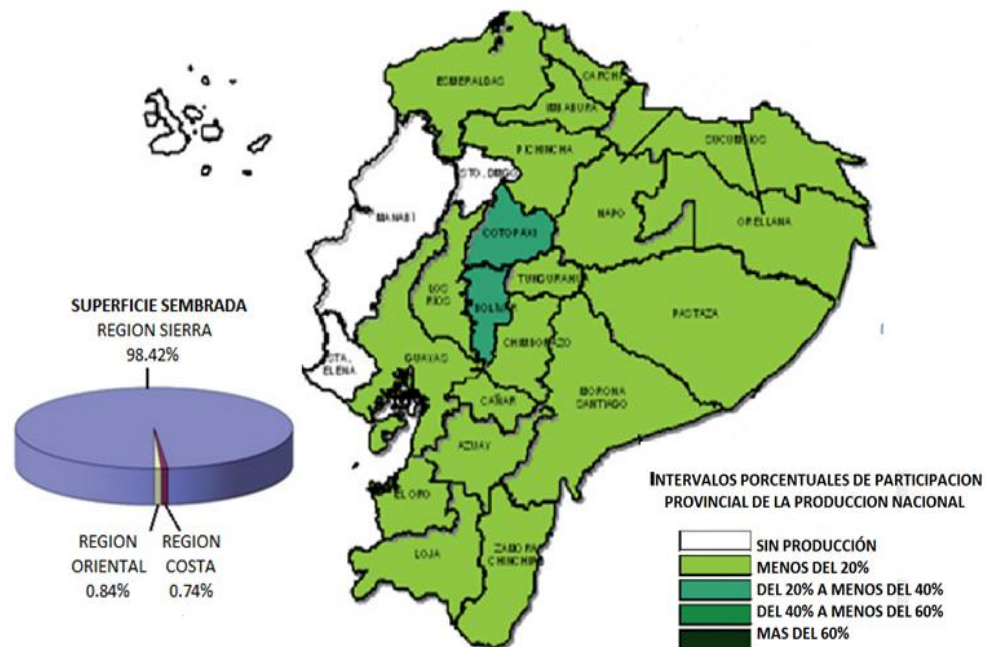
1.13.1 *Superficie, producción y rendimiento de maíz en el Ecuador.* La variedad de maíz más cultivada en la Sierra ecuatoriana es el “Cuzco Ecuatoriano” que es un tipo de maíz suave seco que crece a 2720 msnm. Su grano es de color blanco, grande, plano y harinoso. Las mazorcas son cilíndricas, ahusadas en ambos extremos, con ocho a diez hileras de granos. Las tusas son muy delgadas. El tallo de la planta es grueso, con pubescencia regularmente densa. Es común el color rojizo en las vainas de las hojas.

Las espigas son bien abiertas y las ramificaciones ampliamente espaciadas sobre el eje central.

La superficie cosechada de este tipo de maíz es 98.143 Ha. Con un rendimiento promedio de 0.44 TM/Ha y una tasa de crecimiento de 5.21%.

Las provincias con mayores zonas de cultivo del maíz suave seco son Bolívar (31.81%) y Cotopaxi (21.78%). El Azuay (19.37%) es la tercera provincia en importancia. (9)

Figura 2. Porcentaje de superficie sembrada y producción, según región y provincia.



Fuente: Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC)-Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC). Ecuador, 2010.

1.14 Valor nutritivo del maíz ecuatoriano

El maíz es un cereal muy rico en proteínas y almidón, su contenido varía de una variedad a otra. En la siguiente tabla se detalla el contenido de proteínas y

almidón de acuerdo a las variedades más representativas encontradas en el Ecuador. (2)

Tabla 2. Composición química del porcentaje de proteína y de almidón

VARIETADES	% PROTEÍNA (En base seca)	% ALMIDÓN (En base seca)
Blanco Blandito (INIAP-102)	8.30	73.10
Guagal (INIAP-111)	8.12	72.10
Chaucho (INIAP-122)	9.14	74.63
Mischca (INIAP-124)	8.03	74.03
Cuzco ecuatoriano	8.81	73.62
Chulpi (INIAP-192)	10.23	64.27
Huandango	7.21	74.86
Canguil (INIAP-198)	10.72	62.88
Racimo de uva	8.83
Sabanero	9.69	70.81
Chillo	11.29	65.78
Uchima	9.86	70.37
Clavito	11.63	63.74
Patillo	10.11	66.20
Morochón	8.84	73.57
Kcello	6.73	68.80

Fuente: Programa de Maíz. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) - Estación Experimental Santa Catalina (EESC). Ecuador, 2011.

The background of the slide is a collage of four microscopic images of fungi. The top-left image shows a branched structure with numerous small, round spores. The top-right image shows several large, oval spores on thin, filamentous hyphae. The bottom-left image shows a network of long, thin hyphae with smaller spores. The bottom-right image shows a dense, rounded cluster of spores on a stalk.

Capítulo II
Flora
micológica



CAPÍTULO 2

2. FLORA MICOLÓGICA

2.1 Introducción

La contaminación microbiana de alimentos (por bacterias, hongos filamentosos y levaduras) es un problema serio para la industria alimentaria por las grandes pérdidas económicas que trae consigo y el peligro que representa para la salud del consumidor.

Los hongos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, pudiendo encontrarse como flora normal de un alimento o como contaminantes en los equipos utilizados para el procesamiento de los alimentos. Ciertas especies de hongos y levaduras pueden ser útiles en la elaboración de algunos alimentos, sin embargo en otros casos también pueden ser causantes de su descomposición. Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad, los hongos y levaduras se manifiestan en los alimentos donde el crecimiento bacteriano es menos favorable, lo que sucede a bajos niveles de pH, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura de almacenamiento, la presencia de antibióticos o la exposición del alimento a la irradiación. Estas condiciones hacen que la contaminación por hongos y levaduras sea un problema potencial en los granos, cereales y sus derivados y alimentos de humedad intermedia.

Los hongos y las levaduras pueden utilizar ciertos sustratos como pectinas, carbohidratos como polisacáridos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos. Además poseen la capacidad de resistir circunstancias adversas en cuanto a factores físicos, compuestos químicos y factores ambientales. (10)

La colonización por hongos o levaduras puede conllevar a:

- Síntesis de metabolitos tóxicos (micotoxinas).
- Resistencia al calor, congelamiento, antibióticos o irradiación.
- Habilidad para alterar sustratos no favorables permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas.



- Pueden también causar malos olores, sabores y la decoloración de las superficies de alimento.

2.2 Generalidades de los Hongos

Los hongos pertenecen al Reino Fungi, se caracterizan por ser microorganismos eucariontes, heterótrofos. La reproducción de los hongos se lleva a cabo principalmente por medio de esporas de origen sexual y asexual, por lo que su reproducción se realiza a través de estructuras vegetativas, como lo son el propio micelio o estructuras derivadas del mismo. (11)

Los hongos tienen una influencia directa sobre el bienestar del hombre; algunos son altamente benéficos y el hombre los utiliza directamente, como en la producción de antibióticos. (12)

Cuando los hongos atacan los granos, se producen pérdidas debidas a la disminución del poder germinativo del grano; decoloración de la semilla, alteraciones bioquímicas, posibilidad de producción de toxinas y pérdida de materia seca. (13)

2.3 Condiciones para su crecimiento

Los hongos crecen mediante la producción de hifas, las cuales son importantes para su supervivencia y propagación, formando una red que aglutina los granos unos con otros; además producen esporas que pueden dispersarse por el ambiente donde se almacena el grano dando lugar a masas que dan al hongo un color característico. Las esporas pueden estar latentes durante meses o años, hasta que se desarrollan las condiciones adecuadas para el desarrollo fúngico. (14)

Se han aislado más de cien especies de hongos de los granos de cereales. Cada especie tiene una temperatura óptima entre los 25°C y 26°C, y un valor de humedad relativa para su desarrollo entre 65 y el 93%.

Por lo tanto, para prevenir el crecimiento de los hongos, la humedad relativa del aire en el interior de la masa de granos deberá ser menor que 65 % y la



temperatura lo más baja posible. Cuando el grano está expuesto a 27°C es susceptible a la invasión de hongos de almacén, así como también si el contenido de humedad está por encima del 12,5 al 13,4 %. Una de las especies más resistentes es *Aspergillus* (crecen a 65% de humedad relativa). (14)

La medición de la humedad promedio dentro del sitio de almacén no determina ni garantiza el período del almacenaje de los cereales, pues el deterioro puede presentarse en lugares aislados del almacén, donde la humedad del grano es alta; es por ello que se debe mantener una humedad relativa inferior al 13% para garantizar la inocuidad del grano. (14)

2.3.1 Humedad y agua disponible

La cantidad de agua existente en el ambiente y en los alimentos es uno de los factores importantes para el desarrollo de los hongos y para la producción de micotoxinas. Para la determinación de la cantidad de agua presente existen dos grandes unidades relacionadas que son la Humedad Relativa de Equilibrio y Actividad acuosa.

2.3.1.1 Humedad relativa de equilibrio (HRE)

Se define como la cantidad de humedad de la que disponen los microorganismos una vez alcanzado el equilibrio entre la humedad libre del producto y el vapor de agua existente en el medio ambiente que lo rodea. La HRE se expresa en porcentaje y varía entre los alimentos conforme su riqueza en glúcidos o en materia grasa. Es así, que los microorganismos que invaden a los granos y sus derivados requieren contenidos de humedad mínimos para su desarrollo y esos requerimientos son iguales en productos con alto contenido de almidón, el caso de los cereales, o con alto contenido graso como los aceites. (13)

Figura 3. Contenido de humedad de diferentes granos y semillas en equilibrio con humedad relativa de 65% - 90% y hongos que generalmente crecen bajo esas condiciones de humedad.

Humedad Relativa %	Avena, arroz, cebada, centeno, maíz, sorgo, trigo y triticale	Soya	Cártamo, cacahuete y girasol	Hongos
65 -70	13.0 -14.0	12.0 -13.0	5.0 - 6.0	<i>Aspergillus halophilicus</i>
70 -75	14.0 -15.0	13.0 -14.0	6.0 - 7.0	<i>A. restrictus</i> , <i>A. glaucus</i>
75 -80	14.5 -16.0	14.0 -15.0	7.0 - 8.0	<i>A. candidus</i> <i>A. ochraceus</i> , más los de arriba
80 -85	16.0 -18.0	15.0 -17.0	8.0 - 10.0	<i>A. flavus</i> , <i>Penicillium</i> , más los de arriba
85 -90	18.0 -20.0	17.0 -19.0	10.0 - 12.0	<i>Penicillium</i> , más los de arriba

* Porcentaje de humedad con base a peso húmedo. Las cifras son aproximaciones, en la práctica se pueden esperar variaciones ± 1.0 %.

Fuente: Christensen y Sauer (1982).

Fuente: *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados.*

Moreno, Ernest y Benavides Ocampo, Calixto. Universidad Autónoma de México, México, 1988.

2.3.1.2 Actividad acuosa (A_w)

La actividad acuosa representa a la cantidad de agua disponible para el desarrollo de los microorganismos una vez se ha alcanzado el equilibrio hídrico en el sistema alimento/ medio ambiente. La actividad acuosa se expresa como la relación existente entre la tensión del vapor de agua en el sustrato (P) y la del agua pura (P_o), a la misma temperatura.

$$a_w = P/P_o$$

Si la humedad del alimento está en equilibrio con la humedad relativa de equilibrio (HRE) de la atmósfera que lo rodea, la actividad acuosa en el alimento es numéricamente equivalente a esta:

$$aw = HRE/100$$

El agua pura tiene una actividad acuosa de 1 y está en equilibrio con una atmósfera de 100% de HRE. La actividad acuosa de un alimento es siempre menor que 1. Los valores de actividad acuosa que los diversos grupos de hongos necesitan varían de acuerdo con el sustrato y la temperatura. (14)

Figura 4. Actividad acuosa requerida para el crecimiento de hongos.

Especie	Mínima Aa requerida *
<i>Aspergillus halophilicus</i>	0.65 – 0.70
<i>Aspergillus restrictus</i>	0.70 – 0.75
<i>Aspergillus glaucus</i>	0.70 – 0.75
<i>Aspergillus candidus</i>	0.75 – 0.80
<i>Aspergillus versicolor</i>	0.80 – 0.85
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0.80 – 0.85
<i>Aspergillus flavus</i>	0.80 – 0.85
<i>Penicillium spp</i>	0.85 – 0.90

Fuente: *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados.*

Moreno, Ernest y Benavides Ocampo, Calixto. Universidad Autónoma de México, México, 1988.

Cuando un microorganismo se encuentra en un sustrato con una actividad de agua menor que la que necesita, su crecimiento se detiene. Esta detención del crecimiento no suele llevar asociada la muerte del microorganismo, sino que éste se mantiene en condiciones de resistencia durante un tiempo más o menos largo. En el caso de las esporas, la fase de resistencia puede ser considerada prácticamente ilimitada.

La mayoría de los microorganismos requieren valores de actividad de agua muy altos para poder crecer. Los hongos filamentosos son capaces de crecer en sustratos con una actividad de agua mucho menor (superior a 0.65) de la que permite el crecimiento de bacterias o de levaduras. Por esta razón se puede



producir deterioro de alimentos de baja actividad de agua por mohos y no por bacterias. (12)

2.4 Prevención de los hongos

El desarrollo de los hongos en los granos de cereales puede ser controlado por métodos químicos y físicos.

2.4.1 Métodos químicos

Los ácidos propiónico, acético, butírico y fórmico pueden ser usados como preventivo químico de los hongos en granos con alto contenido de humedad. La dosificación de cada producto varía según el contenido de humedad del grano, la temperatura ambiental del almacén, la cantidad de granos dañados y el período de almacenamiento. En general, los granos tratados con ácidos no se enmohecen, pero la viabilidad de la semilla se ve muy afectada. En el caso de un almacenamiento de 10 meses, un lote de maíz con 19, 22 y 24 % de humedad debe ser tratado con las cantidades de 0,2, 0,3 y 0,4% respectivamente. Dicho tratamiento no puede utilizarse para alimentos destinados al consumo humano. (13)

2.4.2 Métodos físicos

2.4.2.1 Control de humedad y temperatura

Para el control de los hongos de almacén se debe mantener humedades y temperaturas lo más bajas posibles en la masa de granos.

Los niveles de humedad relativa deben ser revisados rutinariamente. Es menos probable que la germinación de esporas tenga lugar si la humedad relativa se mantiene entre el 45% y el 55%. Cuando los niveles de humedad relativa sobrepasan el 65% se hace necesario el uso de deshumificadores a fin de reducir el contenido de humedad en el aire. Una temperatura de entre 18°C y 20°C es la óptima para reducir la germinación. Estos niveles de humedad y temperatura únicamente disminuyen las posibilidades de germinación y de desarrollo, no las eliminan y por lo tanto, deben tenerse en cuenta otros factores tales como una adecuada ventilación. (14) Otra manera de retardar el crecimiento de los hongos



es almacenando los granos a bajas temperaturas como se hace en los bancos de germoplasma. (13)

2.4.2.2 Condición del grano

Los granos y semillas deberán estar en buenas condiciones y no presentar ningún daño, es decir que presenten roturas, enmohecimiento, granos partidos y contaminados con gorgojos; para evitar la aparición de hongos y facilitar las mejores condiciones de almacenaje del grano puesto que los factores mencionados los vuelven vulnerables a la contaminación. (13)

2.4.2.3 Materias y organismos extraños

La limpieza del grano antes del secado es una de las mejores formas de evitar la presencia de hongos y de insectos, pues el grano con alto porcentaje de materias extrañas generalmente no está del todo seco. Algunos de los insectos que infestan los granos almacenados, en los que las etapas de larva y ninfa se desarrollan dentro del grano, llevan consigo un gran número de esporas de hongos de almacén. La infestación por insectos provee la temperatura y la humedad necesarias para un rápido crecimiento fúngico. (10)

2.5 Hongos contaminantes de cereales

Las especies de hongos suelen dividirse en dos grupos:

2.5.1 Hongos de campo

Los hongos de campo son aquellos que invaden las semillas mientras que el cultivo todavía está en el campo y requiere condiciones de alta humedad.

Los principales hongos de campo encontrados en los granos de los cereales son de los géneros *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Alternaria* y *Fusarium*. Estos hongos causan la decoloración de los granos de los cereales, lo que a menudo se observa cuando los granos quedan expuestos a la excesiva humedad durante la cosecha. Además de afectar la apariencia del grano, los hongos de campo pueden ocasionar una disminución del poder germinativo de las semillas. (12)



2.5.2 Hongos de almacén

Los hongos de almacén, especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, causan diversos daños a los granos y semillas almacenadas, siendo los más sobresalientes la reducción del poder germinativo de las semillas, el ennegrecimiento de los granos y la producción de micotoxinas.

Los daños causados por los hongos de almacén son mayores que los producidos por los hongos de campo. Las esporas de algunos hongos de almacenaje están presentes en los granos antes de la cosecha. Bajo condiciones favorables de temperatura y humedad, las esporas crecen y los granos son invadidos por los hongos. Las condiciones que afectan el desarrollo de los hongos de almacén en los granos son:

- humedad elevada del grano
- temperatura relativamente alta del grano
- condición del grano (partido, sucio, etc.)
- cantidad de materias extrañas en el grano tales como residuos de partes de la planta, piedras, etc; y
- presencia de organismos extraños como insectos. (12)

2.6 Hongos contaminantes del maíz

2.6.1 Género *Aspergillus*

2.6.1.1 Generalidades

Pertenece a la familia Aspergillaceae, género *Aspergillus*. De este género se conoce 185 especies. Los hongos de éste género están muy difundidos, son oportunistas y viven como saprófitos en el suelo, vegetales en descomposición, cualquier tipo de materia orgánica causando el deterioro de muchos productos alimenticios, entre ellos el maíz. (11)

Es probable que los hongos produzcan metabolitos como producto de la invasión fúngica llamados micotoxinas, siendo tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También producen la inhibición de la germinación junto con

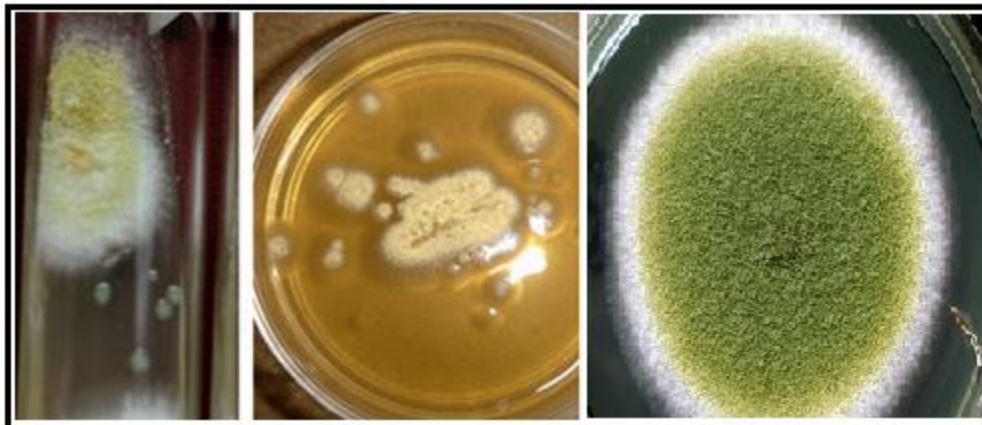
cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas. (11)

2.6.1.2 Morfología

2.6.1.2.1 Estudio macroscópico

El aspecto y la pigmentación de las colonias son las principales características para la identificación macroscópica de los grupos de aspergilos. Las colonias crecen con rapidez (3-4 días), poseen distintos tonos que van desde el color blanco, verde, café, pardo, amarillo, rojizo, gris, negro y puede haber difusión del pigmento al medio de cultivo. La superficie es aterciopelada, granulosa o pulverulenta; los márgenes pueden ser bien delineados o difusos e irregulares. (11)

Figura 5. Aspecto macroscópico de las colonias del género *Aspergillus*.



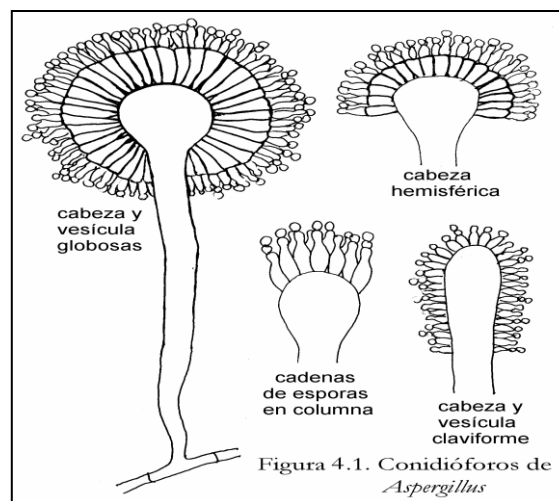
Fuente: *Aspergillus*. Méndez Tovar, Luis. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Microbiología y Parasitología. México, 2012.

2.6.1.2.2 Estudio microscópico

Una característica muy importante de este tipo de hongos es que son de reproducción asexual que se evidencia por la presencia de la cabeza aspergilar constituida por:

- a) El conidióforo, el filamento largo y hialino con o sin tabiques; a veces es ramificado, termina en una vesícula y nace en una hifa vegetativa. La base del conidióforo puede ser hialina o pigmentada, lisa o rugosa, y se llama célula pie.
- b) Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y en las que se disponen hileras de fiálides; la pared puede ser delgada o gruesa y generalmente no hay septo que la separe del conidióforo.
- c) Fiálides, en forma de botella nacen directamente de la vesícula (uniseriadas); también pueden nacer de las células estériles llamadas métulas o células de soporte (biseriadas). Las fiálides portan cadenas de esporas redondeadas y basipétalas (la más joven es la basal) pueden estar en una sola línea o dando lugar a otra.
- d) Conidios, constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. (15)

Figura 6. Aspecto de conidióforos del género *Aspergillus*.

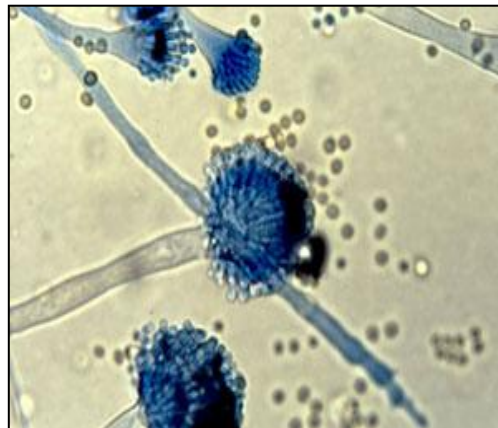


Fuente: *Aspergillus*. *Los Hongos de los alimentos y forrajes*. Carrillo, Leonor. Universidad Nacional de Salta, México, 2003.

Los teleomorfos poseen meiosporos en ascos que pueden producirse en racimos desnudos o dentro de ascomas. Éstos tienen una pared formada por hifas sueltas, un plecténquima o un tejido estromático. (15)

La forma de la vesícula y la disposición de las fiálides determinan que los conidios tomen una disposición en columnas o radiada, lo que constituye otra característica para la identificación del aspergilo. Además la pigmentación de los conidios, la superficie y dimensiones del conidióforo, la forma y textura de las esporas y colonias, hacen posible la identificación de este género.

Figura 7. Vista microscópica del género *Aspergillus* teñida con azul de lactofenol, permite visualizar las cabezas aspergílicas con fiálides que sólo ocupan la parte superior de la vesícula, y las conidias incoloras.



Fuente: *Aspergillus*. Méndez Tovar, Luis. Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Microbiología y Parasitología. México, 2012.

2.6.1.3 Cultivos

La temperatura de incubación está entre los de 25°C y 37°C. La ornamentación de los conidios cambia con la edad y en unas dos semanas las esporas están totalmente maduras.

Para el aislamiento se usa como medio selectivo Rosa de Bengala-Diclorán con inhibidores de la proliferación bacteriana y del desarrollo exuberante de algunos



mohos dando oportunidad a todas las esporas de originar una colonia aunque restringida, si el número no es demasiado grande. Con el fin de identificar los aspergilos se suele sembrar en placas de Agar Extracto de Malta, Czapek-Levadura, Czapek- Glicerol o Czapek-20% Sacarosa incubando entre 25 °C - 37°C registrando las características macro y micro-morfológicas propias del género.

El volumen de medio vaciado en la caja de Petri influye sobre el diámetro de las colonias y otras características macroscópicas por ejemplo un mayor espesor hace que se produzca más esclerocios, el reverso de la colonia sea más oscuro, y mejora el crecimiento micelial. Algunas de las razones para tal comportamiento son una mayor disponibilidad de nutrientes y un cambio más lento en la actividad del agua o el pH.

La degeneración de las cepas (pleomorfismo) es un problema de muchos hongos, los cuales sufren cambios morfológicos como colonias algodonosas, reducción de la esporulación y modificaciones de los conidióforos, asociado a la pérdida de la capacidad de producir toxinas cuando se los mantiene durante mucho tiempo mediante sucesivos repiques. (15)

2.6.1.4 Identificación

Tradicionalmente se hace en base a las características macro y micromorfológicas en diversos medios de cultivo incubados a distintas temperaturas. Se han desarrollado métodos inmunológicos rápidos para la identificación de los hongos contaminantes de granos y otros productos vegetales, y técnicas moleculares en base al polimorfismo del ADN nuclear y mitocondrial. (15)

2.6.1.5 Ambiente

La ubicuidad de los aspergilos es debida a su capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre sustratos con diverso contenido de humedad. La colonización de los granos durante el almacenamiento, por *Aspergillus* y otros mohos, se produce de forma explosiva cuando la humedad relativa ambiente intergranular se eleva por sobre el 70%, sin que se desencadene aún el fenómeno de brotación.

El rango de temperatura para el crecimiento va desde 0-5°C hasta 50-55°C, estando el óptimo entre 30-33°C para la mayoría de las especies.

Si se observa granos con un contenido de humedad del 15% y no fueron afectados por los aspergilos durante un año es porque la temperatura de almacenamiento estuvo por debajo de 5-10°C, ésta podría ser una medida adoptada para evitar el crecimiento de la micobiota. (15)

Figura 8. Temperatura y actividad acuosa requeridas para el desarrollo de algunas especies de *Aspergillus*.

ESPECIES	TEMPERATURA °C		ACTIVIDAD DE AGUA	
	RANGO	ÓPTIMO	MÍNIMO	ÓPTIMO
<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>	6 - 45	35 - 37	0,78	0,95
<i>A. candidus</i>	3 - 44	25 - 32	0,75	0,90 - 0,98
<i>A. fumigatus</i>	10 - 55	40 - 42	0,85	0,98 - 0,99
<i>A. restrictus</i>	9 - 40	30	0,71	0,96
<i>A. versicolor</i>	4 - 39	25 - 30	0,78	0,95

Fuente: *Aspergillus. Los Hongos de los alimentos y forrajes.* Carrillo, Leonor. Universidad Nacional de Salta, México, 2003.

2.6.2 Género *Penicillium*

2.6.2.1 Generalidades

Los penicilios son mohos comunes que se desarrollan sobre los más diversos sustratos: granos, paja, cueros, frutas, etc. Existen alrededor de 200 especies. La importancia de estos mohos en la alimentación humana y animal se debe a que, además de causar deterioro, producen toxinas. (16)

Los penicilios crecen sobre los alimentos preparados o sus materias primas, ya sean de origen vegetal o animal, si hallan la actividad del agua y los nutrientes necesarios.

En el siguiente cuadro se resumen datos sobre los límites de temperatura y Aw entre los que se desarrollan algunas especies. (16)

Los granos de cereales pueden contener penicilios aún antes de la cosecha, especialmente en las épocas húmedas, pero la mayor contaminación ocurre en los depósitos donde se mantienen las esporas desde una cosecha anterior. La esporulación a una baja actividad del agua permite a los hongos completar su ciclo de vida sobreviviendo a las condiciones adversas, para ser luego diseminados por insectos y ácaros.

Los penicilios como los aspergilos no son afectados por la luz y esporulan fácilmente en la obscuridad. (16)

Figura 9. Temperatura y actividad del agua necesarias para el crecimiento de algunas especies de *Penicillium*

ESPECIES	TEMPERATURA °C		ACTIVIDAD DEL AGUA	
	RANGO	ÓPTIMO	MÍNIMA	ÓPTIMA
<i>P. aurantiogriseum</i>	-2 a 32	23	0,81 - 0,83	0,98
<i>P. brevicompactum</i>	12 - 30	23	0,80 - 0,82	0,99
<i>P. citrinum</i>	<5 - 37	26 - 30	0,80 - 0,84	
<i>P. commune</i>	0 - 37	25	0,85	
<i>P. digitatum</i>	6 - 37	20 - 25	0,90	0,99
<i>P. expansum</i>	-3 a 35	25 - 26	0,82 - 0,83	0,99
<i>P. islandicum</i>	10 - 42	31	0,83 - 0,86	
<i>P. roquefortii</i>	<5 - 35	25	0,83	0,99
<i>P. verrucosum</i>	0 - 31	20	0,80	

Fuente: *Penicillium. Los Hongos de los alimentos y forrajes.* Carrillo, Leonor. Universidad Nacional de Salta, México, 2003.

2.6.2.2 Morfología

2.6.2.2.1 Estudio macroscópico

En los cultivos en medios habituales es un hongo de crecimiento rápido y aspecto granuloso o pulverulento; al principio es blanquecino y después verde-amarillento o verde oscuro, en ocasiones azulado con bordes blanquecinos, el reverso es marrón o rojo. (11)

Figura 10. Aspecto macroscópico de colonias del género *Penicillium*.

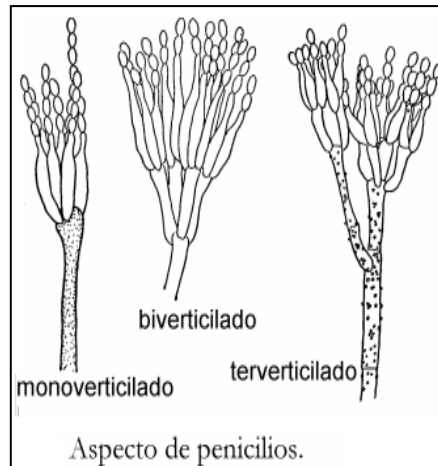


Fuente: *Penicillium notatum*. Portal Educativo de Uruguay. Uruguay, 2009.

2.6.2.2 Estudio microscópico

Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel. Existen tres tipos de conidióforos del género *Penicillium* (monoverticilado, biverticilado y terverticilado), cuyas ramificaciones se ubican formando verticilos. Por ejemplo, si hay sólo un verticilo de fiálides el pincel es monoverticilado. Las ramificaciones de un pincel poliverticilado son ramas, rámulas, métulas y fiálides. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada. Se llama conectivo a la porción de pared que une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas. (11)

Figura 11. Aspecto de la disposición de fiálides del género *Penicillium*.



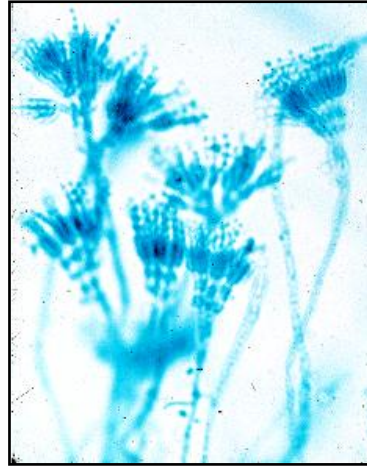
Fuente: *Penicillium. Los Hongos de los alimentos y forrajes.* Carrillo, Leonor. Universidad Nacional de Salta, México, 2003.

Los filamentos o hifas alcanzan un diámetro entre 2 o 3 μm y tienen septos con un poro central que no es visible al microscopio óptico. Las paredes del estípote, de las ramas o de las métulas pueden ser lisas, rugosas o equinuladas.

La pared de las fiálides es siempre lisa. Las fiálides pueden tener forma de ánfora o bien ser casi cilíndricas con la porción apical en forma de cono. El tamaño máximo de las fiálides es de 15 μm y la parte terminal no supera los 3 μm de largo.

Los conidios son esféricos o elipsoidales, unicelulares, hialinos que en masa se ven de color verde, verde azulado, verde aceituna o gris. La pared de los conidios es lisa o rugosa según las especies. (16)

Figura 12. Vista microscópica del género *Penicillium*, tinción azul de lactofenol.



Fuente: Autoras, Dalia Pérez y Ma. Elena Zárate.

Las cepas de *Penicillium* con reproducción sexuada corresponden a los géneros teleomórficos: I) *Eupenicillium* que forma cleistotecios con pseudoparénquima constituido por células de pared engrosada, y II) *Talaromyces* que presenta los ascos rodeados de hifas entrelazadas formando la delgada pared del gimnotecio. (16)

2.6.2.3 Cultivos

En los estudios taxonómicos, las cepas son sembradas y observadas bajo condiciones de laboratorio normalizadas empleando medios como Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Extracto de Malta (MEA), Malta-Glucosa o Czapek-Glicerol. Sin embargo hay variabilidad mínima según la fuente del agar, agua o extracto de levadura, así como con el volumen de medio vaciado en las placas. La aparición de los cleistotecios o gimnotecios en el término de una a tres semanas y el aspecto de los ascosporos son los principales elementos para identificar a los teleomorfos. Hay que considerar también los errores ocasionales por cambios imprevistos de la temperatura de incubación o de la composición del medio, por lo que las pruebas deben ser repetidas al menos una vez.

Las colonias de *Penicillium* son circulares, siempre que no haya impedimento alguno para su crecimiento, con un borde neto muchas veces sin fructificación y



mostrando el color del micelio. Éste es generalmente blanco, pero en algunas especies es amarillo, anaranjado, púrpura o pardo claro. La superficie de la colonia madura con sus conidios formados, puede ser aterciopelada, ligeramente algodonosa o con pequeños haces de conidióforos. En unos pocos casos los haces miden varios milímetros (coremios) con el extremo constituido por las cadenas de esporas.

Los medios como Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Extracto de Malta (MEA), Creatina-Sacarosa, Creatina-Diclorán y Sacarosa-Diclorán permiten aislar y diferenciar penicilios, incubando a 25°C durante una semana. (16)

2.6.2.4 Identificación

Es importante poder diferenciar los penicilios de los otros hongos que forman esporas en conidióforos ramificados. Es común confundir el género *Penicillium* con el género *Paecilomyces* que tiene fiálides con el ápice muy alargado, conidios elípticos y colonias de tonos pardos pero nunca verdes. Otro de los géneros con el cual puede haber confusión es el género *Scopulariopsis*, sin embargo éste produce colonias pardas y esporas en anélices, lo cual ayuda en la diferenciación.

La identificación tradicionalmente se hace en base a las características macro y micromorfológicas en diversos medios de cultivo incubados a distintas temperaturas aptas para su desarrollo.

En los últimos años se han desarrollado métodos inmunológicos y moleculares para la identificación del género *Penicillium*, como por ejemplo mediante inmunoelectroforesis, electroforesis en campo pulsado, amplificación de ácidos nucleicos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). (17)

2.6.3 Género *Fusarium*

2.6.3.1 Generalidades

El género *Fusarium* presenta grandes dificultades debido a su gran variabilidad taxonómica e incluso la inestabilidad de ciertos rasgos utilizados para la clasificación.



La mayoría de las especies de *Fusarium* son parásitos facultativos de las plantas y en alguna etapa de su ciclo de vida, se encuentra en el suelo, asociada con la materia orgánica viva y muerta en la forma de micelio, conidios o clamidósporo. (11)

Las especies de *Fusarium* se encuentran en los vegetales antes de la cosecha. Como persisten en los productos almacenados, si la actividad del agua lo permite crecerán causando alteraciones y a veces produciendo toxinas. Salvo *F. culmorum*, los fusarios no compiten bien con las especies de *Aspergillus* y *Penicillium*. Las especies: *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. semitectum*, *F. sporotrichioides* y *F. tricinctum* se encuentran en cereales en general; y *F. nygamai*, *F. subglutinans* y *F. verticilloides* en maíz.

En el siguiente cuadro se muestra los rangos de temperatura y actividad del agua para el crecimiento de algunas especies. (18)

Figura 13. Temperatura y actividad del agua requeridas para el crecimiento de algunas especies de *Fusarium*.

Especies	Ambiente	Temperatura °C	
		rango	óptima
<i>F. acuminatum</i>	helado, frío		
<i>F. avenaceum</i>	frío	-3 a 31	25
<i>F. chlamydosporum</i>	templado, subtropical, tropical		
<i>F. culmorum</i>	frío		
<i>F. equiseti</i>	frío, templado, subtropical		
<i>F. graminearum</i>	templado	...	24 a 26
<i>F. longipes</i>	subtropical, tropical		
<i>F. nygamai</i>	templado, subtropical		
<i>F. oxysporum</i>	frío, templado, subtropical		
<i>F. poae</i>	...	2 a 39	22 a 28
<i>F. sambucinum</i>	helado, frío		
<i>F. semitectum</i>	helado, frío, templado, subtropical		
<i>F. solani</i>	frío, templado, subtropical		
<i>F. tricinctum</i>	...	0 a 35	25
<i>F. verticilloides</i>	templado	2 a 37	22 a 28
Media anual: helado <5°C, frío 5-15°C, templado 15-20°C, subtropical 20-25°C, tropical >25°C.			
Especies	Ambiente	Actividad del agua	
		mínima	óptima
<i>F. avenaceum</i>	medio, húmedo	0,89	0,998
<i>F. culmorum</i>	medio, húmedo	0,87	...
<i>F. graminearum</i>	...	0,89	0,98
<i>F. moniliforme</i>	...	0,87	...
<i>F. oxysporum</i>	seco, medio, húmedo	0,87	...
<i>F. poae</i>	...	0,89	0,998
<i>F. sporotrichioides</i>	...	0,86	...
<i>F. tricinctum</i>	...	0,89	0,998
Precipitación anual: seco 250-500 mm, medio 500-1000 mm, húmedo >1000 mm.			

Fuente: *Fusarium. Los Hongos de los alimentos y forrajes.* Carrillo, Leonor. Universidad Nacional de Salta, México, 2003.

Algunos fusarios son patógenos de los cereales y pueden formar micotoxinas (fusariotoxinas) en los granos aún antes de la cosecha. Otros fusarios pueden crecer en el refrigerador y aquellos con capacidad competitiva contribuyen a la podredumbre de frutas y hortalizas almacenadas. La persistencia de los fusarios en el suelo durante uno a varios años se debe, principalmente, a la presencia de las clamidosporas.

La velocidad de crecimiento suele variar a la temperatura óptima (25 - 30°C), pero no la respuesta al pH. (11) (18)

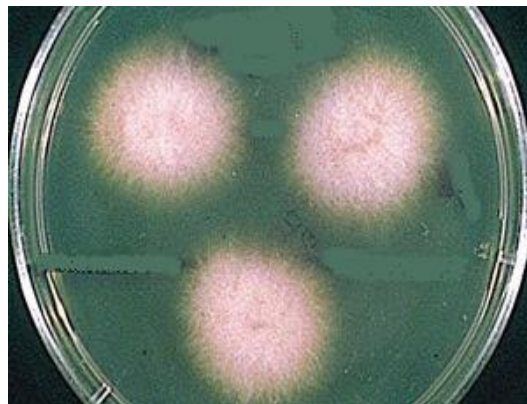
2.6.3.2 Morfología

2.6.3.2.1 Estudio macroscópico

Las colonias de los distintos fusarios que crecen moderada a profusamente, tienen diversos colores como blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo, especialmente en el reverso de la colonia, excepto pardo oscuro o negro. El micelio es disperso o denso, ya sea algodonoso, como un paño o con una zona central de funículos, pero en algunos casos es limoso. Hay fusarios con masas limosas de color anaranjado. Los pigmentos que difunden en el agar suelen variar de color o tono con el pH. Algunas especies presentan zonas concéntricas de distinta morfología macroscópica debido a la secuencia luz - oscuridad.

Existen algunos fusarios que producen peritecios y la mayoría de las especies son heterotálicas. (18)

Figura 14. Aspecto macroscópico de colonia del género *Fusarium*.

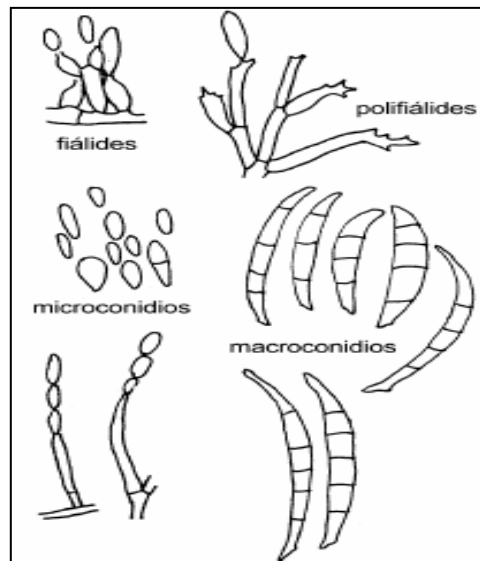


Fuente: Colonias de *Fusarium oxysporum*. Proyecto Mycotoxpluim. Campell, Lollie. Centro de Investigación Veterinario y de Agroquímicos (CODA-CERVA). Bélgica ,2010.

2.6.3.2.2 Estudio microscópico

La forma y tamaño de las esporas es la característica principal para el reconocimiento de los fusarios (Figura 15). Las esporas están dispersas en el micelio aéreo o en esporodocios o masas limosas. (11)

Figura 15. Estructuras características del género *Fusarium*.



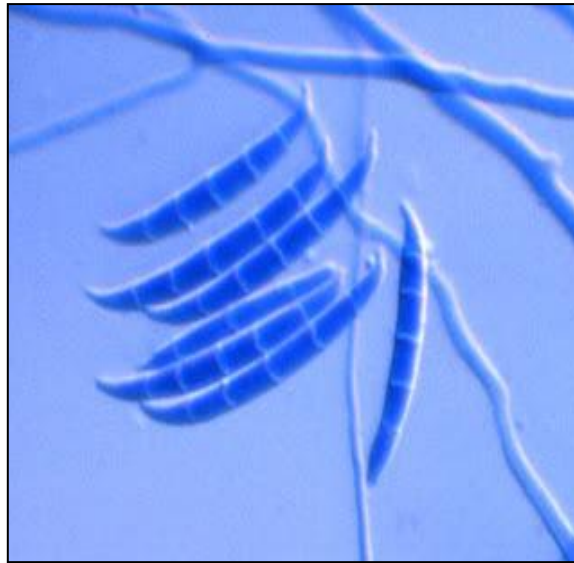
Fuente: *Fusarium. Los Hongos de los alimentos y forrajes.* Carrillo, Leonor. Universidad Nacional de Salta, México, 2003.

Los macroconidios son curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie. Los microconidios son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o subglobosos, similares en ancho a los macroconidios, con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas mucosas, pero en algunas especies en cadenas basípetas. No siempre se producen macroconidios y microconidios a la vez.

Los conidióforos del micelio aéreo en algunos casos sólo constan de una célula conidiógena, en otros están ramificados, a veces en verticilos.

Las monofiálides producen conidios desde una sola abertura y en las polifiálides surgen las esporas desde más de una abertura en la misma célula. (18)

Figura 16. Macroconidios teñidos con azul de lactofenol.



Fuente: *Fusarium* macroconidios. *Controversias en Prevención de Infección Hospitalaria*. Edmond, Mike. Estados Unidos, 2011.

La presencia de una célula basal con forma de pie en los macroconidios se considera característica de *Fusarium*. Unas pocas especies de *Fusarium* presentan conidios pluriseptados sin esa célula basal y se las llama mesoconidios. Algunas especies presentan clamidosporas terminales, laterales o intercalares, a veces formando cadenas. Las células conidiales ocasionalmente se transforman en clamidosporas. Algunas especies forman esclerocios irregulares, de color beige, ocre, pardo o gris oscuro. (11)

2.6.3.3 Cultivos

Para la obtención directa de las especies de *Fusarium* en los cereales, se depositan los granos con la superficie con o sin desinfección sobre placas del medio Papa-Dextrosa-Diclorán, Papa-Sacarosa, Rosa de Bengala Diclorán o Agar Extracto de Malta y se incuba 7 días a 25°C.



En el caso de la presencia de esporoquios en la superficie vegetal, es posible observar las esporas con 30 a 50 aumentos a partir de una suspensión en agua estéril.

Tanto para la identificación de las cepas como para la producción de toxinas se requiere un cultivo bien esporulado. Los cultivos deben estar bien aireados porque el CO₂ suprime la formación de los conidios. (18)

2.6.3.4 Identificación

Para realizar la identificación de los fusarios se toma en cuenta su morfología macro y microscópica. Los micro y macroconidios son estructuras claves para su identificación, así como también la disposición de los conidios en conidióforos. La producción de metabolitos secundarios contribuye también a la identificación. (18)

Las condiciones ambientales y nutricionales del sustrato tienen gran influencia sobre las características morfológicas, por lo que se usan medios de cultivos específicos para su crecimiento o enriquecimiento.

2.6.4 Género *Rhizopus*

2.6.4.1 Generalidades

Este género está asociado con sustratos como el suelo, plantas y frutas, la mayoría crecen aun en altas temperaturas; se usan en la fermentación de alimentos y, son patógenos para animales y seres humanos. (11)

Sin embargo hongos como *Mucor* y *Rhizopus* son considerados como hongos saprófitos que pueden contaminar los cereales y afectarlos durante su almacenamiento. La contaminación generalmente se produce por contacto del grano con el suelo. (11)

2.6.4.2 Morfología

2.6.4.2.1 Estudio macroscópico

Las colonias de *Rhizopus* son de crecimiento rápido y, al cabo de tres días a 25°C, cubren la superficie del agar con una colonia algodonosa con denso micelio aéreo,

al principio de coloración blanca y luego grisácea o amarillenta (micelio rojizo, grisáceo o marrón), de aspecto consistente. (11)

Figura 17. Cultivo de *Rhizopus* spp. Agar Sabouraud Dextrosa.

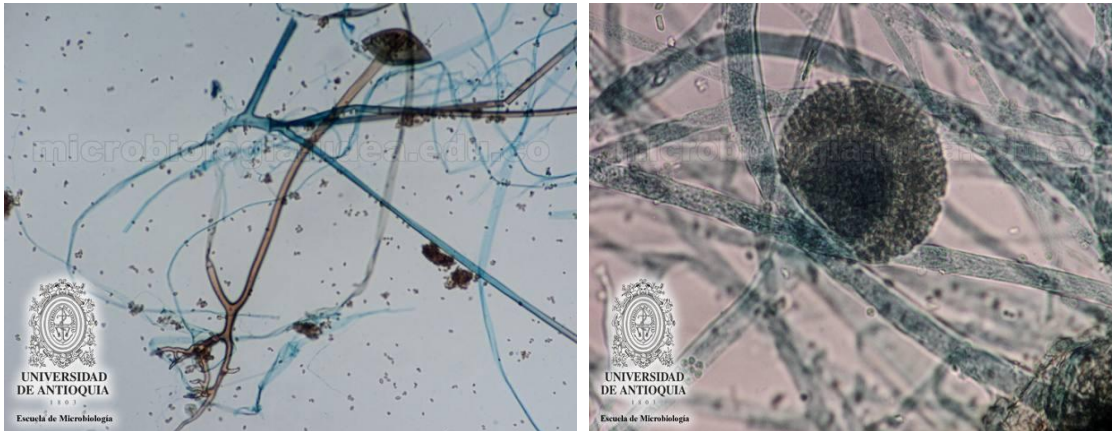


Fuente: Cultivo de *Rhizopus* spp. Tangarife, Verónica. Universidad de Antioquia. Departamento de Microbiología. Colombia, 2011.

2.6.4.2.2 Estudio microscópico

Se caracteriza por la presencia de estolones y rizoides muy pigmentados o hialinos, presenta esporangióforos aislados o en grupo (de hasta 2 mm x 20 μ m), de color pardo oscuro que nacen directamente de los nudos y están en la parte opuesta a los rizoides bien desarrollados. Los esporangios son esféricos (de hasta 275 μ m de diámetro) de color negro con columela. Las esporangiosporas son negras de 8 a 15 μ m. Abundantes rizoides y zigosporas esféricas de pared gruesa, desnuda (hasta 200 μ m de diámetro). Las clamidosporas están ausentes. (19)

Figura 18. Vista microscópica del género *Rhizopus*.



Fuente: Cultivo de *Rhizopus* spp. Tangarife, Verónica. Universidad de Antioquia. Departamento de Microbiología. Colombia, 2011.

2.6.4.3 Cultivos

Para la obtención directa de *Rhizopus* en los cereales, se depositan los granos con la superficie desinfectada o no sobre placas del medio Papa-Dextrosa-Cloranfenicol, Agar Extracto de Malta - Cloranfenicol y se incuba a 25°C, se puede observar al tercer día un crecimiento abundante del mismo. (11)

2.6.4.4 Identificación

Para realizar la identificación de *Rhizopus* se toma en cuenta su morfología macro y microscópica descritas anteriormente.

Capítulo III

Metodología





CAPITULO 3

3. METODOLOGÍA

3.1 Tipo de Investigación

Para determinar la flora micológica del maíz seco y su harina en la parroquia San Juan se empleó un estudio analítico experimental de corte longitudinal.

El estudio experimental para los granos del maíz se basó en un diseño factorial 3 x 2, que consistió en 3 tratamientos con 2 niveles de variables independientes cada uno: I) a diferente temperatura (18°C vs 25°C); II) a diferentes tiempos de almacenamiento (inmediatamente después del muestreo y después de 2 meses de almacenamiento controlado), y III) desinfección del grano para la siembra en los medios de cultivo. Además, cada conjunto experimental fue inoculado en 3 medios de cultivo distintos con el fin de potenciar el crecimiento de ciertos hongos propios del maíz.

El estudio experimental para la harina de maíz se basó en 1 tratamiento con 2 niveles de variables independientes: a diferente temperatura (18°C vs 25°C).

3.2 Muestreo

El muestreo fue de tipo probabilístico aleatorio simple.

El muestreo se llevó a cabo durante el periodo de Octubre-Noviembre de 2012 en la parroquia de San Juan-Gualaceo. Se eligieron 10 productores por muestreo aleatorio simple a partir de la lista total de productores que cultiven la variedad de maíz “Cuzco Ecuatoriano” en la zona mencionada.

3.3 Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la parroquia de San Juan, la misma que se encuentra ubicada en la provincia del Azuay, a 50 Km de la ciudad de Cuenca y 15 Km del centro urbano del cantón Gualaceo. Se ubica a una altitud de 2566 msnm, su clima es semi- húmedo y su temperatura promedio es de 17°C.



3.4 Tamaño de la muestra

Se recolectaron 40 mazorcas por productor, las mismas que se transportaron en fundas plásticas debidamente codificadas y cerradas para evitar cualquier tipo de contaminación. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Alimentos y Nutrición VLIR-IUC de la Facultad de Ciencias Químicas, para realizar la respectiva siembra e identificación de la flora micológica. Posteriormente las muestras de maíz en grano fueron almacenadas por 2 meses para ser evaluadas nuevamente.

De la mitad de las mazorcas recolectadas, se procedió a obtener la harina en forma artesanal de cada uno de los productores dentro de las siguientes 48 horas. Dicho proceso fue realizado en los molinos ubicados en las calles Dávila Chica y Antonio Delgado del cantón Gualaceo. La flora micológica de la harina de maíz se determinó luego de 2 meses de almacenamiento controlado.

La identificación de las características de las mazorcas y la confirmación de la variedad del maíz (Cuzco Ecuatoriano) de las muestras se realizó con la colaboración de profesionales expertos en la producción del maíz del INIAP (*Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias*).

3.5 Criterios de inclusión

Se trabajó con muestras de grano de maíz seco en mazorca correspondiente a la variedad “Cuzco Ecuatoriano” que es cultivado por los pobladores de la parroquia San Juan.

3.6 Criterios de exclusión

De las muestras recolectadas se excluyeron los granos en mal estado (rotos o visiblemente podridos) y con presencia de insectos.

3.7 Instrumentos adicionales para recolección de datos

Junto a la identificación de cada productor, se recolectó información sobre prácticas agrícolas y características morfológicas con la finalidad de caracterizar la variedad del maíz. Estos datos se recopilaron mediante encuestas durante el



muestreo utilizando fichas de recolección (Anexo 1 y 2).

3.8 Tratamiento de las muestras para el cultivo

La mitad de las muestras del grano de maíz se procesaron dentro de las siguientes 48 horas de realizada la recolección de las muestras y después de 2 meses de almacenamiento junto con la harina de maíz. Las muestras fueron almacenadas en condiciones secas y a temperatura ambiente (18°C) en sacos abiertos para simular las condiciones de almacenamiento de los productores. Para la siembra se utilizó los granos de maíz con y sin desinfección. La desinfección se realizó con una solución de hipoclorito de sodio al 0,4%. Las muestras fueron sembradas en los siguientes medios de cultivo: Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Rosa de Bengala con Diclorán (DRBC), y Agar Extracto de Malta (MEA).

3.8.1 Agar Papa Dextrosa (PDA)

3.8.1.1 Fundamento

El Agar Papa Dextrosa es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras a partir de muestras de alimentos, derivados de leche y productos cosméticos. Los hongos crecen en este medio para desarrollar una morfología típica. (20)

La base del medio es altamente nutritiva y permite la esporulación y la producción de pigmentos. Los carbohidratos y la infusión de papa promueven el crecimiento de mohos y levaduras, y el agar es adicionado como agente solidificante. El pH debe ser ajustado a aproximadamente $3,5 \pm 0,1$ con ácido tartárico al 10 %, para inhibir el crecimiento bacteriano. Además, para asegurar la inhibición del crecimiento bacteriano se factible adicionar Cloranfenicol como antibiótico en una concentración de 0,1g/L. (20)

3.8.1.2 Composición (39 g de medio en un litro de agua destilada)

Infusión de Papa	4.0 g
Dextrosa	20.0 g
Agar Bacteriológico	15.0 g

Ph 5.6 ± 0.2 (21)

3.8.2 Agar Rosa de Bengala Diclorán (DRBC)

3.8.2.1 Fundamento

El agar Rosa de Bengala es un medio de cultivo selectivo utilizado en el recuento y aislamiento de hongos (específico para *Fusarium*) y levaduras. Este medio reduce el crecimiento de bacterias y disminuye la dispersión de las colonias de hongos, evitando el solapamiento de colonias de lento crecimiento con las que crecen más rápidamente. El Rosa de Bengala es absorbido por las colonias de levaduras y mohos facilitando así su reconocimiento y enumeración. La presencia del cloranfenicol aumenta la selectividad del medio, inhibiendo el crecimiento bacteriano. La glucosa y la peptona son las bases nutritivas del medio. (22)

3.8.2.2 Composición (31.6 g de medio en un litro de agua destilada)

Rosa de Bengala	0,025g
Diclorán	0,002 g
Cloranfenicol	0,1 g
D (+)-Glucosa	10,0 g
Magnesio Sulfato	0,5 g
Peptona de harina de soja	5,0 g
DihidrógenoFosfato Potásico	1,0 g
Agar	15,0 g
pH final:	$5,6 \pm 0,2$ (23)

3.8.3 Agar Extracto de malta (MEA)

3.8.3.1 Fundamento

El agar extracto de malta es un medio recomendado para desarrollar una morfología típica de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. En medio ácido, el

extracto de malta, que es rico en glúcidos, es capaz de aportar todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de mohos y levaduras. Por el carácter ácido del medio, se inhibe el crecimiento de la mayor parte de los gérmenes contaminantes, en caso de que se lleve a cabo el recuento de colonias el pH debe ajustarse a 3,5. (24)

3.8.3.2 Composición (33.6 g de medio en un litro de agua destilada)

Maltosa, técnica	12,75 g
Dextrina	2,75 g
Glicerol	2,35 g
Peptona	0,78 g
Agar-agar	15,0 g
pH final:	4,6 ±0 (24)

3.8.4 Preparación de los medios

Suspender la cantidad indicada en gramos del medio en un litro de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución y hervir durante un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar a una temperatura entre 45-50 °C y vaciar en placas de Petri estériles.

Figura 19. Medios de cultivo preparados



Fuente: Autoras, Dalia Pérez y Ma. Elena Zárate.



3.8.5 Interpretación de resultados

Los hongos crecen como colonias difusas. En el grano el recuento se expresó como porcentaje de grano invadido, mientras que para la harina la cuenta del número de colonias se relaciona con el factor de dilución de la muestra, para determinar el número de microorganismos por gramo o mililitro de muestra.

3.8.6 Preparación de la solución de Hipoclorito de Sodio al 0,4%

Se diluyó 8 ml de una solución de hipoclorito al 5% (Clorox) a 100 ml con agua destilada estéril, obteniendo una solución de concentración 0,4%.

3.9 Determinación de la actividad acuosa (Aw)

La Aw se determinó en las muestras de granos de los 10 productores en 2 ocasiones: I) a las 24 horas después de la toma de muestra, y II) después de 2 meses de almacenamiento en condiciones similares a la de los productores (ambiente). Además, la Aw se determinó en 2 muestras de harina inmediatamente después del molido del grano, y de 10 muestras de harina después de un almacenamiento de 2 meses.

La determinación de la actividad acuosa (Aw) se realizó empleando el medidor de actividad acuosa (Hygroskop DT- Rotronic), que se basa en una medición directa de la Aw a partir de la humedad relativa del aire alrededor de la muestra cuando el aire y la muestra alcanzan el equilibrio. Por lo tanto, la muestra debe colocarse en un espacio cerrado hasta que la actividad del agua de la muestra y la humedad relativa del aire sean iguales; la medición realizada es la equivalente a la humedad relativa en equilibrio (HRE).

Figura 20. Medidor de Actividad Acuosa



Fuente: Autoras, Dalia Pérez y Ma. Elena Zárate.

3.10 Control de la temperatura ambiental

El control de la temperatura ambiental se llevó a cabo tomando la temperatura del laboratorio dos veces al día, utilizando un termómetro de mercurio y graficándola en una tabla de control.

Figura 21. Toma de la temperatura ambiente del laboratorio.

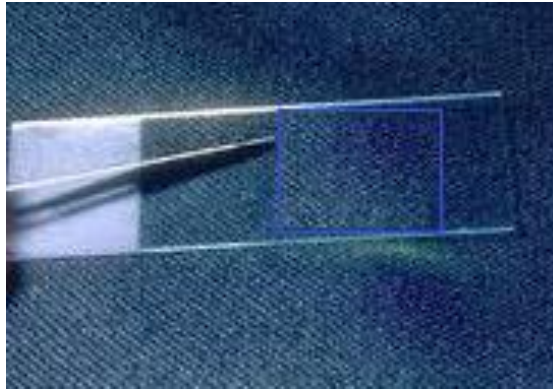


Fuente: Autoras, Dalia Pérez y Ma. Elena Zárate.

3.11 Valoración del crecimiento fúngico

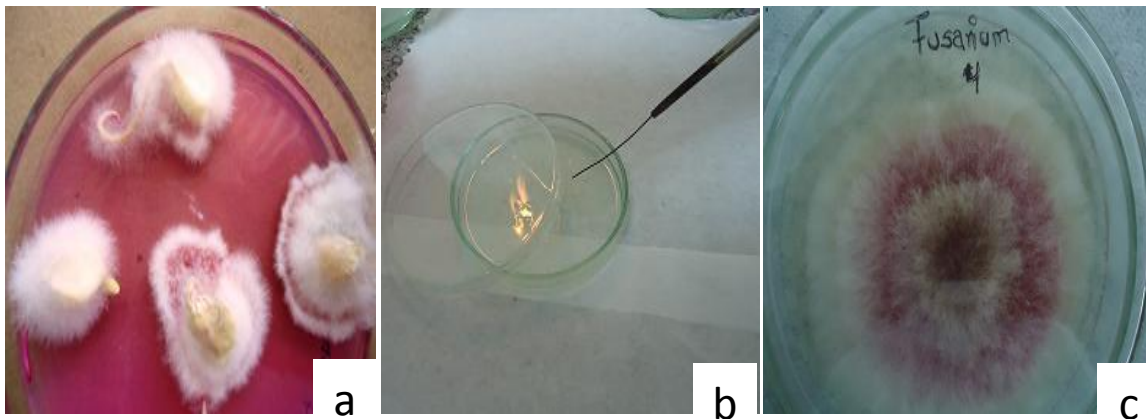
Una vez crecida la colonia en los medios respectivos, se realizaron placas para determinar el tipo de hongo con la ayuda de un asa y azul de lactofenol (Figura 22). Luego de identificar el hongo se procedió a aislar la colonia utilizando los mismos medios antes mencionados. (Figura 23)

Figura 22. Placa con azul de Lactofenol.



Fuente: Autoras, Dalia Pérez y Ma. Elena Zárate.

Figura 23 a. Colonias de *Fusarium spp.* en Agar Rosa de Bengala Diclorán (DRBC) 4 días. **b.** Aislamiento en Agar Papa Dextrosa (PDA). **c.** Colonia de *Fusarium spp.* en Agar Papa Dextrosa (PDA).



Fuente: Autoras, Dalia Pérez y Ma. Elena Zárate.



3.11.1 Azul de Lactofenol

3.11.1.1 Fundamento

El azul de lactofenol tiene tres funciones importantes a la hora de observar mohos. El fenol destruye la flora acompañante. El ácido láctico conserva las estructuras fúngicas al provocar un cambio de gradiente osmótico, generando una película por así llamarlo protectora. Además el colorante es fuertemente ácido y se usa para la tinción directa de la estructura, tomando un delicado color azul claro.

3.11.1.2 Composición

Azul de Algodón (de anilina) al 1%	0.05 g
Glicerol	40 ml
Cristales de fenol	20g
Acido láctico	20 ml
Agua destilada	20 ml (11)

3.12 Descripción de los análisis realizados

3.12.1 Determinación de la micoflora

La determinación de la micoflora de los granos secos de maíz se realizó en 2 ocasiones: I) inmediata a la recolección de la muestra y II) luego de 2 meses de almacenamiento en condiciones controladas. Al cabo de los 2 meses, también se determinó la micoflora de la harina de maíz que fue molida luego de la recolección de las muestras.

3.12.1.1 Procedimiento para los granos secos de maíz

Para determinar los hongos presentes en el grano se utilizó la técnica de siembra directa, para lo cual se requirió separar los granos sanos y seleccionarlos de forma aleatoria para la siembra. Un total de 150 granos se tomaron aleatoriamente de 10 de las 20 mazorcas recolectadas. De los 150 granos, 75 granos fueron desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 0,4% en un vaso de

precipitación estéril en donde fueron sumergidos los granos necesarios durante un minuto. Tanto para los granos desinfectados y no desinfectados se sembraron directamente (5 granos por caja Petri) en 5 placas de Agar Papa Dextrosa (PDA), 5 placas de Agar Rosa de Bengala con Diclorán (DRBC), y 5 placas de Agar Extracto de Malta (MEA). Se utilizó una pinza estéril para tomar los granos, los cuales fueron distribuidos equidistantemente en la superficie de la placa. Este proceso se realizó por duplicado pues las placas recibieron 2 tratamientos de incubación: I) durante 5 - 7 días a 18°C y II) durante 5-7 días a 25°C. (25) (Anexo3).

Figura 24. Siembra directa del grano.



Fuente: Autoras, Dalia Pérez y Ma. Elena Zárate.

3.12.1.2 Procedimiento para la harina de maíz

La determinación de los hongos presentes en la harina se realizó de acuerdo con la Norma Técnica INEN 1529-10:98 (Anexo 5) para el recuento estándar en placa por siembra en profundidad, cuyo fundamento es la determinación del número de colonias típicas que se desarrollan como unidades propagadoras, a partir de un gramo o centímetro cúbico de muestra mediante diluciones seriadas inoculadas en un medio de cultivo adecuado. Por efectos de comparación y especificidad se



reemplazó el agar-sal-levadura de Davis (recomendado en la norma INEN) por Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Rosa de Bengala con Diclorán (DRBC), y Agar Extracto de Malta (MEA), así como también la temperatura de incubación (22°C y 25°C) se reemplazó por 18°C y 25 °C. La siembra se realizó por duplicado; y tanto el muestreo como la preparación de la muestra se realizaron de acuerdo con lo estipulado por el INEN en la Norma Técnica 1529-2:99 (Anexo 6).

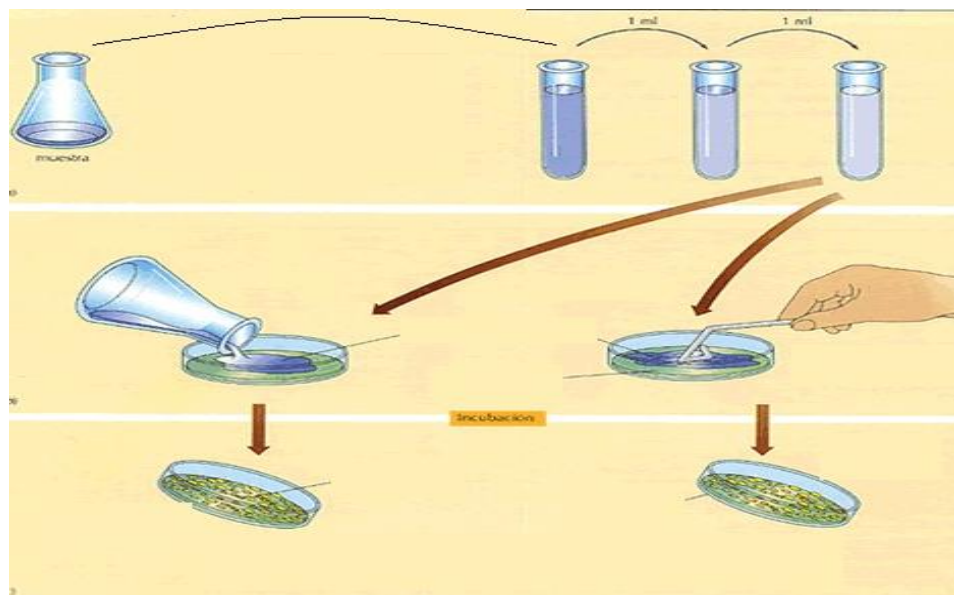
Brevemente, el recuento estándar en placa se realizó de la siguiente manera:

1. Se pesaron 10 gramos de muestra (harina) y se inocularon asépticamente en recipientes estériles que contengan 90 cm³ de agua de peptona 0,1% y se homogenizó (solución madre).
2. A partir de la solución madre y utilizando una sola pipeta estéril, se prepararon las diluciones decimales de acuerdo a la carga micológica.
3. Utilizando una pipeta estéril, se midió, por duplicado, alícuotas de 1 cm³ de cada una de las diluciones decimales en placas Petri adecuadamente identificadas. La dilución se inició por la de menor concentración.
4. Inmediatamente, se vertió en cada una de las placas inoculadas, aproximadamente 20 cm³ de Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Rosa de Bengala con Diclorán (DRBC), y Agar Extracto de Malta (MEA) fundido y templado a 45 ± 2°C. La adición del medio de cultivo no debe pasar más de 15 minutos, a partir de la preparación de la primera dilución.
5. Se mezcló delicadamente el inóculo de siembra con el medio de cultivo, imprimiendo a la placa movimientos de vaivén, 5 veces en una dirección, seguido de cinco giros en sentido de las agujas del reloj. Se volvió a imprimir movimientos de vaivén en una dirección que forme ángulo recto con la primera y se la hizo girar cinco veces en sentido contrario a las agujas de reloj.
6. Control: Se utilizó una placa para el control de la carga microbiana del ambiente, la cual no debería exceder de 15 colonias/placa tras 15 minutos de exposición. Este límite puede ser mantenido mediante prácticas

adecuadas de limpieza y desinfección. Además, como prueba de esterilidad del medio, en una placa sin inóculo se vertió aproximadamente 20 cm³ del agar y se siguió el mismo tratamiento que para las otras placas.

7. Luego de dejar las placas en reposo hasta que se solidifique el agar, las placas fueron incubadas de manera invertida a 18°C y 25°C, por cinco días.
8. Las placas fueron examinadas a los dos días de incubación y se comprobó la formación del micelio aéreo, que tiene un aspecto algodonoso característico para el caso de las colonias de mohos.
9. A los cinco días, se seleccionaron las placas que presentaban entre 10 y 150 colonias y se realizó el conteo. (26)

Figura 25. Siembra en placa por profundidad



Fuente: *Siembra en Placa por Profundidad*. Piña López, Carmen. Universidad Nacional Abierta y a Distancia de Colombia. Departamento de microbiología. Bogotá, Colombia, 2010.

3.13 Identificación del tipo de hongo.

Los cultivos se revisaron todos los días a partir de la fecha de siembra, a medida que se detectaba la presencia de una colonia proveniente del grano se procedía a



aislarla en un tubo y en caja petri que contenga medio de cultivo apto para su desarrollo e identificación.

Las colonias se identificaron por medio de análisis macro y microscópico. El análisis macroscópico comprende una revisión del aspecto, color de las colonias (anverso - reverso), y el análisis microscópico comprende una revisión de las estructuras características de cada especie.

3.13.1 *Aspergillus*

3.13.1.1 Análisis macroscópico

Las colonias aisladas del género *Aspergillus* fueron identificadas de acuerdo a su color, los mismos que variaron desde tonos blanco, verde, café, pardo, amarillo, como era de esperarse hubo difusión del pigmento al medio de cultivo dando como resultado la coloración del reverso de la colonia que varió desde tonos blanco amarillento, marrón rojizo, verde. La superficie de las colonias identificadas fue aterciopelada, granulosa y pulverulenta.

En el análisis macroscópico de este género la identificación se basó principalmente en el aspecto y la pigmentación de la colonia.

3.13.1.2 Análisis microscópico

Las placas se tiñeron con Azul de Lactofenol. Se identificaron microscópicamente estructuras típicas del género como conidióforos hialinos y sin tabiques, cabezas conidiales con forma globosa en las que se disponían hileras de fiálides en forma de botella, por otra parte se observó conidios en forma radiada.

3.13.2 *Penicillium*

3.13.2.1 Análisis macroscópico

Las colonias de este género se caracterizaron por su crecimiento rápido y aspecto granuloso o pulverulento, durante los primeros días las colonias fueron blanquecinas y después verde-amarillento o verde oscuro, algunas colonias fueron verdes azuladas con bordes blanquecinos, el reverso varió desde tonos que fueron desde amarillo al marrón.



3.13.2.2 Análisis microscópico

Al estudio microscópico se observó estructuras ramificadas semejantes a un pincel o florero. Se identificó ramificaciones del tipo monovérticiladas y polivérticiladas. Se observaron conidios esféricos, elipsoidales y unicelulares, hialinos que en masa dan el color característico de las colonias.

3.13.3 *Fusarium*

3.13.3.1 Análisis macroscópico

Se observó un crecimiento moderado a profuso, así como también la difusión de pigmento al medio de cultivo que va desde rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura o pardo en especial en el reverso de la colonia, el mismo que puede variar con el pH. Se observó micelio disperso, denso, algodonoso, limoso. Además se observó que algunas especies presentaron zonas concéntricas de distinta morfología macroscópica debido a la secuencia luz - oscuridad.

3.13.3.2 Análisis microscópico

Se pudo observar macroconidios que son curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda, en cuanto a los microconidios se presentaron de forma elipsoidal, fusiforme, claviforme, piriformes o subglobosos. Tanto los macroconidios como los microconidios se visualizaron dispersos en el micelio aéreo o en esporodoquios.

3.13.4 *Rhizopus*

3.13.4.1 Análisis macroscópico

Se visualizaron colonias de crecimiento rápido, algodonosa con denso micelio aéreo, al principio de coloración blanca y luego grisácea o amarillenta (micelio rojizo, grisáceo), de aspecto consistente, que cubren la superficie del agar al tercer día de incubación a 25 °C.

3.13.4.2 Análisis microscópico

Al microscopio se observó estolones y rizoides muy pigmentados y otros hialinos, presentó esporangióforos aislados o en grupo de color pardo oscuro que nacen



directamente de los nudos y están en la parte opuesta a los rizoides bien desarrollados. Los esporangios esféricos de color negro con columela y esporangiosporas de color negro.

3.14 Análisis estadístico

Se realizaron análisis descriptivos para proveer la información general de los resultados obtenidos. Las diferencias entre los factores de crecimiento con el género y número de colonias se utilizó la prueba de χ^2 para las variables categóricas y la prueba T (bilateral o de 2 colas) para las variables continuas. Todos los factores evaluados fueron incluidos en los modelos de regresión lineal y logística, tomando como variable de respuesta I) el número de colonias crecidas, y II) el crecimiento o no de un género determinado, respectivamente. Los análisis se iniciaron con un modelo de regresión que contenía todas las variables independientes del que se eliminaron, uno por uno, aquellos factores que no fueron significativos. El nivel de significancia establecido fue $P < 0.05$ para todos los análisis.

Para el ingreso de los datos se utilizó el programa EpiData 3.1 (EpiData Association, Odense, Denmark). El análisis de los datos se realizó en el programa Stata 10.0 (Stata Corporation, College Station, TX).

A black and white photograph of a petri dish containing several circular agar plates. Each plate shows a different stage of fungal growth, with some appearing as dense, fuzzy mats and others as more structured, ring-like or radial patterns. The text is overlaid on the center of the image.

Capítulo IV

**Resultados
y discusión**

CAPITULO 4

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Flora micológica del maíz en grano

Para caracterizar la flora micológica en los granos de maíz se utilizó la técnica de siembra directa en un total de 1.200 cultivos, distribuidos en los distintos tratamientos y niveles del diseño experimental: I) 18°C vs 25°C, II) con y sin almacenamiento y III) con y sin desinfección del grano. Para el análisis diferencial de la micoflora, los cultivos se realizaron en tres medios diferentes (PDA, DRBC, MEA) (Tabla 3).

Tabla 3. Cuadro resumen de las 400 siembras realizadas en cada uno de los medios de cultivo.

Temperatura 18°C			
	Almacenamiento		Total
Desinfección	Con	Sin	
Con	50	50	100
Sin	50	50	100
Total	100	100	200
Temperatura 25°C			
	Almacenamiento		Total
Desinfección	Con	Sin	
Con	50	50	100
Sin	50	50	100
Total	100	100	200

De forma general, las colonias identificadas pertenecieron al género *Penicillium* en mayor proporción, seguido de *Fusarium*, *Rhizopus* y *Aspergillus* (Tabla 4).

Tabla 4. Géneros de micoflora identificada a nivel global, expresado en porcentaje (%)

Tipo de hongo	Frecuencia (%)
<i>Penicillium</i>	53%
<i>Fusarium</i>	26%
<i>Rhizopus</i>	14%
<i>Aspergillus</i>	2%

4.1.1 Flora micológica diferencial por productor

Los resultados obtenidos del crecimiento de colonias según el género y productor se presentan en la Tabla 5.

Según la procedencia de la muestra, se encontró que aquellas que provinieron del productor N°2 presentaron un mayor grado de contaminación (*Fusarium* 40%, *Penicillium* 70% y *Rhizopus* 14%), y presentó las siguientes prácticas agrícolas: ningún tipo de pesticida, abono de cuy, las mazorcas se cosecharon a los 300 días de cultivo para después ser secados directo al sol en mazorcas sobre esteras; su almacenamiento posterior se hizo en sacos durante 2 meses, consideran además que los granos visualmente podridos están dañados y cuando esto sucede los granos son utilizados como alimento animal. El productor N° 9 presentó el menor grado de contaminación (*Fusarium* 2%, *Penicillium* 55% y *Rhizopus* 8%) y cuyas prácticas agrícolas difirieron con el productor de mayor contaminación en que el secado después de la cosecha fue directo al sol sobre esteras pero en maíz desgranado, y que cuando los granos están dañados se utilizan como abono.

Tabla 5. Géneros de micoflora identificada según el productor, expresado en porcentaje (%).

Productor	Frecuencia de crecimiento (%)			
	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Aspergillus</i>
1	65%	33%	5%	0%
2	40%	70%	14%	0%
3	38%	63%	20%	0%
4	40%	55%	11%	0%
5	21%	53%	12%	18%
6	10%	57%	17%	0%
7	26%	47%	33%	0%
8	13%	43%	15%	0%
9	2%	55%	8%	0%
10	4%	53%	10%	0%

4.1.2 Flora micológica diferencial por número de colonias crecidas

Los resultados obtenidos del crecimiento de colonias según el número de colonias crecidas se presentan en la Tabla 6. Cada cultivo constaba de 5 granos sembrados, así que al reportar el número de colonias crecidas (equivalente al número de granos contaminados por cultivo) se observó que el género *Penicillium* fue aquel con mayor prevalencia de crecimiento (24% en los 5 granos sembrados), y el género *Aspergillus* fue aquel con la menor prevalencia (98% sin crecimiento).

Tabla 6. Géneros de micoflora identificada según el número de colonias por cultivo, expresado en porcentaje (%).

N° Colonias	Frecuencia de crecimiento (%)			
	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Aspergillus</i>
sin crecimiento	74%	48%	86%	98%
1	13%	11%	4%	1%
2	5%	7%	1%	1%
3	2%	5%	1%	0%
4	2%	5%	1%	0%
5	4%	24%	7%	0%

4.1.3 Flora micológica diferencial por medio de cultivo

En la tabla 7 se presentan los géneros de las colonias identificadas que crecieron en cada uno de los tres medios de cultivo empleados: PDA, DRBC y MEA. Tanto para el crecimiento del género *Fusarium* como *Aspergillus*, no se encontraron diferencias significativas entre los 3 medios de cultivo, por lo que se podría utilizar cualquiera de estos para el crecimiento y asilamiento de los mencionados géneros. Sin embargo, se debe mencionar que el uso del medio DRBC facilita el análisis macroscópico de las colonias de *Fusarium*, ya que disminuye la dispersión de las colonias, evitando el solapamiento de colonias de lento crecimiento con las que crecen más rápidamente, además el Rosa de Bengala es absorbido por las colonias facilitando así su reconocimiento y enumeración. (22) Tanto para las colonias de *Penicillium* como de *Rhizopus*, se observó una diferencia significativa en el crecimiento según el medio de cultivo.

Tabla 7. Géneros de micoflora identificada según el medio de cultivo utilizado, expresado en porcentaje (%).

Tipo de hongo	% de crecimiento según Medio de cultivo			Valor P
	MEA (Agar Extracto de Malta)	PDA (Agar Papa Dextrosa)	DRBC (Agar Rosa de Bengala Diclorán)	
<i>Fusarium</i>	29%	35%	36%	0.156
<i>Penicillium</i>	31%	36%	33%	0.038
<i>Rhizopus</i>	39%	45%	16%	<0.001
<i>Aspergillus</i>	14%	45%	41%	0.137

Al considerar el número de colonias crecidas en los granos sembrados, se observó que el crecimiento de colonias de *Penicillium* y *Rhizopus* estuvo más favorecido al utilizar el medio PDA (Tabla 8)

Tabla 8. Géneros de micoflora identificada según el número de colonias y medio de cultivo utilizado, expresado en porcentaje (%).

Nº Colonias	% de crecimiento según Medio de cultivo					
	<i>Penicillium</i>			<i>Rhizopus</i>		
	MEA	PDA	DRBC	MEA	PDA	DRBC
sin crecimiento	36%	30%	33%	33%	31%	36%
1	39%	27%	34%	42%	44%	15%
2	33%	31%	36%	31%	31%	38%
3	48%	30%	22%	29%	43%	29%

4	22%	38%	40%	79%	14%	7%
5	24%	43%	33%	31%	55%	14%

4.2. Influencia de diversos factores en el crecimiento micológico del maíz en grano

4.2.1 Influencia de la actividad de agua

La medición de la actividad acuosa de los granos se realizó antes de la primera y segunda siembra de los granos (Tabla 9), y se encontró una diferencia significativa entre los valores de actividad acuosa de los granos sin y con almacenamiento controlado ($P < 0.001$).

La influencia de la actividad acuosa en el crecimiento de la micoflora diferenciada fue evaluada mediante la prueba de χ^2 , encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre el crecimiento de colonias de *Fusarium* ($P < 0.001$), *Penicillium* ($P < 0.001$), *Aspergillus* ($P < 0.001$) y *Rhizopus* ($P < 0.001$) con respecto a diferentes valores de actividad acuosa del grano sembrado (Tabla 10). Además es necesario notar que no se observó una marcada relación directamente proporcional entre el crecimiento de colonias y el valor de actividad de agua; y solamente para el caso de *Fusarium* se observó un mayor crecimiento de colonias a mayor actividad de agua ($A_w > 0.7$).

Tabla 9. Valores de la actividad acuosa (A_w) en el maíz en grano de las muestras recién recolectadas (primera medición) y después de 2 meses de almacenamiento controlado (segunda medición).

MEDICION DE LA ACTIVIDAD ACUOSA (A_w)			
N° de Productor	Tipo de muestra	A_w (primera medición)	A_w (segunda medición)
1	Grano	0.701	0.542
2	Grano	0.714	0.551
3	Grano	0.761	0.604
4	Grano	0.725	0.567
5	Grano	0.561	0.548
6	Grano	0.576	0.544
7	Grano	0.591	0.553
8	Grano	0.592	0.542
9	Grano	0.549	0.541
10	Grano	0.541	0.539
	\bar{X}	0,631	0,553
	δ	0,796	0,186

Tabla 10. Influencia de la A_w en el crecimiento de la micoflora diferenciada en maíz en grano.

	Actividad Acuosa					Prueba de χ^2
	0.50-0.55	0.56-0.6	0.6-0.65	0.65-0.7	0.70-0.77	
<i>Fusarium</i>	15%	28%	5%	-	52%	$P < 0.001$
<i>Penicillium</i>	34%	35 %	5%	-	25%	$P < 0.001$
<i>Rhizopus</i>	25 %	48%	8%	-	20%	$P < 0.001$
<i>Aspergillus</i>	23%	77%	-	-	-	$P < 0.001$



4.2.2 Influencia del almacenamiento

Otro de los tratamientos experimentales en los granos de maíz fue el tiempo de almacenamiento: luego de la cosecha y después de un periodo de almacenamiento controlado de 60 días de la toma de muestra.

La influencia del almacenamiento en el crecimiento de la micoflora diferenciada fue evaluada mediante la prueba de χ^2 , encontrándose una diferencia estadísticamente significativa entre el crecimiento de colonias de *Fusarium* ($P<0.001$), *Penicillium* ($P<0.001$), *Aspergillus* ($P=0.010$) y *Rhizopus* ($P=0.048$) con respecto al almacenamiento (Tabla 11). Según estos resultados, se observó que el crecimiento de colonias de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Aspergillus* disminuyó con el almacenamiento controlado (condiciones secas y a temperatura ambiente (18°C) en sacos abiertos), lo cual se debe al decremento del valor de la actividad acuosa.

Se analizó además la relación del almacenamiento con el crecimiento micológico por número de colonias (0 a 5 granos) por medio de la prueba T, encontrándose una relación significativa para los géneros *Fusarium* ($P<0.001$), *Penicillium* ($P<0.001$), *Aspergillus* ($P=0.003$), lo cual ratifica los resultados encontrados mediante la prueba de χ^2 . Para el caso de crecimiento de *Rhizopus*, no se observó una relación significativa ($P=0.074$), es decir que su crecimiento es independiente del almacenamiento. A su vez, este resultado no difiere del encontrado mediante la prueba de χ^2 pues el valor de P correspondiente fue muy cercano a $P=0.05$ (nivel de significancia pre-establecido).

Tabla 11. Influencia del almacenamiento controlado en el crecimiento de la micoflora diferenciada en maíz en grano.

	% de crecimiento micológico		Prueba de χ^2
	Sin almacenamiento	Con almacenamiento	
<i>Fusarium</i>	73%	27%	$P<0.001$
<i>Penicillium</i>	58%	42%	$P<0.001$
<i>Rhizopus</i>	57%	43%	$P=0.048$
<i>Aspergillus</i>	77%	23%	$P=0.010$

4.2.3 Influencia de la desinfección del grano previo al cultivo

Según la literatura, la siembra de los granos del maíz es posible realizarla con o sin desinfección. (25) Por lo tanto se decidió a priori comparar la influencia de la desinfección del grano en el crecimiento micológico. La influencia de la desinfección del grano en el crecimiento de la micoflora diferenciada fue evaluada mediante la prueba de χ^2 , encontrándose una diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de colonias de *Penicillium* ($P<0.001$), *Aspergillus* ($P=0.010$) y *Rhizopus* ($P<0.001$) con respecto a la desinfección del grano previo al cultivo (Tabla 12), siendo mayor el crecimiento micológico cuando se utilizan granos sin desinfectar, por tanto es conveniente realizar la siembra sin desinfección para que el correspondiente crecimiento refleje la flora total acompañante del grano. Sin embargo, para el género *Fusarium* se observó que su crecimiento es independiente de la desinfección.

Tabla 12. Influencia de la desinfección del grano previo al cultivo en el crecimiento de la micoflora diferenciada en maíz en grano.

	% de crecimiento micológico		Prueba de χ^2
	Siembra con granos sin desinfectar	Siembra con granos desinfectados	
<i>Fusarium</i>	49%	51%	$P=0.598$
<i>Penicillium</i>	80%	20%	$P<0.001$
<i>Rhizopus</i>	92%	8%	$P<0.001$
<i>Aspergillus</i>	77%	23%	$P=0.010$

4.2.4 Influencia de la temperatura

Para el análisis de las muestras se sometió a los cultivos a 2 tratamientos térmicos de incubación (18°C vs 25°C), con el fin de simular posibles condiciones ambientales para el crecimiento de flora micológica *in-vivo* (temperatura ambiente y temperatura subtropical, respectivamente).

La influencia de la temperatura de cultivo en el crecimiento de la micoflora diferenciada fue evaluada mediante la prueba de χ^2 , encontrándose una relación estadísticamente significativa entre el crecimiento de colonias de *Fusarium* ($P<0.001$), *Penicillium* ($P=0.021$) y *Rhizopus* ($P<0.001$) y la temperatura de incubación a la que se sometieron los cultivos (18°C vs 25°C) (Tabla 13). Para el caso del género *Aspergillus* no se observó una diferencia significativa ya que hubo un mismo número de colonias a ambas temperaturas, asimismo la prevalencia de crecimiento de este género fue muy bajo por lo que no se puede establecer una diferencia. Para los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizopus*, el crecimiento fue mejor a 25°C, lo que está de acuerdo con las temperaturas óptimas de crecimiento, las cuales oscilan entre 25 °C - 26°C. (14)

Tabla 13. Influencia de la temperatura en el crecimiento de la micoflora diferenciada en maíz en grano

Tipo de hongo	% de crecimiento según el efecto de la temperatura		Prueba de χ^2
	18 °C	25°C	
<i>Fusarium</i>	36%	64%	$P < 0.001$
<i>Penicillium</i>	47%	53%	$P = 0.021$
<i>Rhizopus</i>	30%	70%	$P < 0.001$
<i>Aspergillus</i>	50%	50%	$P = 1$

4.2.5 Efecto conjunto de la temperatura, almacenamiento controlado y actividad acuosa en el crecimiento de la micoflora en el maíz en grano.

Para evaluar como el grado de crecimiento micológico (número de colonias) está influenciado por los factores estudiados (temperatura, almacenamiento controlado y actividad acuosa) se utilizaron modelos de regresión lineal (Tabla 14) para cada uno de los géneros identificados, independiente del tipo de medio de cultivo, y omitiendo del modelo de regresión final aquellos factores que resultaron estadísticamente no significativos en el modelo conjunto.

Tabla 14. Modelo de regresión lineal de los factores que afectan el crecimiento micológico en el maíz en grano.

	Coeficiente	95% IC*	Valor P
<i>FUSARIUM</i>			
Temperatura**	-	-	-
Almacenamiento**	-	-	-
Actividad acuosa	2.93	1.599; 4.264	0.011
<i>PENICILLIUM</i>			
Temperatura**	-	-	-

Almacenamiento	-0.17	-0.267; -0.073	0.017
Actividad acuosa**	-	-	-
RHIZOPUS			
Temperatura	0.016	0.009; 0.023	0.009
Almacenamiento**	-	-	-
Actividad acuosa**	-	-	-
ASPERGILLUS			
Temperatura**	-	-	-
Almacenamiento**	-	-	-
Actividad acuosa**	-	-	-

*Intervalo de confianza

**Omitido del modelo por no ser estadísticamente significativo ($P > 0.05$)

Los resultados obtenidos en los modelos de regresión lineal indicaron que:

- Por cada incremento en unidad de actividad de agua, el grado de crecimiento de *Fusarium* incrementará en 2.93 UPC.
- Si el almacenamiento posterior al secado se da en condiciones controladas, el grado de crecimiento de *Penicillium* disminuirá en 0.17 UPC.
- Si la temperatura de crecimiento es de 25°C, el grado de crecimiento de *Rhizopus* incrementará en 0.016 UPC.
- La baja prevalencia en el crecimiento de *Aspergillus* no permitió encontrar asociaciones estadísticamente significativas.

Para evaluar como afectarían los factores estudiados (temperatura, almacenamiento controlado y actividad acuosa) en el crecimiento o no de flora micológica se utilizaron modelos de regresión logística (Tabla 15) para cada uno de los géneros identificados, independiente del tipo de medio de cultivo, y omitiendo del modelo de regresión final aquellos factores que resultaron

estadísticamente no significativos. Además en este modelo se incluyó como variable independiente a uno de los parámetros de las prácticas agrícolas relacionada con el almacenamiento del maíz en grano previo al muestreo.

Tabla 15. Modelo de regresión logística de los factores que afectan el crecimiento micológico en el maíz en grano

	Odds ratio (OR)	95% IC*	Valor P
<i>FUSARIUM</i>			
Temperatura	1.15	1.099; 1.201	<0.001
Almacenamiento**	-	-	-
Actividad acuosa	2.99×10^6	0.11×10^6 ; 0.84×10^6	<0.001
Periodo de almacenamiento postcosecha (2 vs 3 meses) **	-	-	-
<i>PENICILLIUM</i>			
Temperatura	1.04	1.015; 1.066	0.002
Almacenamiento	0.66	0.605; 0.725	<0.001
Actividad acuosa	40.8	7.766, 214.4	<0.001
Periodo de almacenamiento postcosecha (2 vs 3 meses)	1.38	1.107; 1.719	0.004
<i>RHIZOPUS</i>			
Temperatura	1.15	1.082, 1.219	<0.001
Almacenamiento**	-	-	-
Actividad acuosa**	-	-	-
Periodo de almacenamiento postcosecha (2 vs 3 meses) **	-	-	-
<i>ASPERGILLUS</i>			
Temperatura**	-	-	-
Almacenamiento	0.063	0.021, 0.192	<0.001
Actividad acuosa	3.53×10^{-22}	9.2×10^{-24} ; 1.4×10^{-20}	<0.001

Periodo de almacenamiento postcosecha (2 vs 3 meses) **	-	-	-
--	---	---	---

*Intervalo de confianza

**Omitido del modelo por no ser estadísticamente significativo ($P > 0.05$)

Los resultados obtenidos en los modelos de regresión logística indicaron que:

- *Fusarium*: A mayor temperatura (25°C), hay más riesgo de crecimiento ($\text{OR}=1.15$); y cuando aumente el valor de la A_w en una unidad, se potenciará considerablemente el riesgo de crecimiento ($\text{OR}=2.99 \times 10^6$).
- *Penicillium*: A mayor temperatura (25°C), hay más riesgo de crecimiento ($\text{OR}=1.04$); el almacenamiento controlado (que equivale a una reducción considerable de actividad acuosa) es un factor protector en contra del crecimiento ($\text{OR}=0.66$); cuando aumenta el valor de la A_w en una unidad, se potenciará el riesgo de crecimiento ($\text{OR}=40.8$), y a mayor tiempo de almacenamiento post-cosecha (3 meses) el riesgo de crecimiento es mayor ($\text{OR}=1.38$). Esta última asociación es una clara indicación de la diferencia entre el almacenamiento controlado (condiciones experimentales de este trabajo) y el almacenamiento real que se da por parte de los productores de maíz.
- *Rhizopus*: A mayor temperatura (25°C), hay más riesgo de crecimiento ($\text{OR}=1.15$).
- *Aspergillus*: El almacenamiento controlado es un factor considerablemente protector en contra del crecimiento ($\text{OR}=0.063$), y cuando aumenta el valor de la A_w en una unidad, disminuirá el riesgo de crecimiento ($\text{OR}=3.53 \times 10^{-22}$). Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos para el género *Aspergillus* pueden ser fruto de la casualidad considerando la muy baja prevalencia de crecimiento que no permite inferir de una manera precisa las asociaciones con los factores estudiados.

4.3 Flora micológica de la harina de maíz

4.3.1 Recuento estándar en placa y flora micológica diferencial.

Para caracterizar la flora micológica en la harina de maíz se utilizó la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad para un total de 360 cultivos, distribuidos según el diseño experimental (18°C vs 25°C). Para el análisis diferencial de la micoflora, los cultivos se realizaron en tres medios diferentes (MEA, PDA, DRBC).

Los resultados obtenidos del crecimiento de colonias se expresaron en número de unidades propagadoras de colonias (UPC) de mohos y/o levaduras/ g. (Tabla 16) En general, las colonias identificadas pertenecieron al género *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus* y levaduras, independientemente del medio de cultivo. Sin embargo el género que predominó fue *Penicillium* (97%) seguido de levaduras.

Tabla 16. Recuento estándar en placa de la harina de maíz, sembrados en MEA, PDA y DRBC, a diferentes temperaturas de incubación (18°C vs. 25°C).

MEA		
PRODUCTOR	Temperatura	
	18°C	25°C
1	35 UPC/g	10 UPC/g
2	135 UPC/g	105 UPC/g
3	29000 UPC/g	27000 UPC/g
4	500 UPC/g	1441 UPC/g
5	3600 UPC/g	3800 UPC/g
6	664 UPC/g	1150 UPC/g
7	6400 UPC/g	6100 UPC/g
8	125 UPC/g	190 UPC/g
9	1000 UPC/g	940 UPC/g
10	905 UPC/g	1241 UPC/g

PDA		
PRODUCTOR	18°C	25°C
1	33 UPC/g	10 UPC/g
2	335 UPC/g	427 UPC/g
3	35000 UPC/g	32000 UPC/g
4	436 UPC/g	586 UPC/g
5	6900 UPC/g	7000 UPC/g
6	1082 UPC/g	1059 UPC/g
7	5000 UPC/g	6400 UPC/g
8	190 UPC/g	285 UPC/g
9	1100 UPC/g	990 UPC/g
10	950 UPC/g	1723 UPC/g
DRBC		
PRODUCTOR	18°C	25°C
1	34 UPC/g	13 UPC/g
2	430 UPC/g	370 UPC/g
3	30000 UPC/g	39000 UPC/g
4	505 UPC/g	918 UPC/g
5	4100 UPC/g	4200 UPC/g
6	927 UPC/g	1373 UPC/g
7	5500 UPC/g	4900 UPC/g
8	130 UPC/g	210 UPC/g
9	850 UPC/g	960 UPC/g
10	1036 UPC/g	1764 UPC/g

4.3.1.1 Diferencias entre productores

Según la procedencia de la muestra, se observó que aquellas provenientes del productor N°3 mostraron un mayor grado de contaminación. Además este productor presentó las siguientes prácticas agrícolas: ningún tipo de pesticida, ningún fertilizante, los granos se cosecharon a los 300 días de cultivo para

después ser secados bajo techo, en maíz desgranado sobre esteras; su almacenamiento posterior se hizo en tanques plásticos durante 2 meses, considera además que el grano visualmente podrido está dañado; y cuando esto sucede los granos son utilizados como alimento animal. El productor N° 1 presentó el menor grado de contaminación y cuyas prácticas agrícolas difirieron con el productor de mayor contaminación en que el fertilizante utilizado fue el abono de chanco, el secado después de la cosecha fue directo al sol sobre esteras pero en mazorcas y su almacenamiento posterior en sacos. (Tabla 16).

4.3.1.2 Flora micológica diferencial por medio de cultivo

Los resultados obtenidos demostraron la presencia de los géneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus* y Levaduras en los tres medios de cultivo (MEA, PDA, DRBC). La influencia del medio de cultivo en el crecimiento de la micoflora diferenciada fue evaluada mediante la prueba de χ^2 , no se encontraron diferencias significativas ($P= 0,509$), por lo que se podría utilizar cualquiera de estos para el crecimiento y asilamiento de los mencionados géneros.

La recurrente presencia de Levaduras puede deberse a la contaminación por la manipulación de la materia prima por parte de los productores (desgranado de maíz) y durante el proceso de elaboración de la harina (contacto con los molinos).

4.3.2 Influencia de la actividad de agua

La medición de la actividad acuosa de la harina se realizó después de los 2 meses de su almacenamiento (Tabla 17). La influencia de la actividad acuosa en el crecimiento de la micoflora diferenciada fue evaluada mediante la prueba de χ^2 , encontrándose una diferencia estadísticamente significativa ($P=0.014$)

Tabla 17. Valores de la actividad acuosa (A_w) en la harina de maíz después de 2 meses de almacenamiento controlado

MEDICION DE LA ACTIVIDAD ACUOSA (A_w)	
N° de Productor	A_w

1	0.473
2	0.498
3	0.546
4	0.51
5	0.542
6	0.53
7	0.542
8	0.481
9	0.533
10	0.536
χ	0.519
δ	0.003

Los valores medios de la actividad acuosa del grano y su harina fueron comparados y se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,001$), siendo mayor la actividad acuosa en los granos. Esto puede deberse a que la harina tuvo una mayor superficie de contacto que le permitió reducir su actividad acuosa más eficientemente durante el periodo de almacenamiento controlado.

4.3.3 Efecto de la temperatura

Para el análisis de las muestras se sometió a los cultivos a 2 tratamientos térmicos de incubación (18°C vs 25°C), con el fin de simular posibles condiciones ambientales para el crecimiento de flora micológica.

La influencia de la temperatura de incubación en el crecimiento de la micoflora diferenciada fue evaluada mediante la prueba de χ^2 . No se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($P = 0.9$) entre las 2 temperaturas de incubación por lo que se podría utilizar cualquiera de éstas para el crecimiento y aislamiento de dichos géneros.

4.4 Efecto conjunto de la temperatura y actividad acuosa en el crecimiento de la micoflora en la harina de maíz.

Para evaluar como el grado de crecimiento micológico estuvo influenciado por los factores estudiados (temperatura y actividad acuosa) se utilizó un modelo de regresión lineal ajustado al tipo de medio de cultivo y finalmente se omitieron aquellos factores que resultaron estadísticamente no significativos en el modelo conjunto (Tabla 18).

Tabla 18. Modelo de regresión lineal de los factores que afectan el crecimiento micológico de la harina de maíz

	Coefficiente	95% IC*	Valor P
<i>FUSARIUM</i>			
Temperatura**	-	-	-
Actividad acuosa	174.494,2	1.31349,4 ; 217.639,1	0.003

*Intervalo de confianza

**Omitido del modelo por no ser estadísticamente significativo ($P > 0.05$)

Los resultados obtenidos en los modelos de regresión lineal indicaron que:

- El crecimiento de la micoflora en la harina es directamente proporcional al valor de la actividad acuosa, de manera que por cada incremento en unidad de actividad de agua, el grado de crecimiento de *Fusarium* incrementará en 174.494,2 UPC.

4.5 Prácticas agrícolas

Para describir las prácticas agrícolas comunes referentes al maíz en la parroquia de san Juan – Cantón Gualaceo se realizaron encuestas a un grupo de 30 productores de la zona. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 19.

Tabla 19. Principales prácticas agrícolas referentes al maíz en la parroquia de San Juan – Cantón Gualaceo, expresado en porcentaje (%).

Prácticas agrícolas	Frecuencia
Tipo de pesticida	
Ninguno	100 %
Época de Siembra	
Octubre	100 %
Tipo de Riego	
Agua de lluvia	100 %
Época de cosecha	
Agosto	90%
Julio	10%
Estado del grano para considerarlo dañado	
Granos rotos	7%
Granos podridos	83%
Presencia de insectos	10%
Manejo del grano dañado	
Alimento de animales	67%
Se desecha	17%
Abono	13%
Se muele	3%
Días para la cosecha	
270	10%
300	90%
Fertilización	
Ninguno	20%
Abono – cuy	30%

Abono – chanco	27%
Abono – pollo	20%
Úrea	3%
Secado	
Desgranado, esteras bajo techo	20%
Mazorca, esteras bajo techo	23%
Desgranado, esteras directo al sol	23%
Mazorca, esteras directo al sol	34%
Empaque para almacenamiento	
Tanques plásticos	20%
Sacos	40%
Esteras	40%
Tiempo de almacenamiento	
2 meses	87%
3 meses	13%

El 90% de los productores suelen cosechar el grano principalmente a los 300 días a partir de su siembra, generalmente durante el mes de Agosto caracterizado por sequía, hecho que aprovechan para su secado. En cuanto al secado, el 34% afirmó que lo hace en mazorcas sobre esteras directo al sol, para su posterior almacenamiento el 40% lo realiza en sacos o esteras y el 87% durante 2 meses antes de su consumo. Cabe indicar que los pequeños agricultores son especialmente susceptibles a las pérdidas de grano a causa de hongos puesto que sus métodos de secado tradicionales frecuentemente son inadecuados.

Además, el 83% de los agricultores encuestados consideró que el grano esta en mal estado cuando se observan podridos, así mismo el 67% suele destinarlos como alimento para animales, sin darse cuenta de los efectos dañinos que pueden ocasionar a lo largo de la cadena alimentaria.

A black and white micrograph of a cell, likely a yeast or similar microorganism. The cell is roughly circular and contains a large, dark, textured nucleus. The cytoplasm is filled with numerous small, dark, granular particles. The cell is surrounded by a field of similar, smaller cells, some of which are in focus and others are blurred in the background.

Capítulo V

Conclusiones y Recomendaciones

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

El objetivo fundamental de este trabajo fue determinar la flora micológica del maíz seco y su harina producidos en la parroquia San Juan - Cantón Gualaceo y conocer cómo factores como la temperatura, actividad acuosa y el almacenamiento influyen en el crecimiento de dicha micoflora con el fin de contribuir al establecimiento de mejores prácticas agrícolas locales.

Como resultados de esta investigación se encontró que la flora micológica del grano seco perteneció a los géneros *Penicillium* en mayor proporción, seguido de *Fusarium*, *Rhizopus* y *Aspergillus*. En la harina se identificó flora de los géneros *Penicillium* (mayor proporción), *Fusarium*, *Rhizopus* y levaduras, siendo éste último un posible efecto de la manipulación de los granos para la producción artesanal de la harina.

La mejor temperatura para el crecimiento de la micoflora en el maíz en grano para *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Aspergillus* fue a 25°C mientras que para la harina, la temperatura no fue un parámetro determinante para el crecimiento de la micoflora.

La actividad acuosa influyó de manera significativa en el crecimiento de cada uno de los géneros, tanto en el maíz en grano como en la harina.

El almacenamiento controlado influyó positivamente en la disminución de la micoflora en el maíz en grano. Además el almacenamiento controlado del maíz en forma de harina presentó menor crecimiento de flora micológica, lo que puede deberse a la mayor superficie de contacto o al menor tamaño de partícula que permitió una disminución de la actividad acuosa más efectiva.



El crecimiento micológico en el grano de maíz varía dependiendo del medio y del tipo de género. El PDA resultó el más óptimo para *Penicillium* y *Rhizopus*. Para los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* no se encontraron diferencias significativas entre los 3 medios de cultivo utilizados; sin embargo el medio DRBC tiene la ventaja de facilitar el análisis macroscópico de las colonias de *Fusarium*. Por otra parte el MEA es un medio que no muestra ninguna ventaja para el crecimiento de cada uno de los géneros. En el caso de la harina no se encontraron diferencias significativas, por lo que se podría utilizar cualquiera de estos para el crecimiento y aislamiento de los mencionados géneros.

Finalmente, se evaluó la influencia de sembrar los granos de maíz en los medios de cultivo con o sin previa desinfección de los granos. El crecimiento micológico fue significativamente mayor cuando se utilizaron granos sin desinfectar, lo cual refleja más fielmente la flora total acompañante del grano. Sin embargo, para el género *Fusarium*, el crecimiento fue independiente de la desinfección.



RECOMENDACIONES

En zonas similares de temperatura, clima y altitud al lugar donde se realizó la presente investigación se recomienda lo siguiente:

- Las mazorcas deben ser secadas al sol sobre lonas, o sobre tendales, volteándolos periódicamente para que el secado sea uniforme y adquiera una humedad del 12%.
- Realizar un almacenado correcto (controlado), cuando el grano alcance una humedad inferior al 12%; en lugares frescos (10-12°C) y secos, libres de humedad e insectos. Para ello los programas de mejoramiento de cultivos (asistencia técnica) deben poner prioridad en la provisión de almacenamiento seguro para cada uno de los agricultores con la finalidad de obtener aumentos en producción.
- En cuanto a los medios de cultivo utilizados, se observó que el Agar Extracto de Malta (MEA) es un medio que no muestra ninguna ventaja para el crecimiento de cada uno de los géneros, por lo que se recomienda no utilizarlo en próximas investigaciones.
- En el caso de que el producto final a utilizarse sea harina de maíz, es recomendable almacenarlo como tal después del molido ya que esto permite disminuir la actividad acuosa más eficazmente y así es menos susceptible a la contaminación fúngica, teniendo en cuenta que el almacenamiento debe ser controlado (temperaturas y humedades bajas).



REFERENCIAS

1. **Gil, Angel H.** *Tratado de Nutrición*. Segunda edición. Madrid : Editorial Medica Panamericana, 2010.
2. **Peñaherrera, Diego.** *Manejo integrado del cultivo de maíz suave*. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP. [En línea] 2011. [Citado el: 21 de Octubre de 2012.] http://www.unl.edu.ec/agropecuaria/wp-content/uploads/2012/03/manejo-de-cultivo-de-maiz_Iniap-GIZ1.pdf
3. **Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN).** Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria INEN 2050:1995 . *Granos y cereales. Maíz en grano. Definiciones y clasificación*. [En línea] 1995. [Citado el: 20 de Noviembre de 2012.] www.inen.com
4. **Guerrero, Andrés G.** *Cultivos Herbáceos Extensivos*. Sexta edición. España : Ediciones Mundi-Prensa , 1999.
5. **Food and Agriculture Organization.** Food and Agriculture Organization. [En línea] 1993. [Citado el: 15 de Noviembre de 2012.] <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S03.htm>
6. **Tovar Benítez, Tomás.** *Caracterización morfológica y térmica del almidón de Maíz (Zea mays L.) obtenido por diferentes métodos de aislamiento*. [En línea] Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 2008. [Citado el: 18 de Noviembre de 2012.] <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/231104/508/1/Caracterizacion%20morfolologica%20y%20termica%20almidon%20de%20maiz.pdf>
7. **Programa Cooperativo de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria para la Subregión Andina (PROCIANDINO).** *Experiencias en el Cultivo del maíz en el área andina*. Quito, Ecuador : Prociandino, 1995. Vol. III.
8. **Peñaherrera, Diego.** *Manejo integrado del cultivo de maíz de altura*. Quito : Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias INIAP., 2011.
9. **(INEC), Instituto Nacional de Estadísticas y Censos.** *Sistema Agroalimentario del Maíz*. [En línea] INEC, 2009. [Citado el: 20 de Octubre de 2012.] <http://www.ecuadorencifras.com/sistagroalim/pdf/Maiz.pdf>
10. **Gamazo, Carlos y López Goñi, Ignacio.** *Manual Práctico de Microbiología*. Tercera edición. Madrid, España : Masson, 2005. ISBN 84-458 15199.
11. **Arenas Guzmán, Roberto.** *Micología Médica Ilustrada*. Tercera edición. Mexico : Mc Graw Hill, 2008.



12. **Moreno, Ernest y Benavides Ocampo, Calixto.** *Manual para la identificación de hongos en graos y sus derivados.* México : Universidad Autónoma de México, 1988.
13. **Food Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** *Manual de manejo postcosecha de granos a nivel rural.* [En línea] 1993. [Citado el: 20 de Octubre de 2012.] <http://www.fao.org/docrep/X5027S/x5027S0j.htm>
14. **Gimeno, Alberto.** *Los Hongos y las micotoxinas en la alimentación animal; conceptos, problemas, control y recomendaciones.* [En línea] 04 de Mayo de 2002. [Citado el: 11 de Noviembre de 2012.] <http://es.scribd.com/doc/55287946/Los-Hongos-y-las-Micotoxinas-en-la-Alimentacion-Animal-aw>
15. **Carrillo, Leonor.** *Aspergillus. Los Hongos de los alimentos y forrajes.* México : Universidad Nacional de Salta., 2003.
16. **Penicillium.** *Los hongos de los alimentos y forrajes.* México : Universidad Nacional de Salta, 2003.
17. **Serrat, Concha y Magaer, Josefina y cols.** *Penicillium marneffe y Peniciliosis. Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina y Hospital Clínico.* [En línea] 2011. [Citado el: 15 de Noviembre de 2012.] <http://www.inia.es/gcontrec/pub/4%20RM2006-00013.pdf>
18. **Carrillo, Leonor.** *Fusarium. Los hongos de los alimentos y forrajes.* México : Universidad Nacional de Salta, 2003.
19. **Revista Iberoamericana de Micología.** *Rhizopus stolonifer.* [En línea] 2002. [Citado el: 13 de Diciembre de 2012.] <http://hongos-alergicos.reviberoammicol.com/files/038.PDF>
20. **M.C.D. LAB.** *Potato Dextrosa Agar .* [En línea] 16 de Marzo de 2007. [Citado el: 30 de Octubre de 2012.] http://www.mcd.com.mx/pdfs/agar_dextrosa_papa.pdf
21. **Merck.** *Merck Microbiology Manual: Potato Dextrose Agar. Merck Microbiology Manual.* [En línea] 2007. [Citado el: 1 de Noviembre de 2012.] <http://es.scribd.com/doc/94454909/Merck-Microbiology-Manual-12th>
22. **PANREAC.** *Manual Básico de Microbiología: Agar Rosa de Bengala Diclorán.* [En línea] 2003. [Citado el: 28 de Octubre de 2012.] <http://es.scribd.com/doc/8614571/Manual-de-Medios-de-Cultivo>
23. **Merck.** *Merck Microbiology Manual: Dicholoran Rose Bengal Chloramphenicol (DRBC) Agar. Merck Microbiology Manual.* [En línea] 2007. [Citado el: 28 de Octubre de 2012.] <http://es.scribd.com/doc/94454909/Merck-Microbiology-Manual-12th>



24. **PANREAC**. Manual Básico de Microbiología: Extracto de Malta, Agar. [En línea] 2003. [Citado el: 28 de Octubre de 2012.] <http://es.scribd.com/doc/8614571/Manual-de-Medios-de-Cultivo>

25. *Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A- producing Aspergillus species from coffee beans grown in two regions of Thailand*. **Paramee Noonim, et al.** 128, Bangkok : Elsevier, 2008.

26. **Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN)**. Control microbiológico de los alimentos.

Mohos y Levaduras viables. Siembra en placa por profundidad. [En línea] 1998. [Citado el: 28 de Octubre de 2012.] <http://www.inen.gob.ec/images/pdf/nte/1529-10.pdf>



ANEXOS

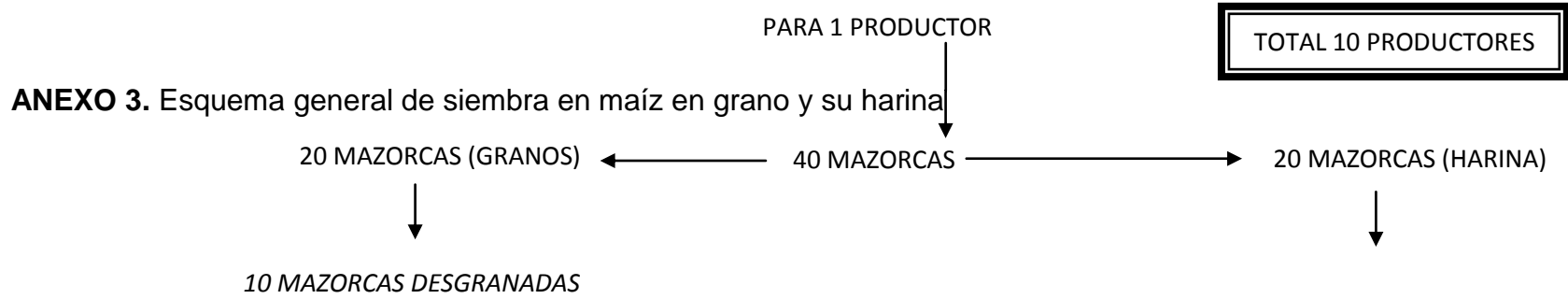
ANEXO 1. Ficha de recolección de datos para la caracterización del maíz

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA CARACTERIZACION DEL MAIZ			
ESTUDIO DE TESIS SOBRE LA DETERMINACIÓN DE LA FLORA MICOLÓGICA DEL MAÍZ Y SU HARINA EN LA PARROQUIA SAN JUAN - CANTÓN GUALACEO			
Responsables: Dalia Pérez y Elena Zarate			
Estudiantes de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca.			
FECHA DE CONSULTA:			
1. DATOS GENERALES			
Nombre del cultivador:			
Dirección:			
Teléfono:			
2. DATOS DE LA MUESTRA			
Forma de la mazorca:	Cónica <input type="checkbox"/>	Cónica-Cilindrica <input type="checkbox"/>	Cilindrica <input type="checkbox"/>
Tamaño del grano:	Grande <input type="checkbox"/>	Mediano <input type="checkbox"/>	Pequeño <input type="checkbox"/>
Color del grano:	<ul style="list-style-type: none"> • Amarillo • Blanco • Dentado • Morado o negro • Rojo • Mixturiado (varios colores) 		
Tipo de grano:	<ul style="list-style-type: none"> • Harinoso • Semiharinoso • Dentado • Reventador • Arrugado 		
Días para la cosecha del grano seco:	<ul style="list-style-type: none"> • 9 meses • 10 meses 		
Altura de la planta:	<ul style="list-style-type: none"> • 250 cm • 255 cm • 260 cm 		



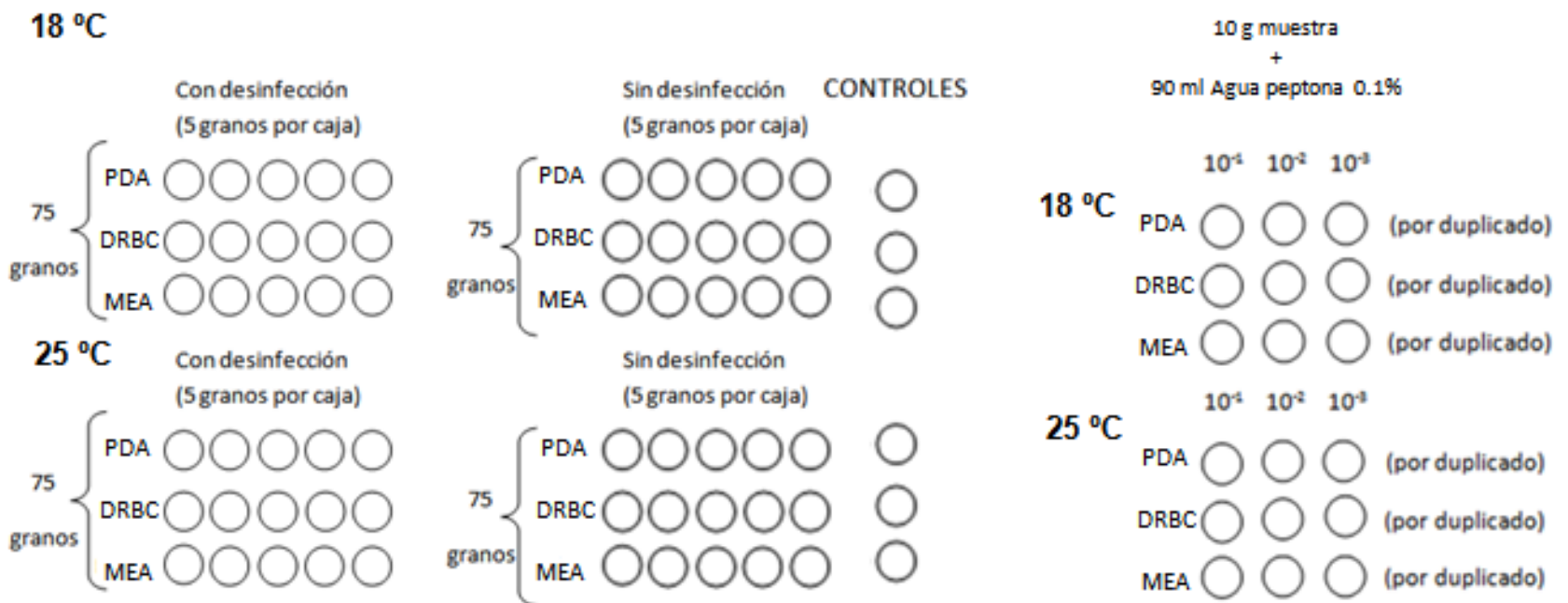
ANEXO 2. Ficha de recolección de datos sobre prácticas agrícolas

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS SOBRE PRÁCTICAS AGRÍCOLAS	
ESTUDIO DE TESIS SOBRE LA DETERMINACIÓN DE LA FLORA MICOLÓGICA DEL MAÍZ Y SU HARINA EN LA PARROQUIA SAN JUAN - CANTÓN GUALACEO.	
Responsables: Dalia Pérez y Elena Zarate Estudiantes de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Universidad de Cuenca.	
FECHA:	
1. DATOS GENERALES	
Nombre del cultivador:	
Dirección:	
Teléfono:	
2. DATOS SOBRE EL CULTIVO	
Fertilización:	
Tipo de Pesticida utilizado:	
Fecha de Siembra:	
Fecha de Cosecha:	
Tipo de Maíz sembrado:	
Tipo de Riego:	
Tipo de secado:	
Tipo de almacenamiento (condiciones):	
Tiempo de almacenamiento:	
Cuando se considera que el maíz está en mal estado: <ul style="list-style-type: none"> • Granos rotos • Granos podridos • Presencia de insectos Otros:.....	
Si el grano está dañado: <ul style="list-style-type: none"> • Es alimento de animales • Se desecha • Se usa como abono • Se muele Otros:.....	



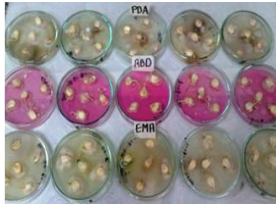
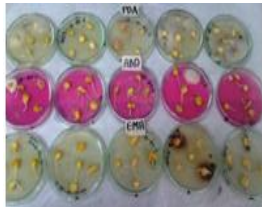
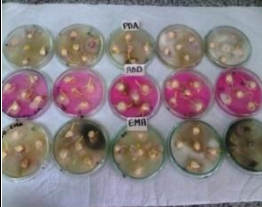
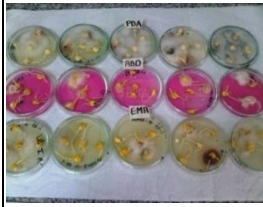
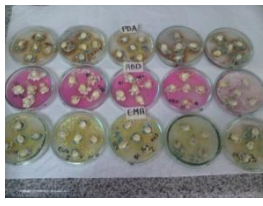
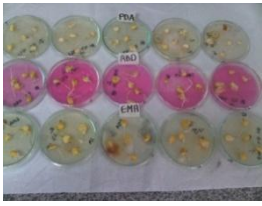
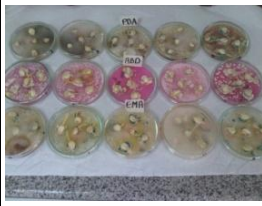
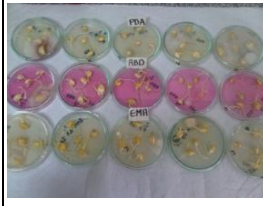

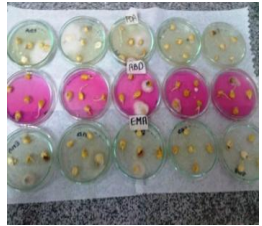
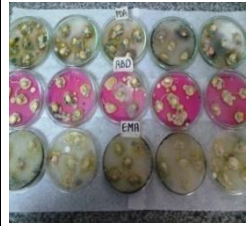
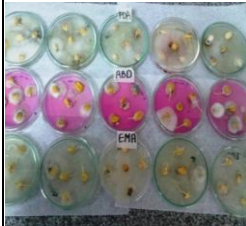
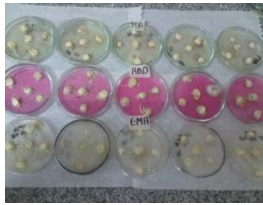
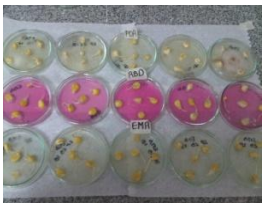
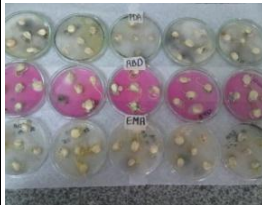
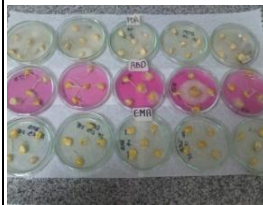
1) MES 1: - Medir Aw: Hasta 48h después de la recolección
- Siembra




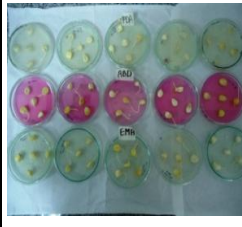
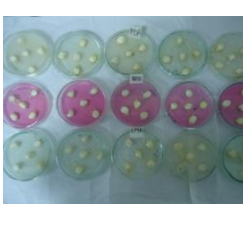
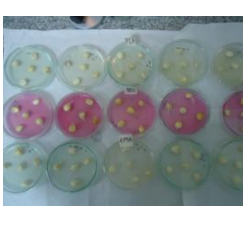
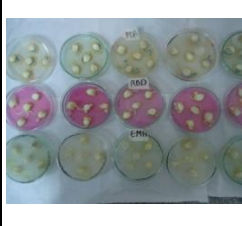
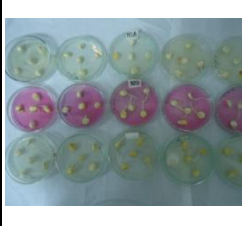
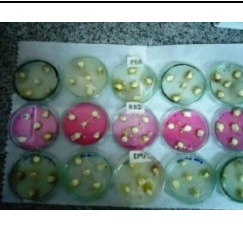

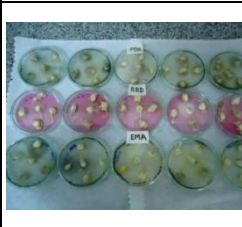
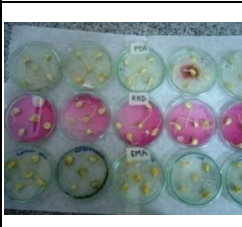


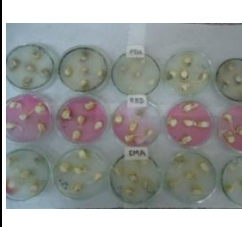
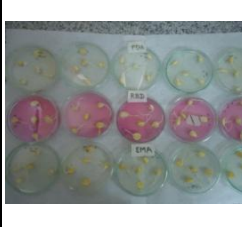
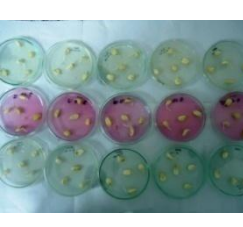
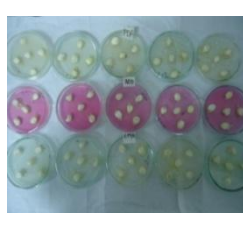


1) MES 3: - Medir Aw
- Siembra

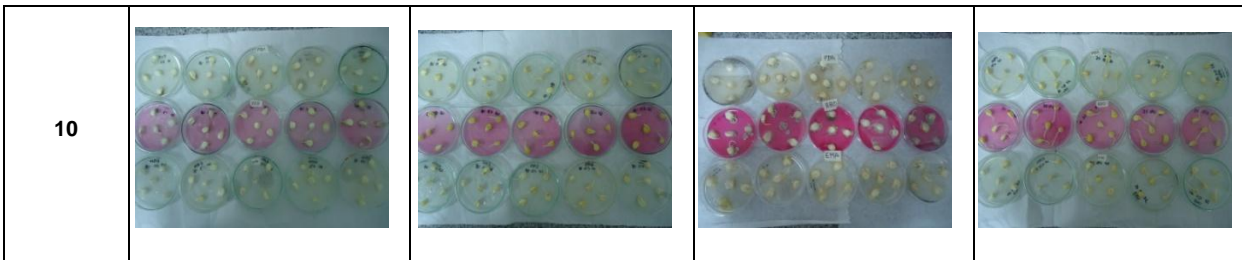


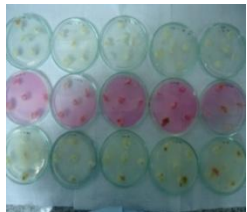
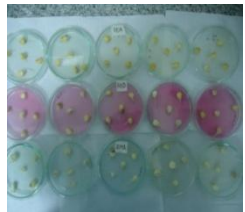
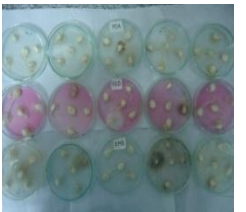
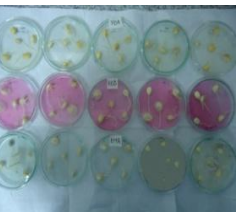








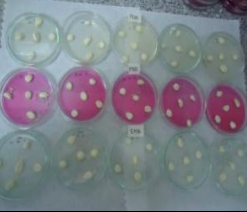

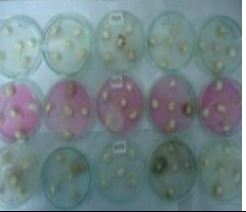

2) MES 3: - Medir Aw
- Siembra → *SEGUIR EL MISMO PROCEDIMIENTO CON LAS OTRAS 10 MAZORCAS*

ANEXO 4. Historial de Resultados


HISTORIAL DE RESULTADOS				
PRIMERA SIEMBRA				
	18°C		25°C	
Nº de producto r	Sin desinfección	Con desinfección	Sin desinfección	Con desinfección
1				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
2				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
3				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
4				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección

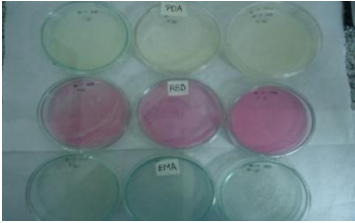

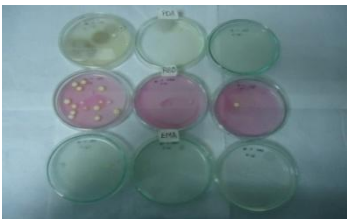
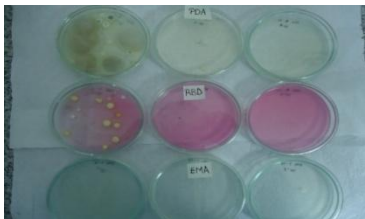
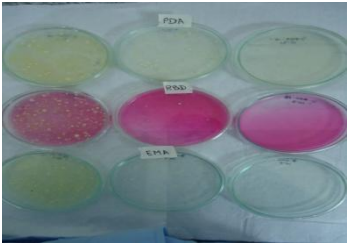

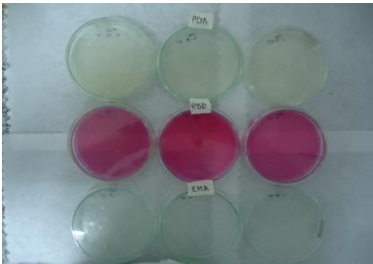
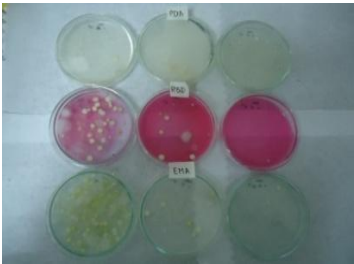
5				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
6				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
7				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
8				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
9				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección

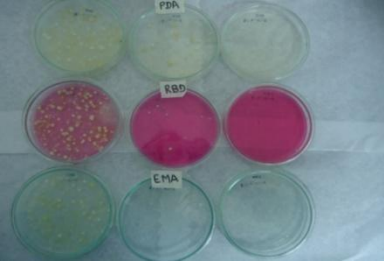
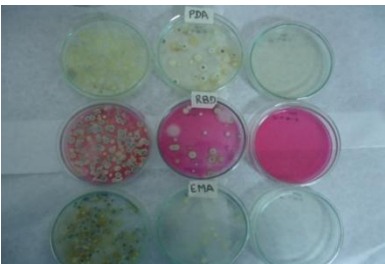
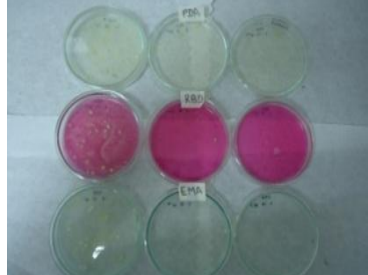
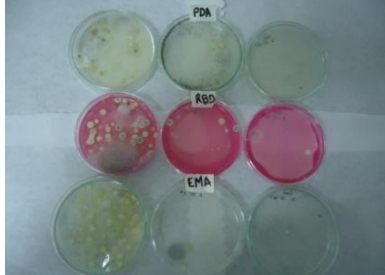
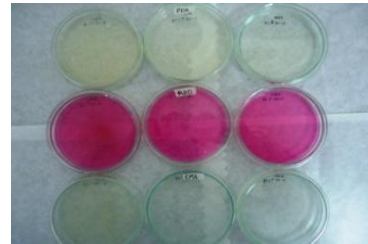
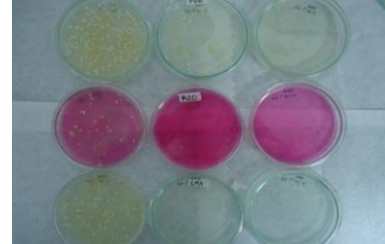
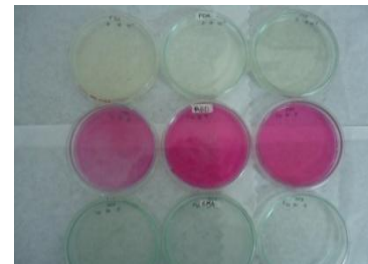
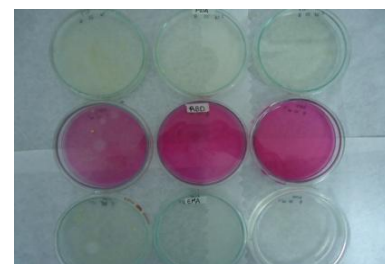


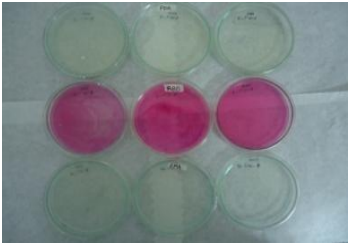
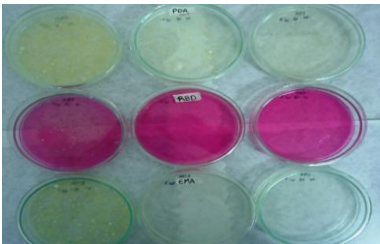
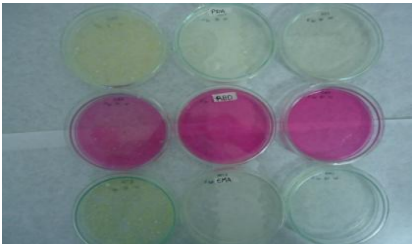
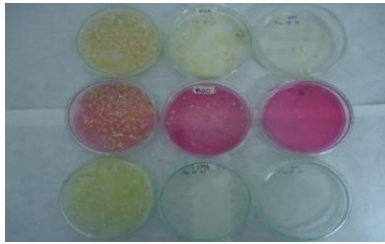
SEGUNDA SIEMBRA (DESPUES DE DOS MESES)				
	18°C		25°C	
N° de Productor	Sin desinfección	Con desinfección	Sin desinfección	Con desinfección
1				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
2				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
3				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
4				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección

5				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
6				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
7				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
8				
	18°C Sin desinfección	18°C Con desinfección	25°C Sin desinfección	25°C Con desinfección
9				
	18°C Sin desinfección	18°C Con	25°C Sin desinfección	25°C Con

		desinfección		desinfección
10				

SIEMBRA DE LA HARINA (DESPUES DE DOS MESES)		
N° de productor	18°C	25°C
1		
	18°C	25°C
2		
	18°C	25°C
3		
	18°C	25°C
4		
	18°C	25°C

5		
	18°C	25°C
6		
	18°C	25°C
7		
	18°C	25°C
8		
	18°C	25°C

9		
	18°C	25°C
10		



ANEXO 5. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-10:98. Control microbiológico de Mohos y Levaduras viables. Recuentos en placa por siembra en profundidad.

CDU: 614.31:579.67:582.28
ICS: 07.100.30



CIIU: 9320
AL 01.05-308

<p>Norma Técnica Ecuatoriana Opcional</p>	<p>CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. MOHOS Y LEVADURAS VIABLES. RECUESTO EN PLACA POR SIEMBRA EN PROFUNDIDAD</p>	<p>NTE INEN 1 529-10:98 1998-01</p>
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma describe el método para cuantificar el número de unidades propagadoras de mohos y levaduras en un gramo ó centímetro cúbico de muestra.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Esta norma especifica el método de recuento, en placa, por siembra en profundidad, para el recuento de mohos y levaduras.</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Mohos. Son ciertos hongos multicelulares, filamentosos, cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. Están constituidos por filamentos ramificados y entrecruzados, llamados "hifas", cuyo conjunto forma el llamado "micelio" que puede ser coloreado o no. Los mohos pueden formar, sobre ciertos alimentos, toxinas, llamadas micotoxinas. Provocan la alteración de productos alimenticios, especialmente los ácidos: yogur, jugos, frutas, etc., o los de presión osmótica elevada: productos deshidratados, jarabes, algunos productos salados, etc.</p> <p>3.2 Levaduras. Son hongos cuya forma de crecimiento habitual y predominante es unicelular. Poseen una morfología muy variable: esférica, ovóidea, piriforme, cilíndrica, triangular o, incluso, alargada, en forma de micelio verdadero o falso. Su tamaño supera al de las bacterias. Al igual que los mohos, causan alteraciones de los productos alimenticios, especialmente los ácidos y presión osmótica elevada.</p> <p>3.3 Recuento de mohos y levaduras viables. Es la determinación del número de colonias típicas de levaduras y mohos que se desarrollan a partir de un gramo o centímetro cúbico de muestra, en un medio adecuado e incubado entre 22°C y 25°C.</p> <p style="text-align: center;">4. RESUMEN</p> <p>4.1 Este método se basa en el cultivo entre 22°C y 25°C de las unidades propagadoras de mohos y levaduras, utilizando la técnica de recuento en placa por siembra en profundidad y un medio que contenga extracto de levadura, glucosa y sales minerales.</p> <p style="text-align: center;">5. MATERIAL Y MEDIOS DE CULTIVO</p> <p>5.1 Materiales. La vidriería debe resistir esterilizaciones repetidas y todo el material debe estar perfectamente limpio y estéril.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p> <p>DESCRIPTORES: Productos alimenticios. Análisis microbiológico, contaje, mohos y levaduras</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN – Casilla 17-01-3999 – Baquerizo Moreno EB-29 y Almagro – Quito-Ecuador – Prohibida la reproducción

**5.1.1 Placas Petri**

5.1.2 Pipetas serológicas de boca ancha de 1; 5 y 10 cm³ graduadas en 1/10 de unidad.

5.2 Medio de cultivo

5.2.1 Agar sal-levadura de Davis o similar. Ver NTE INEN 1 529-1.

6. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

6.1 Preparar la muestra según su naturaleza, utilizando uno de los procedimientos indicados en la NTE INEN 1 529-2.

7. PROCEDIMIENTO

7.1 Utilizando una sola pipeta estéril, pipetear, por duplicado, alícuotas de 1 cm³ de cada una de las diluciones decimales en placas Petri adecuadamente identificadas. Iniciar por la dilución de menor concentración.

7.2 Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas, aproximadamente 20 cm³ de agar sal-levadura de Davis (SLD) fundido y templado a 45 ± 2 °C. La adición del medio de cultivo no debe pasar más de 15 minutos, a partir de la preparación de la primera dilución.

7.3 Delicadamente, mezclar el inóculo de siembra con el medio de cultivo, imprimiendo a la placa movimientos de vaivén, 5 veces en una dirección; hacerla girar cinco veces en sentido de las agujas del reloj. Volver a imprimir movimientos de vaivén en una dirección que forme ángulo recto con la primera y hacerla girar cinco veces en sentido contrario a las agujas de reloj.

7.4 Utilizar una placa para el control de la carga microbiana del ambiente, la cual no debe exceder de 15 colonias/placa, durante 15 minutos de exposición. Este límite es mantenido mediante prácticas adecuadas de limpieza y desinfección.

7.5 Como prueba de esterilidad del medio, en una placa sin inóculo verter aproximadamente 20 cm³ del agar.

7.6 Dejar las placas en reposo hasta que se solidifique el agar.

7.7 Invertir las placas e incubarlas entre 22 °C y 25 °C, por cinco días.

7.8 Examinarlas a los dos días de incubación y comprobar si se ha formado micelio aéreo. Las primeras colonias que se desarrollan son las de levaduras, que suelen ser redondas, cóncavas, estrelladas. La mayoría de las colonias jóvenes de levaduras son húmedas y algo mucosas, también pueden ser harinosas, blanquecinas y algunas cremosas y rosadas. En ciertos casos, apenas cambian al envejecer, otras veces se desecan y encogen. Las colonias de mohos tienen un aspecto algodonoso característico.

7.9 Cuando el micelio aéreo de los mohos amenace cubrir la superficie de la placa, dificultando las lecturas posteriores; pasados dos días, realizar recuentos preliminares en cualquier placa que se pueda distinguir las colonias.

(Continúa)

7.10 A los cinco días, seleccionar las placas que presenten entre 10 y 150 colonias y contarlas sin el auxilio de lupas. A veces pueden desarrollarse colonias pequeñas, éstas son de bacterias acidófilas y, por tanto, deben excluirse del recuento. Las colonias de levaduras deben ser comprobadas por examen microscópico

7.11 Contar las colonias de mohos y levaduras en conjunto o separadamente. Si las placas de todas las diluciones contienen más de 150 colonias, contar en las placas inoculadas con la menor cantidad de muestra.

7.12 Cálculos

7.12.1 Cálculo del número (N) de unidades propagadoras (UP) de mohos y/o levaduras por centímetro cúbico ó gramo de muestra. Calcular según la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\text{número total de colonias contadas o calculadas}}{\text{cantidad total de muestra sembrada}}$$

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1m_2)d}$$

Donde:

- $\sum C$ = suma de las colonias contadas o calculadas en todas las placas elegidas;
- n_1 = número de placas contadas de la primera dilución seleccionada;
- n_2 = número de placas contadas de la segunda dilución seleccionada;
- d = dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos, por ejemplo 10^{-2} ;
- V = volumen del inóculo sembrado en cada placa.

Ejemplo:

Volumen sembrado	=	1 cm ³
Dilución 10 ⁻²	=	83 y 97 colonias
Dilución 10 ⁻³	=	33 y 28 colonias
Número	=	$\frac{83 + 97 + 33 + 28}{1(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}}$
	=	$\frac{241}{0,022}$
	=	10 954 expresado como $1,1 \times 10^4$

7.12.2 Redondeo. El valor obtenido redondear a dos cifras significativas de la siguiente manera (NTE INEN 52):

7.12.2.1 Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es menor de cinco, mantener inalterado el segundo dígito y reemplazar por ceros los restantes. Por ejemplo, si el valor calculado fuere 553 000, redondeado a 550 000 y expresar como $5,5 \times 10^5$. Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es superior a cinco, añadir una unidad al segundo dígito; por ejemplo, si el valor obtenido fue 10 954, redondearlo a 11 000 y expresar $1,1 \times 10^4$.

(Continua)

7.12.2.2 Si el tercer dígito empezando por la izquierda es cinco y es seguido de, por lo menos, un dígito, añadir una unidad al segundo dígito y reemplazar por ceros a los restantes. Por ejemplo, si el valor obtenido fue 31 554, redondearlo a 32 000 y expresar como $3,2 \times 10^4$. Si el tercer dígito es cinco y no es seguido de otro (s) dígito (s) ó lo es únicamente por ceros, añadir una unidad al segundo dígito, si éste es impar; si es par ó cero conservarlo inalterado, ejemplo: 235 redondear a 240 y expresar como $2,4 \times 10^2$, 24 500 redondear a 24 000 y expresar como $2,4 \times 10^4$.

7.12.3 Presentación de resultados

7.12.3.1 Presentar el resultado como número, N, de unidades propagadoras UP de mohos y/o levaduras /cm³ ó g de muestra utilizando solo dos cifras significativas multiplicadas por 10^x (x es la respectiva potencia de 10). Las cifras significativas corresponden al primero y segundo dígitos (empezando por la izquierda) del número de las colonias calculadas (7.12.1).

7.12.3.2 Si no hay desarrollo de colonias en las placas de la suspensión 10⁻¹, presentar como número estimado (N_E), de la siguiente forma:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 \text{ ó g} = < 1,0 \times 10^1$$

7.12.3.3 Si no hay desarrollo de colonias en las placas sembradas con 1 cm³ de muestra no diluida (producto original líquido), expresar el resultado de la siguiente manera:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 = < 1,0 \times 10^0$$

7.12.3.4 Si todas las placas sembradas presentan más de 150 colonias, calcular el resultado a partir de las placas sembradas con la dilución más alta y expresar de la siguiente manera:

$$N_E \text{ de UP de mohos y/o levaduras/cm}^3 \text{ o g} = > \text{ al valor obtenido } \times "f"$$

f = factor de dilución (valor inverso de la dilución de la muestra).

Indicar entre paréntesis la dilución utilizada. Este resultado sirve como guía para decidir el número de diluciones que se han de realizar en ensayos posteriores y, la decisión de aceptación o rechazo de una partida de alimentos debe basarse solo en valores N.

8. PRECISIÓN DEL MÉTODO

8.1 Repetibilidad del recuento de colonias y error personal.

8.1.1 Los resultados obtenidos por la misma persona al contar por segunda vez las colonias de una misma placa, no deben variar en más del 5% y del 10% cuando es realizado por otra persona.

8.1.2 Por razones estadísticas, el intervalo de confianza para este método varía, en el 95% de los casos, desde $\pm 16\%$ a $\pm 52\%$. En la práctica, es posible observar variaciones mayores, especialmente entre resultados obtenidos por diferentes analistas.

(Continua)



9. INFORME DEL ENSAYO

9.1 En el Informe del ensayo indicar la norma de referencia, la temperatura de incubación, los resultados obtenidos, todas las condiciones operativas no especificadas en esta norma o aquellas consideradas como opcionales y los incidentes que puedan haber influenciado en el resultado. Además, se debe incluir toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra

(Continúa)



ANEXO 6. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1529-2:99. Control microbiológico de los alimentos toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO
 CDU: 614.31:579.67:543.05
 ICS: 07.100.30



CIU: 9320
 AL 01.05-318

<p>Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria</p>	<p>CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO</p>	<p>NTE INEN 1 529-2:99 1999-02</p>
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma, según la naturaleza del producto, establece los procedimientos generales para la toma de muestras de alimentos, el envío al laboratorio y su preparación en el laboratorio.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Los procedimientos establecidos en esta norma para la preparación de la muestra se refieren al tratamiento inicial al que se deben someter las muestras de alimento destinadas al análisis microbiológico, según se indica en la serie de NTE "INEN 1529 Control Microbiológico de los Alimentos", excepto en las NTE INEN 1529-1 y 1529-12.</p> <p>2.2 Esta norma no se aplica para casos de brotes epidémicos o intoxicaciones, ni para decidir el tamaño de la muestra.</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Para los efectos de esta norma se adoptan las definiciones contempladas en cada una de las Normas Técnicas Ecuatorianas (NTE) INEN de Requisitos sobre alimentos y las que a continuación se detallan:</p> <p>3.1.1 Lote. Es la cantidad de alimento producida y manipulada bajo condiciones que se suponen uniformes. En la práctica, esto generalmente significa un alimento producido en un batch, o cuando el proceso es continuo dentro de un período de tiempo definido y en un lugar determinado, por ejemplo, en una línea de producción determinada, en un autoclave u otra unidad crítica de tratamiento. Los diferentes lotes son identificados mediante códigos.</p> <p>3.1.2 Partida. Es la cantidad de alimento, grande o pequeña, enviada a un determinado destinatario. Normalmente consiste en numerosas cajas de alimento procedente de uno o más lotes.</p> <p>3.1.3 Toma de muestras. Es el acto de seleccionar y coger una determinada cantidad, o un número de recipientes o unidades de producción de un mismo lote de alimento, o de áreas de superficie que son o que entran en contacto con productos alimenticios.</p> <p>3.1.4 Unidad de muestreo. Es la parte definible más pequeña de un lote (unidad de producción). Esto puede significar una lata, o un paquete. Cuando la producción es a granel y se envasa en cajas, bidones, barriles, sacos, etc., entonces la unidad de muestreo es arbitraria y puede depender del utensilio para tomar muestras. No se debe confundir esta unidad de muestreo con la unidad de muestra realmente utilizada en el análisis.</p> <p>3.1.5 Unidad de muestra. Es la cantidad de material (tomada de la muestra de población) que realmente se utiliza en el análisis, es la unidad analítica. En general, para los ensayos microbiológicos se utiliza una unidad de muestra de 10 ó 25 g ó cm³ o sus múltiplos.</p> <p>3.1.6 Muestra. Parte del conjunto (población) a partir de la cual se trata de estimar, mediante análisis o examen, las propiedades del conjunto. Se debe tener en cuenta que sólo puede someterse a análisis una parte (unidad de muestra) de la muestra de población (ver 3.1.5 y 3.1.7).</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p> <hr/> <p>DESCRIPTORES: Alimentos, análisis microbiológico, muestras, toma de muestras, envío de muestras, preparación de muestras.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Casilla 17-01-3999 - Baquerizo 464 y Ave. 6 de Diciembre - Quito-Ecuador - Prohibida la reproducción

3.1.19 Suspensión inicial (dilución primaria). Es la suspensión, solución o emulsión obtenida después que la cantidad del producto en análisis (o de la porción de muestra preparada para el ensayo) ha sido pesada o medida y luego mezclada, utilizando un homogeneizador cuando es necesario y observando las precauciones apropiadas, con un volumen de diluyente igual a nueve veces la unidad de muestra, para que los microorganismos presentes en la unidad de muestra se distribuyan lo más uniformemente posible y se permita que las partículas grandes, si las hay, se sedimenten (ver nota 3).

3.1.20 Otras diluciones decimales. Las suspensiones, soluciones o emulsiones obtenidas mezclando un volumen específico de la dilución primaria con nueve veces el volumen del diluyente y repitiendo esta operación con cada dilución así preparada, hasta obtener una serie de diluciones decimales adecuada para la inoculación del medio de cultivo.

4. EQUIPO, MATERIAL Y DILUYENTES

4.1 Generalidades

4.1.1 El equipo y material utilizados en la toma de muestras deben ser de acero inoxidable u otro material de resistencia adecuada, que no produzca cambios en la muestra que puedan afectar los resultados de los exámenes subsiguientes. El equipo debe ser lo suficientemente robusto para evitar deformaciones en el uso y lo suficientemente leve que permita al operador moverlo en el producto, fácil y rápidamente. Si los utensilios o aparatos son soldados, la suelda debe resistir temperaturas de 180°C. Todas las superficies deben ser lisas y libres de hendeduras, todas las esquinas deben ser redondeadas. El equipo para tomar muestras debe cumplir con los requisitos específicos adecuados a cada producto.

4.1.2 Los frascos para muestras y sus cierres, deben ser de un material resistente a esterilizaciones repetidas, inerte, impermeable al agua y a las grasas (acero inoxidable, vidrio y algunos plásticos). También se puede utilizar envases desechables de plástico, hojas de aluminio o fundas plásticas con cierres apropiados. De preferencia deben ser opacos y de capacidad y forma adecuadas para tomar la unidad de muestra deseada. Los frascos para productos sólidos, semisólidos o viscosos deben ser de boca ancha.

4.1.3 Todo el material y utensilios utilizados en la toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico deben estar perfectamente limpios, secos, envueltos individualmente y esterilizados por uno de los siguientes métodos físicos:

4.1.3.1 Vapor a presión de 15 libras/ pulgada² (autoclave): 121°C durante 20 min, mínimo.

4.1.3.2 Aire caliente: 170-175°C, en el punto más frío, durante 1 h, mínimo. Utilizar un horno con una eficiente circulación de aire para que haya la seguridad de que en todas las partes del horno se mantiene la temperatura fijada. Si por alguna razón, es imposible la esterilización por estos dos métodos, utilizar los siguientes métodos alternos, que son secundarios, y se los recomienda siempre que el material sea utilizado inmediatamente después de esterilizado y enfriado.

4.1.3.3 Vapor fluente: 100°C por una hora.

4.1.3.4 Agua hirviendo: ebullición en agua por 20 min, mínimo.

NOTA 3 En algunos casos puede necesitarse, especialmente para productos que dan una suspensión inicial 1+9 demasiado viscosa o demasiado espesa, añadir más diluyente. En algunos otros casos, cuando se necesita relacionar los resultados de los análisis con determinados criterios de especificación, puede ser necesario una dilución primaria más concentrada que 1+9. Estos factores deben ser tenidos en cuenta para las operaciones subsiguientes y/o en la expresión de resultados.

OBSERVACIÓN. Las definiciones contenidas en los numerales 3.1 al 3.18, inclusive, son según la FAO y la "International Commission on Microbiological Specifications for Foods" (ICMSF).

(Continúa)

4.1.3.5 Inmersión en etanol al 96% (v/v) y flameado hasta que el etanol se consuma. Para materiales que resisten la llama directa.

4.1.3.6 Combustión: exponer a la llama de un mechero de Bunsen o de alcohol hasta la incandescencia y enfriar. Para objetos que resistan la incandescencia.

4.2 Equipo y material

4.2.1 *Para abrir envases:* tijeras, cuchillos, abridores de latas y de botellas, martillos, alicates, destornilladores, herramienta especial para abrir cajas de cartón, bisturíes, etc.

4.2.2 *Para tomar muestras:* sierras; sondas especiales que penetren en el producto y corten un trozo cilíndrico; taladros; cucharas; cucharones de draga; pinzas; tenedores; torundas; plantillas de metal, con un cuadrado de superficie conocida recortado en el centro; fundas plásticas con cierre apropiado; papel aluminio; compuesto obturante, para cerrar los orificios dejados en los quesos al tomar las muestras.

4.2.3 *Para tomar muestras congeladas:* taladro eléctrico de alta velocidad, hacha, cincel.

4.2.4 *Para controlar la temperatura:* termómetro manual de cuadrante, para controlar la temperatura ambiente y del producto.

4.2.5 *Para transportar muestras:* refrigeradora portátil capaz de enfriar hasta 0°C a 5°C en poco tiempo. Nevera isotérmica con cierre hermético y material aislante entre la pared interna y la externa, para transportar muestras congeladas o refrigeradas.

4.2.6 *Para etiquetar:* etiquetas y marcadores.

4.2.7 *Equipo para esterilización:* autoclave u homo portátiles o mechero de alcohol, y un agente desinfectante (alcohol al 70%).

4.2.8 *Equipo para mantener muestras:* refrigeradora, para almacenar muestras a 2°C y congelador para almacenar a temperaturas menores de -20°C.

4.2.9 *Equipo para descongelar muestras:* baño de agua controlado termostáticamente con agitador, que opere $37 \pm 1^\circ\text{C}$ y otro, a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

4.2.10 *Frascos para muestras:* frascos de boca ancha con tapa de rosca, envases desechables de plástico. Para el transporte de muestras deben ser de un material que absorba los golpes.

4.2.11 *Equipo para homogeneizar muestras:* homogeneizadores, vortex, trituradores, "stomacher", molinos.

4.2.12 *Equipo para medir el pH:* pH metro, con compensación de temperatura y sensibilidad de 0,1 de unidad de pH.

4.2.13 *Equipo para pesar muestras:* Balanza con exactitud clase II y graduación mínima de 0,1 g.

4.2.14 *Materiales varios:* erlenmeyers, probetas, tubos, pipetas, jeringuillas.

4.3 Diluyentes

4.3.1 Agua peptona al 0,1% : para uso general.

4.3.2 Agua peptona tamponada: para *Salmonella*.

4.3.3 Agua peptona sal al 15%: para extremadamente halófilos.

(Continúa)

- 4.3.4 Agua peptona sal al 5%: para halófilos moderados y halotolerantes.
- 4.3.5 Caldo TSB: para revitalización.
- 4.3.6 Caldo reforzado para clostridios: para anaerobios.
- 4.3.7 Solución de calgón [hexametáfosfato sódico, $(\text{NaPO}_3)_6$] al 1% en solución Ringer diluida al ¼: diluyente para hisopos de alginato.
- 4.3.8 Solución de citrato sódico al 2%, pH $7,5 \pm 0,1$: para quesos, leches fermentadas, leche en polvo "roller".
- 4.3.9 Solución de fosfato dipotásico al 2%: para caseína ácida, caseína láctica y suero ácido en polvo el diluyente debe tener un pH de $8,4 \pm 0,1$ y $7,5 \pm 0,1$ para crema ácida, quesos, caseinatos.
- 4.3.10 Solución de fosfato tripotásico ($\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) al 8% para ajustar el pH de las muestras.
- 4.3.11 Solución Ringer al 1/4: para mantequillas
- 4.3.12 Solución de sacarosa al 20%: para osmófilos.
- 4.3.13 Solución salina peptonada: para uso general.

5. TOMA DE MUESTRAS

5.1 Disposiciones administrativas (ver nota 4)

5.1.1 La toma de muestras debe realizar un agente autorizado o un agente independiente autorizado que ha recibido formación técnica apropiada. El o la agente debe actuar independientemente y no aceptar la interferencia de terceros. Bajo su responsabilidad puede recibir ayuda de otros. Cuando sea posible, se debe permitir a los delegados de las partes interesadas presenciar la toma de muestras. El agente y su(s) ayudante debe tomar las medidas adecuadas para prevenir cualquier contaminación tanto del envío [o lote(s)] como de las unidades de muestreo (por ejemplo, lavarse y desinfectarse las manos antes de manipular el material a muestrearse, vestir un delantal u overol blanco y limpio, usar mascarilla y gorro, trabajar observando rigurosamente todas las medidas previstas en el programa de la planta para la higiene y desinfección de los empleados).

5.1.2 Se sellará y etiquetará cada muestra. Fijar el sello de manera que sea imposible remover el contenido o la etiqueta sin destruir el sello. Las etiquetas deben ser de tamaño y calidad adecuadas para el propósito (por ejemplo una cartulina de color claro, un cartón a prueba de grasa y de agua y con un ojete reforzado). Escribir la información con tinta indeleble indicando, por lo menos, la naturaleza del producto, el número y código del lote, la fecha de la toma de muestras, el nombre y la firma del agente que tomó las muestras. Cuando sea necesario, se puede incluir información adicional tal como el propósito de la toma de muestras, la masa o volumen de la muestra, la marca de identificación de la unidad (caja, bidón, etc.) de donde se tomó la muestra.

5.1.3 Se tomarán todas las muestras, cuando menos, por duplicado y se conservarán en condiciones idénticas a las que tenían en el momento de la toma. De ser necesario, y cuanto antes, se debe poner una serie a disposición de la otra parte. Previo convenio de las partes, se recomienda la toma de series adicionales de muestras, las cuales, en caso necesario, deben guardarse para un arbitraje independiente. Una vez tomadas las muestras, enviar las muestras al laboratorio para su análisis.

NOTA 4 Las siguientes instrucciones no son necesariamente aplicables para tomar muestras de rutina.

(Continúa)



5.1.4 Las muestras se deben acompañar de un informe de la toma de muestras firmado por el agente responsable de la toma y refrendado por posibles testigos. En el informe debe constar la siguiente información:

5.1.4.1 Lugar, fecha y hora en que se realizó la toma de muestras.

5.1.4.2 Nombre y dirección del agente que realizó la toma de muestras y de los posibles testigos.

5.1.4.3 Método exacto de la toma de muestras (aleatorio en todo el lote, aleatorio en las partes accesibles o por otro método).

5.1.4.4 Procedimiento exacto utilizado para tomar las muestras, si éste difiere de las instrucciones dadas en esta norma.

5.1.4.5 Motivo de la toma de muestras.

5.1.4.6 Naturaleza del alimento.

5.1.4.7 Número y código del lote, códigos de los baches y el número y tamaño de las unidades que constituyen el lote.

5.1.4.8 Tamaño y número de las muestras de población debidamente identificadas en relación al lote, bache y/o unidad (caja, bidón, etc.) del cual proceden.

5.1.4.9 Lugar a donde se enviarán las muestras.

5.1.4.10 Ensayos solicitados.

5.1.4.11 Nombre y dirección del laboratorio que analizará las muestras.

5.1.4.12 Temperatura del producto al momento de la toma de muestras.

5.1.4.13 Origen del envío y lugar de destino.

5.1.4.14 Si es posible, el nombre y la dirección del fabricante, importador, vendedor o comprador, según proceda.

5.1.4.15 Cuando convenga, se debe mencionar en el informe, además, cualquier condición o circunstancia relevante de la toma de muestras (por ejemplo, el estado de los envases y sus alrededores, la temperatura y humedad atmosféricas, la edad del producto, método de esterilización del material para tomar muestras), si la muestra es una mezcla de submuestras y cualquier información especial referente al producto muestreado, por ejemplo, la dificultad para homogeneizar el producto.

5.2 Número de muestras de población que se deben tomar

5.2.1 Se debe tomar un número de muestras de población equivalente al número "n" de unidades de muestra indicado en el programa de muestreo especificado, ya sea, en las respectivas NTE de requisitos o en un contrato, o según lo acordado entre las partes interesadas o según un programa diseñado para enfrentar una situación emergente (brote de intoxicación, por ejemplo).

5.3 Técnicas para la toma de muestras

5.3.1 Generalidades

(Continúa)

5.3.1.1 Tomar las muestras en condiciones asépticas, con rapidez pero cuidadosamente, y de tal manera, para que la muestra sea representativa del producto que se quiere analizar.

5.3.1.2 Antes de abrir un envase limpiar la zona apropiada con agua tibia y jabón y pasar alcohol al 70% sin flamear, o si es un envase de papel, retirar la parte externa. Abrir el envase asépticamente con instrumentos estériles. Para cada envase utilizar un instrumento estéril.

5.3.1.3 Cuando sea posible, mezclar bien el producto hasta que esté homogeneizado y, cuando no lo es, asépticamente, tomar alícuotas de diferentes sitios del recipiente hasta completar una cantidad no inferior a 100 g ó cm³.

5.3.1.4 Si se han de realizar diferentes tipos de análisis (microbiológicos, químicos, físicos y sensoriales), asépticamente tomar primero y por separado las unidades de muestra destinadas al análisis microbiológico. Para conservar estas muestras no se debe utilizar preservantes

5.3.1.5 Registrar la temperatura del aire de la sala de almacenamiento o del vehículo, tomar la muestra, luego, insertar el termómetro en el alimento del que se tomó la muestra y registrar su temperatura. Cuando el alimento está envasado en pequeños envases cerrados, registrar la temperatura del alimento en un envase adyacente en la misma caja de cartón o embalaje.

5.3.1.6 El tamaño de la muestra de población debe ser de 100 cm³ o gramos, mínimo. En muchos casos será el de la unidad de producción del lote como latas herméticamente cerradas conteniendo muchas veces la cantidad de alimento equivalente a la unidad de muestra, o envases muy pequeños de los que se necesitará tomar varios de ellos hasta completar los 100 g.

5.3.2 Procedimientos para tomar muestras

5.3.2.1 *Productos en envases pequeños.* Los alimentos, sean éstos líquidos, pastosos, sólidos o pulverulentos envasados en pequeños recipientes deben tomarse en su propio envase original, sin abrir.

- a) Las mantecas, margarinas, mantequillas que se encuentren en unidades de 250 o más g, dividir las en cuatro partes y tomar como muestras las dos cuartas partes opuestas. Si la unidad pesa menos de 250 g, tomar toda la unidad.
- b) De los quesos pequeños y de las porciones de queso envueltas y empacadas en envases pequeños tomar como muestra un queso completo y de las porciones, un número suficiente de ellas para que la muestra no sea inferior de 100 g.

5.3.2.2 *Productos a granel (bidones, tambores, etc.).*

a) *Productos líquidos.*

- a.1) Evitando contaminar el contenido, mezclar los productos líquidos cuidadosamente con un cucharón estéril o mecánicamente, hasta que el producto esté totalmente mezclado; inmediatamente después de la mezcla, con un cucharón estéril y asépticamente transferir a un envase estéril una cantidad no inferior a 100 cm³. Si es difícil obtener una buena homogeneización, de sitios apropiados del recipiente tomar varias submuestras de manera a obtener una muestra no inferior a 100 cm³ y que sea representativa del envase. Inmediatamente cerrar y etiquetar el frasco. Para tomar una muestra de un ducto de salida, primero dejar pasar las primeras fracciones del producto para limpiar la salida con el flujo y luego tomar la muestra, no menos de 100 cm³.
- a.2) En el caso de cremas, dar un número suficiente de golpes con el cucharón para asegurar una buena mezcla, sumergir el cucharón moviendo de un lado para otro con mucho cuidado para evitar la formación de espuma y de mantequilla. Tomar no menos de 100 cm³ de muestra.

(Continúa)

a.3) En el caso de leche condensada y evaporada mezclar muy cuidadosamente utilizando un agitador adecuado para raspar el material adherido a las paredes y al fondo del recipiente. Del contenido mezclado, trasladar de 2 a 3 litros a un recipiente más pequeño y agitarlo. Tomar no menos de 100 cm³ de muestra.

b) *Productos sólidos.*

b.1) En el caso de productos sólidos, cuando la capa superficial no hace parte de la muestra, retirarla del área de muestreo con una espátula, cuchillo o cuchara estériles, hasta no menos 5 mm de profundidad y tomar la muestra con otro instrumento estéril. Si el producto es un polvo, la capa superficial se retira antes de mezclar. Si el alimento está formado por capas o extractos, separadamente y evitando contaminar las partes tomar muestras de cada una en la misma proporción en que se encuentran en el producto original.

b.2) En el caso de mantecas, margarinas, mantequillas a granel y el producto está en bloque, y para que la muestra no sea inferior a 100 g, realizar dos sondajes o más introduciendo una sonda verticalmente en el centro del bloque. Si el producto se encuentra en barriles, incertar la sonda diagonalmente a través de la masa del producto desde el borde del barril sin que penetre en la superficie del fondo. En los dos casos, hacer girar la sonda una vuelta completa y retirar el material por completo. Sostener la punta de la sonda encima de la abertura del frasco estéril, y con un cuchillo o espátula transferir inmediatamente la muestra de la sonda en pedazos de aproximadamente 75 mm. Dejar una porción de aproximadamente 25 mm o más de largo para obturar el agujero dejado por la sonda. No permitir que estos productos entren en contacto con papel o superficies absorbentes (porcelana) del agua o grasa. Los productos congelados hasta el punto de resistir la presión de la sonda deben ser ablandados manteniéndoles por 24 h a 10°C.

5.3.2.3 *Productos a granel congelados.* Para muestrear estos productos utilizar brocas, saca bocados y otros instrumentos cortantes estériles. Los productos congelados deben mantenerse en su estado congelado hasta su llegada al laboratorio (ver 6.7). Se debe evitar descongelar y congelar nuevamente la muestra.

a) La toma de muestras de piezas o bloques de alimentos de gran tamaño se puede realizar de la siguiente manera: sobre el alimento asegurar, con la copa hacia arriba, un embudo plástico estéril con el vástago recortado por donde se introduce la broca estéril de un taladro. Las virutas del alimento son conducidas a la superficie y se acumulan en la copa del embudo. Transferir estas virutas a un frasco estéril para muestras. Inmediatamente identificar la muestra y acondicionarla para su envío al laboratorio.

5.3.2.4 *Toma de muestras de superficies vivas.* Utilizando un hisopo humedecido, frotar la superficie de la palma de una mano, la superficie interna de los dedos y de las uñas (ver 5.3.2.7 literal b.1). También se puede realizar mediante la técnica del lavado: colocar la mano dentro de una funda plástica, verter 50 cm³ de diluyente y frotar con el líquido las palmas, entre los dedos y uñas.

5.3.2.5 *Toma de muestras de superficies inertes.*

a) Botellas, envases, recipientes, utensilios pueden muestrearse mediante lavado, y si es posible, con hisopo (ver 5.3.2.7 literal b.1). Prestar especial atención a la porción de los utensilios que se introduce en la boca, por ejemplo, borde superior interno y externo de copas y vasos, porción cóncava de cucharas, etc. De los platos, la parte que entra en contacto con los alimentos.

(Continúa)



- b) La toma de muestras de superficies lisas puede realizarse con hisopo (ver 5.3.2.7 literal b.1) o con cilindros de agar. El cilindro de agar es un medio de agar estéril solidificado dentro de un tubo plástico estéril. Asépticamente, cortar uno de los extremos del cilindro, presionar la superficie de agar descubierta contra la superficie en estudio, con un escalpelo estéril cortar una rodaja y colocarla en una placa Petri, con la superficie sembrada hacia arriba. Identificar la muestra.
- c) Las superficies lisas también se pueden muestrear utilizando un portaobjeto (ver 5.3.2.7 literal b.3).

5.3.2.6 Toma de muestras destinadas al análisis de bacterias anaerobias. Evitar que las muestras que contienen bacterias anaerobias entren en contacto con el aire, por ejemplo, de los tejidos profundos no tomar muestras pequeñas. Si esto no es posible y si se utilizan hisopos, humedecer el hisopo en el medio de transporte de Stuart (medio reducido), ver NTE INEN 1529-1 y una vez tomada la muestra, colocar el hisopo en un tubo que contenga este medio.

5.3.2.7 Otros

a) **Quesos grandes.** En el caso de quesos grandes tomar de las diferentes partes suficientes submuestras, hasta completar una muestra de por lo menos 100 g. De los maduros, retirar la envoltura externa y dejar intacta la interna (costra, cera, películas plásticas o de tela en los quesos sin corteza). Dependiendo de la forma, la masa, el tipo y el grado de madurez del queso, utilizar una de las siguientes técnicas:

a.1) **Toma de muestras por medio de cortes.** Si el queso tiene una base circular, con un cuchillo con hoja puntiaguda, hacer dos cortes radiales a partir del centro del queso, y si tiene una base rectangular, hacer dos cortes paralelos con los lados. El tamaño de la pieza obtenida debe ser de tal manera, que una vez eliminada la capa superior incomible, la porción comestible restante no sea inferior a 100 g.

a.2) **Toma de muestras por medio de una sonda.**

a.2.1) En una de las superficies planas, por lo menos a 10 cm del borde, insertar oblicuamente hacia el centro una sonda estéril de 15 a 20 mm de diámetro, una o varias veces.

a.2.2) Insertar la sonda perpendicularmente por una de las superficies del queso hasta llegar, pasando por el centro, al lado opuesto.

a.2.3) Por la superficie vertical del queso, a igual distancia entre las dos superficies planas, insertar la sonda horizontalmente hasta el centro del queso.

a.2.4) De los quesos contenidos en barriles, cajas u otros recipientes de dimensiones grandes, o de los quesos que forman cubos grandes compactos, la muestra puede tomarse insertando la sonda oblicuamente, desde arriba hacia abajo, por el contenido del recipiente.

a.2.5) En el caso de quesos duros de grandes dimensiones, si el queso tiene envoltura interna, frotar con etanol al 70% (V/V) el sitio de muestreo e insertar una sonda estéril de 15 a 20 mm de diámetro. Girar la sonda una vuelta completa y retirar el pedazo. Si no se necesita una muestra de la superficie, guardar la parte exterior (mínimo 2 cm) que contiene la envoltura interna para obtener el agujero(s) hecho en el queso y el resto del pedazo(s) con un escalpelo o un cuchillo estériles transferir asépticamente al frasco de muestra. Repetir este procedimiento hasta obtener una muestra no menor de 100 g. Con los tapones, obturar los agujeros con cuidado, y si es posible, cubrir con un compuesto sellante adecuado, ver NTE INEN 1529-1.

(Continúa)

b) *Toma de muestras de canales vacunas y ovinas.* Muestrear las canales con una de las siguientes técnicas:

b.1) *Hisopos o torundas.* Con guantes estériles colocar la plantilla (ver 4.2.2) sobre la superficie que se va a muestrear. Tomar asépticamente un hisopo, abrir un tubo que contenga el diluyente adecuado, humedecer el hisopo y con movimientos rotatorios presionarlo contra las paredes del tubo para retirar el exceso de diluyente. Friccionar fuertemente el área de la superficie que se va a examinar, haciendo frotos paralelos con una ligera rotación del hisopo. Friccionar nuevamente la superficie haciendo trazos paralelos perpendiculares a los anteriores, repetir tres veces este proceso humedeciendo cada vez el hisopo. Cuidar que se frote toda el área elegida. Regresar el hisopo al tubo y con una tijera estéril o cualquier otro implemento cortar o quebrar el paliillo y dejar caer la cabeza dentro del tubo, tapar el tubo con la tapa de rosca y colocarlo en un envase a prueba de agua, acondicionar el envase con hielo picado o cualquier otro refrigerante disponible. Si el bastón no es de madera, agitar el hisopo en el tubo 10 veces hacia arriba y abajo. Identificar la muestra. Para realizar recuentos, utilizar la cantidad necesaria del diluyente para obtener una dilución inicial de 10¹.

b.2) *Toma de muestras por disección.* Con un escalpelo y pinza estériles tomar lonchas superficiales muy delgadas de aproximadamente 2 mm de espesor de la herida del sacrificio, región pectoral, costado, regiones sacra, anal, renal y cuello. De las canales de cerdo, tomar a partir del cuello y del área situada detrás de las orejas. Colocar las lonchas en el frasco para muestras. Tomar una muestra no menor de 100 g

b.3) *Toma de muestras con portaobjetos.* Este método se utiliza especialmente para recuentos directos. Presionar un portaobjeto estéril contra la muestra del alimento, identificar y dejar que se seque. Enviar al laboratorio donde se fija, tiñe y se observa al microscopio. Para determinaciones cualitativas rápidas de la microflora dominante proceder de la siguiente manera: después de presionado el porta contra la superficie de la carne aplicar el porta a la superficie de agar de una placa y retirarlo con una pinza estéril y luego incubar la placa.

6. ENVÍO DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO.

6.1 Enviar las muestras al laboratorio lo más rápido posible y en condiciones que reduzcan al mínimo la posibilidad de cambio de su calidad microbiológica y evitar que durante el transporte las muestras sean expuestas a la luz solar directa.

6.2 Manipular y empacar las muestras de modo que una manipulación posterior no pueda cambiar su identidad ni sugerir ninguna duda a cerca de su identidad.

6.3 Siempre que sea posible, se deben enviar las muestras al laboratorio en su envase original, sin abrir. Todas las muestras envasadas, para su envío deben empacarse con materiales que puedan absorber los golpes para evitar que sufran daños durante el transporte.

6.4 Los productos de vida comercial prolongada, no necesitan de precauciones especiales excepto, por ejemplo: evitar temperaturas por encima de 45°C para los productos enlatados (latas en su estado normal) y ambientes húmedos para los productos en polvo.

6.5 Las latas hinchadas se deben refrigerar y enviarlas acondicionadas con mucho papel y material amortiguador y material refrigerante.

(Continúa)

6.6 Los productos perecederos no congelados se enfrían hasta 0 a 5°C, sea en un refrigerador o más rápidamente en un baño de hielo (en fundas plásticas) y se los envía en recipientes isotérmicos, cubiertos con una bandeja que contenga suficientes fundas plásticas con hielo picado o una mezcla de polialcoholes congelados, para mantener la temperatura de 0 a 5°C hasta su llegada al laboratorio. No utilizar hielo suelto ya que si el envase se revienta o tiene fugas puede contaminar el producto. Si se utiliza hielo seco, acondicionar la muestra de manera que no entre en contacto con el hielo para evitar su congelamiento.

6.7 Productos congelados, las muestras de estos productos se deben recoger en recipientes pre-enfriados y colocarlos inmediatamente en un congelador, o en hielo seco. Enviar al laboratorio en un recipiente isotérmico, o en caja de cartón, con nieve carbónica (dióxido de carbono sólido). Evitar que las muestras congeladas, tomadas en fundas plásticas, entren en contacto directo con el hielo seco porque el plástico se torna friable y puede romperse. Utilizar papel u otro material adecuado para proteger la muestra. Como control que la muestra no se ha descongelado durante el transporte, colocar dentro del paquete un recipiente con trocitos de hielo que deben estar intactos a la llegada del paquete con las muestras.

6.8 Indicar claramente sobre el paquete si la muestra es peresible o no, la temperatura a que debe mantenerse, refrigerada en hielo seco, si es frágil, etc.

6.9 Enviar las muestras juntamente con el informe de la toma (ver 5.1.4).

7. RECEPCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO.

7.1 **Chequeo de las condiciones de las muestras.** Al recibir las muestras se debe observar los siguientes aspectos:

7.1.1 *Etiquetado e informe.* Chequear si cada muestra está debidamente sellada, etiquetada y acompañada de una copia del respectivo informe de la toma de muestras (ver 5.1.2 y 5.1.4).

7.1.2 *Estado de los envases.* Chequear cuidadosamente si el envase tiene defectos, tales como: fisuras, perforaciones, fugas, deformaciones; fracturas y tapas flojas en los de plástico; perforaciones en fundas plásticas.

7.1.3 *Control de la temperatura.* Anotar la temperatura de las muestras perecederas no congeladas. Las muestras congeladas deben llegar al laboratorio en su estado congelado, controlar si no ha habido descongelamiento (ver 6.7). Las muestras frescas perecederas deben tener una temperatura entre 0 a 5°C. Anotar cualquier discrepancia en la hoja de registro.

7.1.4 *Apego al programa de muestreo.* Verificar que el número de las muestras de población está conforme con el programa de muestreo utilizado.

7.2 **Almacenamiento de las muestras.** Las muestras deben almacenarse protegidas de cualquier contaminación, de la luz solar directa o de otras fuentes de calor y a las temperaturas que se indican:

7.2.1 Productos congelados, a -20°C, máximo hasta siete días.

7.2.2 Productos perecederos no congelados, entre 0°C y 5°C, por no más de 24 horas.

7.2.3 Productos estables: enlatados, productos deshidratados, etc., a temperatura ambiente en lugares secos y frescos, hasta siete días.

7.2.4 Productos misceláneos: enjuagues, hisopos, aguas de efluentes, entre 0°C y 4°C, hasta 12 h.

(Continúa)

8. PREPARACIÓN DE LA UNIDAD DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS

8.1 Generalidades. Implica la preparación en el laboratorio de una submuestra de modo que sea tan representativa como sea posible de la muestra de población de la cual procede.

8.1.1 Si es posible, realizar los ensayos de las muestras luego después de la recepción en el laboratorio. Las muestras deben manipularse asépticamente y de preferencia sin interrupciones, si éstas son inevitables, deben ser lo más cortas posible y el producto se debe mantener en refrigeración durante este período.

8.1.2 Antes de manipular la muestra limpiar el área de trabajo y sus proximidades, e inmediatamente desinfectar el área con etanol al 70% o con cualquier otro desinfectante.

8.1.3 En muchos casos la unidad de muestreo, sin preparación adicional alguna, puede utilizarse como unidad de muestra. Si se necesita mezclar dos o más unidades de muestreo para formar la unidad de muestra, transferir las unidades de muestreo a un recipiente estéril suficientemente grande y mezclar bien.

8.1.4 Antes de abrir cualquier envase, sean éstos rígidos o semirígidos, limpiar externamente el envase con jabón o detergente y agua, secarlos con papel toalla y, en las proximidades de la tapa o en el área donde se va a abrir el envase flamear (con o sin etanol al 70% v/v evitando sobrecalentamientos) o aplicar una mezcla desinfectante que se le deja secar sin aplicar calor; sin embargo, cuando el envase o el material del embalaje es muy delgado y no resiste el proceso de limpieza omitir este paso y desinfectar con mucho cuidado. Cuando el envase puede removerse sin riesgo alguno de contaminar el producto, entonces, la limpieza y desinfección del envase no son necesarias. Todas las manipulaciones, durante y después de la abertura deben realizarse en condiciones tan asépticas como posible y de preferencia sin interrupciones; utilizar una cámara de flujo laminar vertical, si es posible. Durante cualquier interrupción se debe mantener el producto bajo refrigeración. El intervalo entre la agitación de la muestra y la remoción de la unidad analítica no debe ser mayor de tres minutos, y se debe tener cuidado para eliminar, incluso, cualquier espuma de la unidad analítica.

8.1.5 Abrir los envases de lata por la tapa no codificada, cuidando de no dañar el doble cierre.

8.1.6 Al tomar muestras de latas abombadas deben observarse las siguientes precauciones a fin de disminuir la salida violenta del contenido:

8.1.6.1 Abrir las latas abombadas en sitios especiales y NUNCA deben abrirse en áreas destinadas a pruebas de esterilidad.

8.1.6.2 Antes de abrir, refrigerar la lata lavada y seca.

8.1.6.3 Colocar la lata en una bandeja poco profunda que contenga una mezcla desinfectante, ver NTE INEN 1529.1. Si se sospecha la presencia de *Clostridium botulinum*, la bandeja debe contener una solución saturada de carbonato de sodio.

8.1.6.4 Desinfectar la lata frotando una mezcla desinfectante y dejando secarse, pero, NUNCA aplicando calor.

8.1.6.5 Para tapar la lata, utilizar un embudo de vidrio que tenga el vástago largo y firmemente taponado con algodón hidrófilo, a través del cual pasa una varilla de acero con su extremidad inferior afilada (todo el aparato debe estar envuelto, y esterilizado). Cubrir la lata con el embudo y sobre la tapa de ésta hacer descansar el extremo afilado de la varilla, y luego, cuidadosamente, golpear la varilla.

8.1.6.6 Abrir la lata después que la presión ha descendido, y según proceda, continuar con uno de los procedimientos indicados a continuación:

(Continúa)

8.2 Procedimiento

8.2.1 Líquidos

8.2.1.1 Si el espacio de cabeza es lo suficientemente grande, se debe mezclar el producto agitando el envase 25 veces en 10 segundos haciendo un arco de 300 mm. Se puede utilizar un homogeneizador estandarizado para asegurar una distribución uniforme de los microorganismos.

8.2.1.2 Si el espacio de cabeza es pequeño, mezclar el producto invirtiendo el envase 25 veces y luego:

- a) retirar una porción de líquido hasta que haya suficiente espacio de cabeza y entonces mezclar mediante agitación (ver 8.2.1.1); o
- b) transferir la muestra completa, o un parte de ella, a un envase estéril de tamaño adecuado y agitando mezclar bien (ver 8.2.1.1). En el caso de muestras líquidas con gas, incorporar unas perlas de vidrio estériles y agitar.

8.2.2 *Polvos*. Seguir los procedimientos indicados en 8.2.1.1 y 8.2.1.2 utilizando una espátula estéril.

8.2.3 *Productos congelados*. Si las muestras están congeladas, utilizar una de los siguientes procedimientos:

8.2.3.1 Descongelarlas parcialmente en su recipiente original cerrado (o en el que llegó al laboratorio), por no más de 24 h en un refrigerador entre 2°C y 5°C. Cuando se necesitan más de 24 h para descongelar las muestras, se pueden colocar en un baño de agua a una temperatura menor de 37°C y se les mantiene solo hasta que se fundan (máximo hasta 15 minutos, pero, la temperatura debe permanecer baja para evitar lesionar a los microorganismos) o, a temperatura ambiente por no más de 1 hora.

8.2.3.2 Si la muestra congelada puede picarse fácilmente, el descongelamiento no es necesario.

8.2.3.3 Con productos fácilmente descongelables (productos obtenidos con taladro, por ejemplo: jujos congelados, huevos congelados, etc.), se les descongela en un baño de agua o a temperatura ambiente, según se indica en 8.2.3.1.

8.2.3.4 Los helados se funden según se indica en el numeral 8.2.3.1 (si se encuentran en su envase original primero se los transfiere a un frasco estéril con tapa). Mezclar bien la muestra fundida.

8.2.4 Mantequilla, margarinas y mantecas.

8.2.4.1 Colocar la muestra de mantequilla en el refrigerador (4°C ± 1°C), hasta que se torne dura y se pueda cortar.

8.2.4.2 Con utensilios estériles, dividir la muestra de mantequilla, margarina o manteca en tres partes y del centro de cada una de estas superficies (no contaminadas) que quedan expuestas, pesar la unidad analítica en un frasco y añadir el diluyente (ver 4.3.11) a 32°C, en un volumen necesario para completar, juntamente con la fase acuosa, dos veces la unidad analítica, por ejemplo: las mantequillas y margarinas que tengan una humedad de 16%, pesar 25 g de muestra y añadir 46 cm³ de diluyente; si se pesan 50 g, añadir 92 cm³.

8.2.4.3 En el caso de las mantecas añadir un volumen igual a dos veces la muestra: 25 g de muestra y 50 cm³ diluyente.

8.2.4.4 Colocar el frasco en un baño de agua a no más de 45°C y, evitando un calentamiento excesivo, agitar hasta que la muestra y el diluyente se mezclen completamente.

(Continúa)

8.2.4.5 Conservar el frasco en el baño de agua hasta que la materia grasa se separe de la fase líquida. Utilizar esta fase líquida para las determinaciones microbiológicas: 2 cm³ de este líquido corresponden a 1 g de muestra y 0,2 cm³ a 0,1 g. Continuar el ensayo según lo indicado en 9.2.1.2

8.2.5 *Mayonesa*. Preparar la muestra según lo indicado en 8.2.4

8.2.6 *Carnes y otros productos*. Cuando por su naturaleza, el producto en análisis puede causar dificultades si se homogeneiza directamente, entonces, antes de manipular, asépticamente proceder según 8.2.6.1 y/o 8.2.6.2

8.2.6.1 *Picado*. Colocar el material en una superficie estéril, cortar en cubos de 1 cm³ y continuar según lo indicado en 8.2.6.2.

8.2.6.2 *Trituración*. Colocar el material (picado o no) en un frasco estéril, adicionar el exudado que hubiere, mezclar, homogeneizar dos veces y continuar según lo indicado en 9.2.2.

8.2.7 *Canales de aves y productos misceláneos*. Anotar el peso de la muestra, colocar la canal en una funda plástica estéril y lavar con 300 cm³ de agua peptonada al 0,1% friccionando la superficie de la muestra durante 30 segundos. Aplicar este procedimiento a frutas secas, cereales, legumbres y ensaladas, lavando con una cantidad de diluyente 10 veces el peso de la muestra. Si es necesario, continuar como se indica en 9.2.1.3

8.2.8 *Hisopos o torundas*. Al tubo que contiene el hisopo juntamente con el diluyente (ver 5.3.2.7 literal b.1) y 5.3.2.4), agitarlo vigorosamente, haciendo 50 ciclos completos de 15 cm en 10 segundos golpeando contra la palma de la otra mano, para desprender los microorganismos de la superficie del hisopo. La dispersión obtenida se puede diluir decimalmente. Si es necesario, continuar como se indica en 9.2.1.3.

8.2.9 *Productos formados por capas*. Si el alimento está formado por capas o extractos, examinar una porción de 10 g del paquete completo o, separadamente, preparar una suspensión inicial de cada una de estas partes, dependiendo del propósito del ensayo. Preparar como se indica en 9.2.2.

9. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN INICIAL O DILACIÓN PRIMARIA Y OTRAS DILUCIONES

9.1 Generalidades.

9.1.1 El tamaño de la unidad muestra generalmente es 10 g ó 10 cm³ o un múltiplo de 10 y, debe ser tal, que permita realizar todos los ensayos requeridos.

9.1.2 Para la detección de *Salmonella*, en general, preparar la suspensión inicial con una unidad de muestra de 25 g (cm³) y 225 cm³ del diluyente indicado en la NTE INEN 1529-15. Si la unidad de muestra prescrita difiere de 25 g, utilizar la cantidad necesaria de diluyente para obtener una dilución de aproximadamente 1/10 (masa/volumen). Ver nota 5.

NOTA 5 Con el objeto de reducir la sobrecarga de trabajo en el laboratorio, y cuando hay evidencias de que la mixtura de dos o más unidades de muestra no afecta el resultado para aquel alimento particular, existe la alternativa de preparar unidades de muestra compuesta. El tamaño máximo de una unidad de muestra compuesta es de 375 g (15 unidades de muestra de 25 g). Por ejemplo, si es necesario analizar 10 unidades de muestra de 25 g, se mezclan las 10 unidades para formar una unidad de muestra compuesta de 250 g y se adicionan 2,25 litros del diluyente, ver NTE INEN 1529-15. Alternativamente, se puede preparar una muestra compuesta transfiriendo alícuotas de 0,1 cm³ de cada uno de los 10 cultivos de pre-enriquecimiento a un frasco que contenga 100 cm³ de caldo RV, o alícuotas de 10 cm³ a un frasco que contenga 1 litro de caldo selenito cistina o caldo tetrionato.

(Continúa)

9.1.3 Mezclar la unidad de muestra o porción de ensayo con un volumen de diluyente igual a nueve veces el peso de la unidad analítica. Si se obtiene una suspensión inicial demasiado viscosa o espesa adicionar más diluyente. Esto se debe tener en cuenta para las operaciones subsiguientes y/o expresión de resultados.

9.1.4 Para evitar lesionar a los microorganismos por cambios súbitos de la temperatura, la temperatura de los diluyentes debe ser aproximadamente la misma de la muestra, a menos que haya otra indicación.

9.1.5 La preparación de la suspensión inicial de algunos tipos de productos necesitan de cuidados especiales, tales como:

9.1.5.1 Calentar a temperaturas inferiores a 45°C por no más de 15 minutos productos como el cacao en polvo, gelatina, productos en polvo, mantecas, mantequillas. Para los quesos utilizar el diluyente a 44°C ± 1°C.

9.1.5.2 Neutralizar los alimentos ácidos con una solución estéril de fosfato tripotásico al 8%, antes de preparar la suspensión inicial.

9.1.5.3 Reconstituir los productos deshidratados y revitalizar a los microorganismos lesionados por los procesos de elaboración y almacenamiento de los productos alimenticios.

9.1.5.4 Para productos grasosos o pulverulentos que forman grumos adicionar al diluyente un agente humectante tal como el "Tergitol Aniónico 7" (1% m/v).

9.1.5.5 Cuando se va a realizar recuento de esporos, a la suspensión inicial, inmediatamente después de preparada, someterla a un tratamiento térmico (por ejemplo, 80°C por 10 minutos) seguido de un enfriamiento rápido en un baño de agua helada.

9.2 Suspensión inicial o dilución primaria (10^{-1})

9.2.1 *Líquidos*: Productos líquidos no viscosos (agua, leche, jugos, enjuagues, etc.) en los cuales los microorganismos se distribuyen homogéneamente o que fácilmente se los puede homogeneizar por medios mecánicos; fase líquida de mezclas heterogéneas que se considera que es lo suficientemente representativa de la muestra en conjunto (fase líquida de las grasa vegetales o animales) y productos líquidos viscosos.

9.2.1.1 Líquidos no viscosos, con una pipeta estéril transferir 10 cm³ a un frasco y añadir 90 cm³ de diluyente. Mezclar cuidadosamente esta solución agitando el frasco 25 veces en 10 segundos haciendo un arco de 300 mm, o aspirando 10 veces con una pipeta estéril, o utilizando un homogeneizador tipo "vortex" por 5 a 10 segundos. Seleccionar la velocidad de tal manera para que el líquido, en torbellino, suba hasta 2 o 3 cm del borde del vaso. Si se requieren otras diluciones, continuar según lo indicado en 9.3.

9.2.1.2 De las mantequillas y mantecas, de la fase líquida (ver 8.2.4.5) tomar 2 cm³ y añadir 8 cm³ de diluyente, se obtiene la dilución 10^{-1} . Para otras diluciones, continuar según lo indicado en 9.3.

9.2.1.3 Enjuagues, la solución de enjuague obtenida en los numerales 8.2.7 y 8.2.8 constituye la dilución primaria, siempre que, para el enjuague se utilice el volumen adecuado de diluyente (ver 5.3.2.7 literal b.1). Para otras diluciones, continuar como se indica en 9.3.

9.2.1.4 De los líquidos viscosos y helados fundidos (ver 8.2.3.4) pesar 10 g de muestra en 90 cm³ de diluyente y mezclar bien mediante agitación (para pesar, se puede utilizar una cuchara o una pipeta, dependiendo de la consistencia de la muestra). Para otras diluciones continuar según lo indicado en 9.3.

(Continúa)

9.2.2 Productos sólidos. (Ver notas 6)

9.2.2.1 Pesar con una precisión de 0,1 g en un frasco (si se utiliza homogeneizador rotatorio), o en una funda plástica (si se utiliza "stomacher") 10 g (o un múltiplo de 10 g) de la muestra de población o de la submuestra preparada. Añadir 90 cm³ de diluyente (o múltiplo de 90) a la temperatura adecuada (dilución 10⁻¹).

9.2.2.2 Hacer funcionar el homogeneizador a baja velocidad y en pocos segundos pasar a la velocidad entre 15 000 a 20 000 rpm. Cuidar escrupulosamente que el tiempo de homogeneización a alta velocidad no exceda los dos minutos. Para productos blandos o que forman mucha espuma es suficiente un minuto.

9.2.2.3 Hacer funcionar el "stomacher" 1 ó 2 minutos, según la naturaleza del producto (ver nota 6.2).

9.2.2.4 Si es necesario, dejar en reposo hasta 15 minutos para que las partículas grandes se sedimenten. Para preparar otras diluciones utilizar la capa superficial y si hay una capa de grasa, tomar de la parte acuosa.

9.3 Otras diluciones. (Ver nota 7)

9.3.1 Si la dilución primaria se homogeneizó con pipeta, utilizar la misma pipeta para transferir 1 cm³ de la suspensión inicial (dilución 10⁻¹) a otro tubo que contenga 9 cm³ de diluyente estéril a la temperatura adecuada, evitar que la pipeta entre en contacto con el diluyente y con otra pipeta estéril mezclar cuidadosamente. De esta manera se obtiene la dilución 10⁻².

9.3.2 Si es necesario, repetir lo indicado en el numeral 9.3.1 para la dilución 10⁻³ y siguientes diluciones, hasta obtener el número necesario de diluciones y alcanzar el número adecuado de microorganismos por cm³. Cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración.

9.4 Duración del procedimiento. El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y la mezcla de las diluciones con el medio de cultivo (descrito en el método específico de ensayo) no debe ser mayor que 45 minutos. El tiempo transcurrido entre la preparación de la suspensión inicial y el inicio de la preparación de las siguientes diluciones no debe exceder los 30 minutos.

9.5 Revitalización

9.5.1 Los microorganismos presentes en los alimentos pueden estar lesionados o debilitados debido a los tratamientos que se utilizan en el procesado de alimentos. Entre los tratamientos que lesionan a los microorganismos tenemos el calor, frío, desecación, liofilización, congelación, baja actividad de agua e irradiación. Los tratamientos químicos adversos como carencia de nutrientes, pH bajo, preservantes y exposición a desinfectantes.

NOTAS 6:

6.1 Con algunos productos no es aconsejable utilizar el "stomacher" (por ejemplo, los que tienen elementos puntiagudos o cortantes, o aquellos que no se disgregan fácilmente), pudiéndose utilizar siempre que haya evidencia (datos publicados o ensayos comparativos) que los resultados obtenidos no difieren significativamente de los obtenidos con un homogeneizador rotatorio.

6.2 Prestar atención al hecho que para determinados productos, en especial cereales, los tiempos de 1 y 2 minutos no son adecuados para microorganismos tales como los mohos y levaduras. En este caso el "stomacher" permite una mejor recuperación que el homogeneizador rotatorio. Hacer funcionar el "stomacher" por 10 minutos evitando separaciones, ya que se pueden perder algunos mohos y levaduras del líquido sobrenadante.

NOTA 7 Para las pruebas de presencia o ausencia de microorganismos en 0,1 cm³ ó 0,1 g de producto, no se necesita preparar las siguientes diluciones.

(Continúa)



NTE INEN 1 529-2

1999-02

9.5.2 El número de microorganismos que son detectados en los diferentes medios depende de la severidad y duración de las condiciones adversas, tipo de microorganismos presentes y la composición del medio utilizado, especialmente si es selectivo.

9.5.3 Cuando es necesario, los procedimientos de revitalización están incluidos en las secciones pertinentes de las NTE INEN 1529.

(Continúa)



ANEXO 7. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2051:1995. Granos y Cereales. Maíz molido sémola, harina, critz. Requisitos.

CDU: 664.7
ICS: 67.060

CIU: 3116
AG 05.04-413

<p>Norma Técnica Ecuatoriana Obligatoria</p>	<p>GRANOS Y CEREALES. MAÍZ MOLIDO, SEMOLA, HARINA, CRITZ. REQUISITOS.</p>	<p>NTE INEN 2 051:1995 1995-09</p>
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma establece los requisitos que deben cumplir: el maíz entero molido, la sémola, harina, critz del maíz desgerminado, para consumo humano, alimento zootécnico y uso industrial.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 Esta norma no se aplica a las, sémolas instantáneas, harinas y sémolas enriquecidas, harinas utilizarse como coadyuvantes de cervecería, y las destinadas a la fabricación de almidón, harinas precocidas.</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Aflatoxina. Grupo de metabolitos altamente tóxicos, producidos por algunas cepas de los hongos relacionados con el deterioro de los alimentos.</p> <p>3.2 Maíz molido infestado. Maíz molido que contiene insectos vivos en cualquiera de sus estados biológicos.</p> <p>3.3 Maíz dañado por hongos. Maíz que ha sufrido deterioro en su estructura debido a la acción de hongos.</p> <p>3.4 Maíz molido. Es el producto de la molturación del grano entero.</p> <p>3.5 Harina de maíz. Alimento que se obtiene de granos de maíz <i>Zea mays</i>, con madurez comercial, en buen estado, mediante el procedimiento de molturación, en el que se tritura el grano hasta obtener un grado de finura, y eliminando gran parte del salvado y del germen.</p> <p>3.6 Sémola. Alimento que se obtiene de granos de maíz <i>Zea mays</i>, con madurez comercial, en buen estado, mediante el procedimiento de molturación, en el que se tritura el grano hasta obtener un grado de finura, y eliminando gran parte del salvado y del germen.</p> <p>3.7 Gritz. Es el producto de la molturación del grano de maíz desgerminado.</p> <p>3.8 Otras definiciones constan en la NTE INEN 2 050.</p> <p style="text-align: center;">4. REQUISITOS</p> <p>4.1 Maíz molido. Requisitos específicos.</p> <p>4.1.1 Se considera maíz en grano molido cuando el 100% de la masa (peso) total del producto molturado, no pasa a través del tamiz INEN 1,18 mm (ASTM número 16). NTE INEN 154.</p> <p style="text-align: right;">(Continúa)</p> <p>DESCRIPTORES: Alimentos, cereales, granos, harina, sémola, requisitos.</p>		

Instituto Ecuatoriano de Normalización INEN – Casilla 17-01-3999 – Baquerizo Moreno Es-29 y Almagro – Quito-Ecuador – Prohibida la reproducción

4.1.2 Se permite como máximo el 5% de granos de otros colores, cuando se trate de maíz molido amarillo o de otros colores; en tanto que para el caso de maíz molido blanco, no se aceptará más del 2% de maíz de otros colores.

4.1.3 El maíz molido debe cumplir con los requisitos que se establecen en la tabla 1.

TABLA 1. Requisitos del maíz entero molido

REQUISITOS	% MINIMO	% MAXIMO	MÉTODO DE ENSAYO
HUMEDAD	—	13	NTE INEN 1 513
PROTEINA	8	—	NTE INEN 543
GRASA	3,5	—	NTE INEN 523
CENIZA	—	2	NTE INEN 520
FIBRA	—	2,5	NTE INEN 522

4.1.4 No se aceptará maíz molido infestado.

4.1.5 El maíz molido, debe sujetarse a las normas establecidas por la FAO/OMS, en cuanto tiene que ver con los límites de recomendación de plaguicidas y productos afines y metales pesados, hasta tanto se elaboren las regulaciones ecuatorianas correspondientes.

4.1.6 El contenido máximo de aflatoxinas será de 20 microgramos por kilogramo (20 ppb), y será determinado según lo establecido en la NTE INEN 1 563

4.1.7 El maíz molido debe estar libre de olores a moho, fermento, agroquímicos, o cualquier otro que pueda considerarse objetable.

4.1.8 El porcentaje máximo de impurezas será el 1%.

4.2 Sémola, harina, griz. Requisitos específicos.

4.2.1 La sémola, harina, griz del maíz desgerminado, deben cumplir con los requisitos que se establecen en la tabla 2.

4.2.2 El tamaño del gránulo de acuerdo a las siguientes especificaciones:

4.2.2.1 *Sémola*. Cuando mínimo el 95% del producto pase el tamiz de malla INEN 2 mm (10 ASTM) y no más del 20% pase el tamiz INEN 710 μ m (25 ASTM).

4.2.2.2 *Harina de maíz*. Cuando mínimo el 98% del producto pase el tamiz de malla INEN 300 μ m (50 ASTM), ó mínimo el 50% del producto pase el tamiz de malla INEN 212 μ m (70 ASTM).

4.2.2.3 *Griz para hojuelas*. Cuando mínimo el 95% del producto pasa a través de un tamiz de malla INEN 2 mm (10 ASTM), y no más del 20% pasa a través de un tamiz de malla INEN 710 μ m (25 ASTM).

(Continúa)



TABLA 2. Requisitos de la sémola, harina, gritz del maíz

Requisito \ Producto	SÉMOLA	HARINA	GRITZ	MÉTODO DE ENSAYO
PROTEINA % mínimo	8,0 *	8,0*	8,0*	NTE INEN 519
HUMEDAD % máximo	12,0	13,0	12,0	NTE INEN 518
CENIZA % máximo	1,0*	1,0*	1,0*	NTE INEN 520
GRASA % máximo	2,0*	2,0*	2,0*	NTE INEN 523
FIBRA % máximo	1,0	1,0	1,0	NTE INEN 522
* Ceniza, grasa: en base seca * Proteína: N x 6,25				

4.3 **Requisitos microbiológicos.** La sémola, harina, gritz del maíz desgerminado deben cumplir con los requisitos que se establecen en la tabla 3.

TABLA 3. Requisitos microbiológicos

Requisitos	Unidad	Limite máximo	Método de ensayo
Aerobios mesó filis	ufc*/g	100 000	NTE 1 529
E. coli	ufc/g	0	NTE 1 529
Mohos y levaduras	ufc/g	500	NTE 1 529
Salmonella	ufc/25g	0	NTE 1 529
Coliformes	ufc/g	100	NTE 1 529
* ufc= unidades formadoras de colonias.			

4.3.1 Para la aceptación de lotes de la sémola, harina, gritz del maíz desgerminado, se debe cumplir con los requisitos microbiológicos del Anexo A.

4.4 **Antioxidantes.** Se podrá agregar como antioxidantes por ejemplo: ácido ascórbico máximo 200 mg/kg; azodicarbonamida, máximo 45 mg/kg, etc., y los que permita el CODEX ALIMENTARIUS, en tanto se elaboren las Normas INEN correspondientes.

(Continúa)



4.5 La sémola, harina, griz del maíz desgerminado, deben sujetarse a las normas establecidas por la FAO/OMS, en cuanto tiene que ver con los límites de recomendación de plaguicidas y productos afines, y metales pesados, hasta tanto se elaboren las regulaciones ecuatorianas correspondientes.

4.6 El contenido máximo de aflatoxinas será de 20 microgramos por kilogramo (20 ppb), y será determinado según lo establecido en la NTE INEN 1 563

4.7 La sémola, harina, griz del maíz degerminado deben estar libre de olores a moho, fermento, agroquímicos, o cualquier otro que pueda considerarse objetable.

4.8 La sémola, harina, griz del maíz degerminado no deberán estar infestados.

5. REQUISITOS COMPLEMENTARIOS

5.1 La bodega de almacenamiento debe presentarse limpia, desinfectada, tanto interna como externamente, protegida contra el ataque de roedores y pájaros.

5.2 Cuando en la bodega de almacenamiento se asperje plaguicidas, se deberán utilizar los permitidos por la Ley 73 de plaguicidas y productos afines.

5.3 Los envases destinados a contener maíz molido, sémola, harina, griz deberán estar almacenados sobre palets (estiba).

6. INSPECCIÓN

6.1 Muestreo.

6.1.1 El muestreo se efectuará de acuerdo a lo establecido en la NTE INEN 1 233.

6.1.2 *Aceptación o rechazo.* Si la muestra ensayada no cumple con uno ó más de los requisitos establecidos en esta norma, se considerará no clasificada. En caso de discrepancia se repetirán los ensayos sobre la muestra reservada para tales efectos.

7. ENVASADO

7.1 El maíz molido, la sémola, harina y griz, destinados para consumo humano, alimento zootécnico y uso industrial, deben ser comercializados en envases, que aseguren la protección del producto contra la acción de agentes externos que puedan alterar sus características químicas o físicas; resistir las condiciones de manejo, transporte y almacenamiento.

8. ETIQUETADO

8.1 Los envases destinados a contener maíz molido, sémola, harina, griz serán etiquetados de acuerdo a lo establecido en la NTE INEN 1 334.

(Continúa)

ANEXO A

TABLA A.1 Requisitos microbiológicos de la sémola, harina, griz (lotes).

REQUISITOS	UNIDAD	LÍMITE				METODO DE ENSAYO
		n	c	m	m	
REP	ufc/g	5	3	10^5	10^6	NTE 1 529
E. coli	ufc/g	5	2	0	-	NTE 1 529
Mohos y levaduras	ufc/g	5	2	5×10^2	10^3	NTE 1 529
Salmonella	ufc/25g	5	0	0	-	NTE 1 529
Coliformes	ufc/g	5	2	10^2	10^3	NTE 1 529

En donde:

- n = número de muestras de lote que deben analizarse.
 c = número de muestras defectuosas aceptables.
 m = límite de aceptación.
 M = límite de rechazo.
 ufc = unidades formadoras de colonias

(Continúa)



GLOSARIO

ALEURIOSPORA: espora (conidio) producida por un corto pedículo al final de un filamento no diferenciado.

ALEURONA: conjunto de gránulos protéicos presentes en las semillas de diversas plantas, generalmente localizados en la parte externa del endospermo.

ALÍCUOTA: una porción.

ANELIDE: célula conidiógena que forma anelosporas.

ANELOSPORA: espora que al producirse deja cicatriz en anillo.

ASCA: estructura en forma de saco que contiene ascosporas.

ASCOCARPO: cuerpo fructífero sexual que contiene ascas.

ASCOSPORA: espora sexual contenida en las ascas, por lo general de 4 a 8.

ASEXUAL: que se reproduce por mitosis.

ATERCIOPELADO: poco micelio aéreo, con textura de terciopelo.

AXILAS DE HOJAS: angulación formada entre un tallo y el peciolo de la hoja.

BASIPÉTALO: que produce esporas en la base; el conidio más viejo es el más distal.

BIVERTICILADO: con dos o tres niveles de ramificaciones debajo de las fiálides, como en *Penicillium*.

BRÁCTEA: hoja modificada que rodea la flor.

CLAMIDOSPORA: célula resistente, grande, y de pared gruesa, puede ser intercalar o terminal.

CLAVIFORME: con forma de porra, ensanchándose gradualmente hacia el ápice, que es redondeado.

CLEISTOTECIO: ascocarpo cerrado, es un cuerpo fructífero sexual oval o redondo.

COLONIA: crecimiento del hongo.

COLUMELA: invaginación del esporangióforo dentro del esporangio, tiene forma de domo.

CONIDIO: espora externa asexual, se forma en las hifas o en el conidióforo.

CONIDIÓFORO: hifa especializada que produce esporas o conidios.

CONIDIÓGENO: que produce conidios.



COREMIO: conjunto de filamentos con esporas.

DESHUMIDIFICACIÓN: proceso de retirar el vapor de agua contenida en el aire, llamada también humedad.

DESHUMIDIFICADOR: aparato utilizado para realizar el proceso de deshumidificación.

ENDOSPERMO: tejido interno de las semillas.

EQUINULADA: provisto o cubierto de espinas o aguijones de pequeño tamaño.

ESCLEROCIO: masa de hifas que acumula sustancias de reserva.

ESPIGA: conjunto de flores hermafroditas que aparecen dispuestas a lo largo de un tallo común.

ESPORA: forma de reproducción sexuada o asexuada, interna o externa.

ESPORANGIO: que contiene las esporangiosporas.

ESPORANGIÓFORO: hifa especializada donde se desarrolla un esporangio.

ESPORANGIOSPORA: espora asexuada producida en un esporangio.

ESPORODOQUIO: masa de conidióforos cortos y estrechamente ramificados que nacen directamente de una maraña de hifas.

ESTILO: en el carpelo diferenciado, prolongamiento filiforme del ovario, que termina en el estigma.

ESTÍPITE: prolongación más o menos corta que soporta un ascocarpo y lo eleva del sustrato.

ESTOLÓN: hifa aérea que desarrolla rizoides cuando tiene contacto con la superficie del medio de cultivo, a menudo hay un nudo en este punto.

FASCICULADA: raíces que no tienen una raíz principal. Todas presentan, más o menos, el mismo grosor.

FIÁLIDE: conidióforo con reproducción asexuada por fialosporas.

FIALOSPORAS: espora producida por fiálides.

FORRAJE: hierba o pasto seco que se da al ganado.

FUNÍCULO: cuerda de hifas de las cuales surgen, a intervalos, los conidióforos.

FUSIFORME: en forma de huso.

GAMETANGIOS: célula que contiene los gametos (célula sexual) o funciona en lugar de éstos.

GERMEN: parte de la semilla de que se forma la planta.



GERMINAR: brotar y comenzar a crecer las plantas.

GERMOPLASMA: conjunto de genes que se transmite por la reproducción a la descendencia por medio de gametos o células reproductoras.

GIMNOTECIO: equivalente al cleistotecio.

GLOBOSA: redonda.

GORGOJOS: nombre común de numerosos insectos coleópteros que atacan las semillas de cereales y legumbres.

GRANULOSA: áspera, con aspecto de gránulos de azúcar por la presencia de conidios en la superficie de la colonia.

HETEROTÁLICA: reproducción sexuada entre dos hifas diferentes pero compatibles.

HIFA: filamentos de un hongo, muchas constituyen un micelio.

HIFA AÉREA: hifa sobre la superficie del agar.

LEVADURA: grupo heterogéneo de hongos que se reproducen por gemación.

MACROCONIDIO: conidio multicelular producido por aleuriosporas.

MESOCONIDIO: conidio de tamaño intermedio en *Fusarium*.

MÉTULA: ramificaciones estériles debajo de las fiálides en aspergílaceas como *Penicillium*.

MICELIO: conjunto de hifas.

MICOTOXINAS: son metabolitos fúngicos cuya ingestión, inhalación o absorción cutánea reduce la actividad, hace enfermar o causa la muerte de animales y personas.

MICROCONIDIO: conidio pequeño unicelular, que se produce por aleuriosporas.

MONOVERTICILADO: tiene un solo conjunto de células conidiógenas.

OSTIOLO: poro del peritecio, abertura para liberar las esporas.

PANÍCULAS: tipo de inflorescencia compuesta, se trata de un racimo de racimos.

PARÁSITOS FACULTATIVOS: aquellos que son capaces de reproducirse, desarrollándose sobre substratos inertes.

PELAGRA: enfermedad que se presenta cuando una persona no obtiene suficiente niacina (una de las vitaminas del complejo b) o triptófano (un aminoácido).

PERICARPIO: cubierta de las semillas, formada por las paredes del ovario.



PERITECIO: ascocarpo con ostiolo.

PIRIFORME: en forma de pera o lágrima.

PLECTÉNQUIMA: conjunto de hifas entrelazadas que se asemejan a un tejido.

PLEOMORFISMO: que tiene más de una forma.

PODER DE GERMINACIÓN: capacidad de la semilla para producir plantas vigorosas.

PSEUDOPARENQUIMA: hifas que han perdido su individualidad.

PUBESCENCIA: vellosidad.

PUREZA FÍSICA: sin la presencia de malezas, piedras, tierra, semillas de otros cultivos y otras impurezas.

PUREZA VARIETAL: no debe poseer semillas deformes ni de otras variedades.

RADICULAR: conjunto de raíces de una planta.

RAMAS: ramificaciones debajo de las râmulas.

RÂMULAS: ramificaciones debajo de las métulas.

RIZOIDE: hifa ramificada que recuerda una raíz.

SEPTADO: que tiene tabiques transversales.

SURCADO: consiste en abrir la tierra, y formar surcos o lomos.

TELEOMORFO: estadio reproductivo sexual.

TENDALES: conjunto de cosas tendidas para que se sequen, especialmente frutos.

UNISERIADO: en *Aspergillus*, una vesícula con una sola hilera de fiálides.

VERTICILADO: que tiene verticilos.

VERTICILO: conjunto de células conidiógenas con un punto común.

VESÍCULA: parte dilatada de una hifa o célula dilatada, parte final de un conidióforo (*Aspergillus*) o esporangióforo.

ZIGOSPORA: espora originada por unión de dos gametangios similares.

ZURO: corazón o raspa de la mazorca del maíz después de desgranada.