

CIENCIA 22(4), 197 - 204, 2014
Maracaibo, Venezuela

Mohos y levaduras en queso artesanal semiduro expedido en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela

Zoraida Medina^{1,*}, Yasmina León-Montero¹, María Delmonte², Priscila Fernández²,
Ricardo-Alonso Silva-A¹ y Astrid Salcedo¹

¹Unidad de Investigaciones en Microbiología Ambiental, Facultad Experimental de Ciencias,
Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

²Laboratorio de Micología, Facultad de Medicina,
Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 03-07-14 Aceptado: 21-11-14

Resumen

El queso es un producto alimenticio con alto valor nutritivo el cual resulta un sustrato ideal para el crecimiento de hongos. El objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de mohos y levaduras en cincuenta muestras de quesos artesanales semiduros procedentes de mercados ambulantes y charcuterías ubicados en cinco zonas de la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. Para la preparación e identificación de las muestras se siguió el protocolo de normativas COVENIN 1126-89 y COVENIN 1337-90. En las muestras analizadas, los valores cuantificables de levaduras oscilaron entre $2,5 \times 10^6$ y $3,2 \times 10^7$ UFC/g, encontrándose por encima del criterio establecido en la normativa COVENIN 3821: 2003, en tanto que el nivel cuantificable de mohos estuvo dentro del límite permisible (1×10^2 UFC/g y 1×10^3 UFC/g). En relación al género micelial aislado en mayor prevalencia correspondió a *Penicillium* (57,54%) seguido por *Aspergillus* (24,75%) *Cladosporium* (10,87%), *Drechslera* (3,20%) *Aureobasidium* (2,85%) y *Curvularia* (0,78%), mientras que en las levaduras se reportó el 100% del género *Candida*. Se hace necesario realizar estudios que permitan la identificación de especies de hongos miceliales y la posible producción de micotoxinas ya que esto asegura la inocuidad alimentaria al consumidor.

Palabras clave: mohos, levaduras, queso artesanal, inocuidad alimentaria.

Mold and yeast in traditional semi-hard cheese city expended on Maracaibo, Zulia State

Abstract

Cheese is an alimentary product with high nutritious value that results in a ideal substrate for fungi growth. The aim of this investigation was to determine the presence of mold and yeasts in fifty samples of hand-made hard cheese from markets and delicatessens located in five zones of Maracaibo city, Zulia state, Venezuela. Preparation and identification of the samples was done by the protocol of COVENIN 1126-89, and COVENIN 1337-90. In analyzed samples, values of yeasts oscillated between $2,5 \times 10^6$ and $3,2 \times 10^7$ CFU/g, being above the criterion estab-

* Autor para la correspondencia: zoraidamedina@hotmail.com

lished in the normative COVENIN 3821: 2003, whereas quantification of mold was permissible (1×10^2 CFU/g and 1×10^3 CFU/g). Taxonomical identification showed the prevalence of *Penicillium* (57.54%) followed by *Aspergillus* (24.75%) *Cladosporium* (10.87%), *Drechslera* (3.20%) *Aureobasidium* (2.85%) and *Curvularia* (0.78%), whereas in the yeasts 100% corresponded to *Candida*. It is necessary more studies that allow the identification of species of fungi and the possible production of micotoxins since this ensures the alimentary safety to the consumer.

Keywords: Molds, yeasts, hand-made cheese, alimentary safety.

Introducción

Los mohos son hongos filamentosos multicelulares cuyo crecimiento en la superficie de alimentos se reconoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso, a veces pigmentado. Se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente además de formar parte de la flora normal de los alimentos, flora transitoria en espacios dérmicos del humano y como contaminantes en equipos mal sanitizados. Las levaduras por su parte son hongos no filamentosos, constituidos por una sola célula cuya morfología es diversa además de encontrarse presente de forma abundante en suelos, frutas, verduras y otros alimentos. Algunos géneros de mohos y levaduras son útiles en la elaboración de alimentos en tanto que otros pueden causar descomposición (1).

La composición nutricional de los quesos, así como las condiciones de maduración y conservación, hacen que éste constituya un sustrato ideal para el crecimiento de estos microorganismos (2).

Los mohos y sus esporas se transportan a través del aire hasta la superficie de los quesos y las características de este sustrato hacen que proliferen con facilidad, siendo el desarrollo de los mismos responsable de la aparición de manchas coloreadas, olores y sabores indeseables, así como cambios en su textura (3). Por otra parte, las levaduras también afectan la calidad de los quesos mediante la producción de fructificaciones, sabores levaduriformes indeseables, y una textura desagradable, causando graves perjuicios económicos a los queseros debido al cepillado del producto, disminución del valor comercial o rechazo total del mismo (4).

Los agentes fúngicos prevalentes en los quesos corresponden al género *Aspergillus* y *Penicillium*, los cuales son considerados por muchos investigadores agentes contaminantes y productores de micotoxinas, que al no ser controlados en productos de consumo masivo pueden poner en riesgo la salud del consumidor, considerándose de esta forma un problema de salud pública sobre todo en aquellos productos alimentarios que no cumplen con un control de sanidad requerido (4, 5).

El objetivo de esta investigación se basó en determinar la presencia de mohos y levaduras en muestras de quesos artesanales semiduros expendidos en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

Materiales y métodos

Área de estudio

Las muestras se obtuvieron de mercados ambulantes y charcuterías distribuidas en distintos puntos en la ciudad de Maracaibo, municipio Maracaibo, estado Zulia, Venezuela.

Muestras

Por un lapso de tres meses (marzo-mayo 2012) se colectaron en mercados ambulantes y charcuterías cincuenta muestras de quesos artesanales de tipo semiduro en cinco zonas de ventas (identificadas con números latinos que van desde el I hasta la V respectivamente) y con distribución equidistante en la ciudad de Maracaibo, que posterior a su colecta, se colocaron en una cava provista de

hielo para su conservación, almacenamiento y traslado al laboratorio para su respectivo análisis (no mayor a las 6h) (6).

Procesamiento de las muestras

Se pesaron 25 g de queso en una placa de Petri estéril, y se colocaron en un frasco con 225 mL de agua peptonada (Himedia, India) al 0,1%, el cual se homogenizó a alta velocidades en una licuadora por un lapso de 60 seg. Posterior, a la suspensión (dilución primaria), se tomó 1mL y se transfirió a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua peptonada al 0,1%; se agitó y se repitió ésta operación para obtener soluciones decimales de hasta 10^{-4} (6).

Control de ambiente

Se colocaron durante la incubación de las muestras tres placas de ambiente con medio de cultivo agar papa dextrosa (Difco, USA) abiertas por un lapso de tiempo de 10 minutos, para luego ser incubadas a 25°C durante 3 y 7 días y de la misma forma, se colocaron tres placas cerradas con el mismo medio durante la incubación de las muestras como control de calidad.

Recuento de mohos y levaduras

Se colocó 1mL de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} en placas de Petri por duplicado, se adicionó 20 mL de agar papa dextrosa (PDA) (Difco/USA) acidificado con 0,2 mL de solución estéril de ácido tartárico al 10%. Las placas se incubaron en oscuridad a 25°C durante 3 días para el crecimiento de levaduras y 7 días para el crecimiento de mohos (7).

Lectura de los resultados

Se contaron aquellas placas que contenían entre 10 y 100 colonias de mohos y levaduras por separado, calculando las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo, lo cual se realizó multiplicando el número de UFC encontradas en una placa representa-

tiva, por el factor de la dilución correspondiente (7).

Obtención de cultivos puros

Posterior al recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se procedió a realizar un sub-cultivo de las mismas en medio PDA (Difco/USA), sometiéndolo a las mismas condiciones de incubación, esto con la finalidad de obtener cultivos puros(8).

Identificación

Para el examen macroscópico en la identificación del género se procedió a la observación de los cultivos puros, tomando a consideración superficie, diámetro, color anverso y reverso, textura y pigmentación (8). En tanto que para el examen microscópico se siguió el protocolo establecido por Barrón's (9) detallando las estructuras del agente fúngico (micelial y levaduriforme) mediante la técnica de cinta adhesiva con suspensión en azul de lactofenol.

Resultados y discusión

Se encontró un alto recuento de levaduras en todas las muestras analizadas (Tabla 1), con un promedio mínimo de $4,5 \times 10^6$ UFC/g y un máximo de $3,2 \times 10^7$ UFC/g, en tanto que para el recuento de mohos no se observó diferencia significativa ($p = 0,001$) (tabla 1).

En relación a las levaduras, los valores se encontraron por encima a lo establecido en la normativa COVENIN 3821: 2003 correspondiente a quesos blancos, la cual establece como criterio máximo 1×10^3 UFC/g, en tanto que para el recuento de mohos, los valores obtenidos se encontraron dentro de los límites permisibles, ya que la misma normativa establece como nivel cuantificable en mohos un valor mínimo de 1×10^2 UFC/g hasta un máximo de 1×10^3 UFC/g.

En la zona I, IV y V se obtuvo un alto nivel cuantificable de levaduras (tabla 1), esto

Tabla 1
Valores promedio de recuentos de mohos y levaduras

Zona de muestreo	Promedio de UFC/g de levaduras	Promedio de UFC/g de mohos
I	$1,4 \times 10^7$	$4,1 \times 10^2$
II	$5,1 \times 10^6$	$1,8 \times 10^2$
III	$4,5 \times 10^6$	$4,2 \times 10^2$
IV	$3,2 \times 10^7$	$2,3 \times 10^2$
V	$1,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^2$

UFC= Unidades Formadoras de Colonias.

debido a las condiciones en que era presentado el producto para la venta. En la zona I, los quesos se encontraban dispuestos sobre unas mesas de madera expuestos de forma continua al ambiente sin ninguna cubierta que los protegiera del entorno ambiental y sin ningún tipo de refrigeración, además en el piso de este mercado ambulante se visualizó daño en la red de aguas negras observándose desbordamiento del agua hacia la superficie. En las zonas IV y V el queso de venta, se encontraba sobre mostradores y en el interior de una pecera respectivamente también sin refrigeración, finalmente en las zonas II y III la presentación del producto se visualizó en condiciones más higiénicas y bajo refrigeración.

Las placas utilizadas para el control de ambiente, no mostraron crecimiento micelial ni levaduriforme, demostrando que la contaminación proviene directamente del queso y no del ambiente del laboratorio.

(11), En el año 2012, en la ciudad de Maracaibo, se evaluaron dos marcas comerciales de queso tipo palmita (A y B) obteniendo valores promedios para levaduras de $2,5 \times 10^4$ y $2,7 \times 10^4$ UFC/g y para mohos de $2,3 \times 10^3$ y $2,5 \times 10^3$ UFC/g (10), siendo el valor de las levaduras superior a los criterios establecidos en la normativa COVENIN 3821:03 para queso blanco. Estos resultados son comparables con los obtenidos en esta

investigación donde el nivel de cuantificación de levaduras fue superior al de mohos. De forma similar, en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INH) se evaluaron 512 muestras de quesos blancos procedentes de distintas zonas del país, en las cuales se incluyeron muestras de queso: duros, semiduros, blandos, criollos, llaneros, de cincho y pasteurizados y registraron valores superiores en relación a la cuantificación de levaduras (superior a $3,0 \log$ UFC/g) en tanto que para los mohos fue menor a $3,0 \log$ UFC/g, permitiendo establecer de esta forma que las levaduras se presentan en mayor nivel cuantificable que los mohos en el queso (12).

Los productos lácteos representan un entorno específico para el crecimiento y selección de diferentes especies de levaduras, estas se detectan normalmente en grandes cantidades en los productos lácteos que reflejan una buena adaptación a un sustrato rico en proteínas, lípidos, azúcares y ácidos orgánicos (13).

Según los resultados obtenidos en este estudio las levaduras predominaron debido a que son capaces de crecer en sustratos con alta concentración de sal, a baja temperatura, bajo pH y actividad de agua (8, 13, 14).

La contaminación de los productos lácteos, especialmente en quesos es causada por mohos y levaduras presentes en el entorno de las fábricas de queso, al igual que

las paredes y los estantes de las cámaras de maduración, el aire, equipos, agua, leche, salmuera, entre otros (15-17).

Los exámenes macroscópicos y microscópicos realizados en este estudio permitieron identificar seis géneros de mohos: *Penicillium* (57,54%) *Aspergillus* (24,75%) y *Cladosporium* (10,87%) mientras que los géneros de menor incidencia correspondieron a *Drechslera* (3,20%), *Aureobasidium* (2,85%) y por último el género *Curvularia* (0,78%) (figura 1)

En la zona I los géneros encontrados correspondieron a *Penicillium* (64,71%), *Aspergillus* (21,56%); *Cladosporium* (5,88%) *Drechslera* y *Curvularia* (3,92% para cada una). En la zona II los géneros aislados a nivel porcentual fueron *Cladosporium* (48,48%), *Aspergillus* (24,24%), *Penicillium* (15,15%) y *Drechslera* (12,12%). En la zona III fue *Penicillium* con un abordaje porcentual de 78,72% y *Aspergillus* con un 21,27%. En la zona IV el género predominante fue *Aspergillus* con un 64,31% seguido de *Penicillium* (35,68%). Finalmente en la zona V el género de mayor incidencia fue similar al de la zona III donde correspondió a *Penicillium* con 80,00% seguido de *Aureobasidium* (14,28%) y *Aspergillus* (5,71%) (tabla 2)

En las zonas I, III y V predominó el género *Penicillium*, resultados que coinciden con

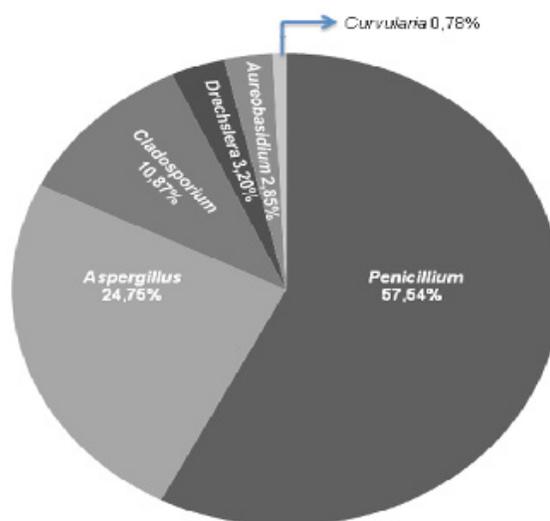


Figura 1. Porcentaje general de los géneros aislados en muestras de queso artesanal semiduro ubicados en 5 zonas del municipio Maracaibo, estado Zulia.

un estudio realizado en Arzúa por Vásquez y col., en el 2001 donde evaluaron aspectos cualitativos de contaminantes fúngicos, aislados en diferentes sustratos: ambientales, superficie de locales de fabricación, cámaras de maduración y muestras de quesos semi-artesanales, en la cual se identificaron 410 cepas del género *Penicillium* y 120 cepas del género *Aspergillus*, siendo estos últimos de marcada importancia por su relación con la

Tabla 2

Géneros aislados en las cinco zonas de muestreo ubicadas en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia

Género	(I) %	(II) %	(III) %	(IV) %	(V) %
<i>Penicillium</i>	64,71	15,15	78,72	35,69	80,00
<i>Aspergillus</i>	21,56	24,24	21,27	64,31	5,71
<i>Cladosporium</i>	5,88	48,48	0	0	0
<i>Drechslera</i>	3,92	12,12	0	0	0
<i>Aureobasidium</i>	0	0	0	0	14,28
<i>Curvularia</i>	3,92	0	0	0	0
Total	99,99	99,99	99,99	99,99	99,99

I, II, III, IV, V= zonas de muestreo; %= porcentaje.

micotoxicosis. Por su parte, el género *Penicillium*, predominó en ambos estudios en comparación con otros agentes fúngicos, esto debido a su capacidad de adaptación a diversos sustratos (18).

Un estudio realizado en Turquía para evaluar la presencia de mohos en 30 muestras de queso Kuflu semiduro artesanal, procedentes de diferentes mercados identificaron como género prevalente y con mayor incidencia a *Penicillium* con un 70,25%, seguido de otros géneros aislados en menor incidencia como *Alternaria*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizopus* y *Trichoderma*, demostrando que muchos de los problemas de contaminación pueden originarse en la producción, maduración y comercialización del queso (19).

Kure y Skaar en el 2000, en Noruega trabajaron con dos tipos de queso semiduro (Jarlsberg y Norvegia) de alto consumo en ese país, donde aislaron e identificaron *Penicillium roqueforti*, *P. commune*, *P. palitans* y *P. solitum*. Estas 4 especies representan el 69,80% del total de los aislamientos de queso Norvegia y 81,00% del número total de aislamientos de queso Jarlsberg. Estos mohos son transportados por el aire y están asociados con el deterioro de los quesos. Otros géneros aislados fueron *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Phoma* y *Ulocladium* (20).

Un estudio realizado por Kure y col. en el 2008, permitió evaluar 126 muestras de aire en seis queserías productoras de queso semiduro, donde reportaron especies del género *Penicillium* (64%), seguido de *Cladosporium* (20%), *Aspergillus* (6%) y 10% correspondiente a otros géneros (21).

El crecimiento de moho en queso es un problema de calidad recurrente durante la maduración, almacenamiento en refrigeración o durante la distribución; muchos de estos mohos pertenecen al género *Penicillium*, que son capaces de crecer en un amplio intervalo de temperaturas (frigoríficos y otros) (18, 22).

Sin embargo, es bastante aceptable para una variedad de alimentos albergar estos organismos como parte de la flora normal y de hecho, el queso puede contener números muy altos y aún ser considerado sano (22).

Especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* son generalmente contaminantes de queso, dado que las especies de estos géneros son a menudo capaces de producir micotoxinas, además son considerados los géneros más importantes que contribuyen al deterioro de las características organolépticas de los quesos duros, semiduros y blandos mediante la producción de cantidades excesivas de enzimas como lipasas, proteasas y carbohidrasas (23, 24).

Varios estudios demostraron que la principal vía de contaminación de mohos ambientales, es el aire como fuente importante lo cual ha sido demostrado en estudios realizados en fábricas de producción de queso semiduro (25).

Durante las partes del proceso de producción, los quesos están en contacto directo con los equipos como máquina de liberación de queso, en el cual el aire a presión que se utiliza para liberar el queso del recipiente representa un punto crítico para la contaminación de moho en las fábricas, donde estos microorganismos se adhiere a la superficie del recipiente con ayuda del aire a presión, por otra parte varios de los quesos contaminados con cepas de *Penicillium* podría estar relacionado con el aire en la sala de envasado, que debe ser considerado como un punto crítico para la contaminación fúngica de queso, los mohos en el aire pueden proceder del aire exterior y entrar a través del sistema de ventilación o de nichos húmedos en el entorno del proceso (26).

En cuanto al género *Curvularia* un trabajo realizado en Colombia, en relación a la diversidad fúngica en ambientes de industria alimentaria detecto alta carga fúngica ambiental en el espacio además de la existencia de este género (27).

Candida encontrada en un 100% de las muestras analizadas, es un contaminante común de los quesos y de las plantas de queso (28). Esta levadura a nivel fisiológico resiste altas concentraciones de NaCl y además su presencia en los alimentos se relaciona con la existencia de la misma en el aire, suelo, paredes, estantes, equipos, salmueras y otros (17). Pereira y col. (2000), aislaron de queso artesanal semiduro, 344 cepas de levaduras siendo más frecuente *Candida famata*, *C. zeylanoides*, *C. intermedia* y otras menos frecuentes como *C. curvata* y *Rhodotorula*. Sin embargo la distribución de las especies durante la maduración del queso no era constante, de hecho *C. curvata* y *Rhodotorula* se aislaron únicamente de la cuajada, mientras que *C. famata*, *C. intermedia* y *C. zeylanoides* aumentaron durante el tiempo de maduración (26).

En Venezuela, son nulos los estudios realizados con base a la identificación de géneros predominantes en los quesos artesanales semiduros, considerándose esta investigación de marcada importancia debido a la inocuidad alimentaria y seguridad al consumidor.

Conclusiones

Las levaduras estuvieron presentes en todas las muestras de queso analizadas por encima de lo establecido, en la normativa venezolana quizás por las condiciones a la cual se expende el producto a la venta, mientras que los mohos se encontraron dentro de los límites permisibles. Los géneros de mohos aislados e identificados en esta investigación fueron *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Drechslera*, *Aureobasidium*, *Curvularia* y un 100% correspondiente a la levadura *Candida*. El género *Penicillium* fue el de mayor incidencia en los quesos analizados, lo que representa un peligro a la salud del consumidor por la posible producción de micotoxinas tales como la ocratoxina A, la citrinina y la patulina.

Agradecimientos

A la Unidad de Investigaciones en Microbiología Ambiental de la Facultad Experimental de Ciencias y al Laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina de La Universidad del Zulia.

Referencias bibliográficas

1. CAMACHO A., GILES M., ORTEGÓN A., PALAO M., SERRANO B., VELÁZQUEZ O. **Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos**. México. 1-8. 2009.
2. VÁSQUEZ B., CEPEDA A., FRANCO C., QUINTO E. **Cien Tecnol Aliment** 3 (003): 169-172. 2001.
3. http://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/Articulo_Ile_contaminacion_fungica_mayo_2010.pdf Fecha de consulta: 7 de mayo de 2014.
4. CEPEDA A., FRANCO C., VÁSQUEZ B. **Cien Tecnol Aliment** 3 (2): 96-101. 2001.
5. PAREDES V. Inocuidad de los alimentos (para obtener el grado de MSc) Facultad de Ciencia Animal. Universidad Nacional Agraria. Managua (Nicaragua). 103pp. 2009.
6. COVENIN N° 1126. **Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico**. Caracas (Venezuela). 1-8. 1989.
7. COVENIN N° 1337. **Alimentos. Métodos para el recuento de mohos y levaduras**. Caracas (Venezuela). 1-6. 1990.
8. LÓPEZ D., JIMÉNEZ M., LÓPEZ A. **Alimentos hoy** 19 (21): 85-108. 2010.
9. BARRON´S, G. **The genera hyphomycetes from soil** (Editorial The Williams & Wilkins Company). Baltimore (USA). 1-364. 1968.
10. BOLÍVAR, H. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los quesos tipo palmita de las principales marcas comercializadas en la ciudad de Maracaibo (para obtener el título de Licenciado en Biología). Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo (Venezuela). 62pp. 2012

11. COVENIN N° 3821. **Queso blanco**. Caracas (Venezuela). 6-7. 2003..
12. MIRÓ A., RÍOS M. **Rev Inst Nac Hig Rafael Rangel** 30: 14-20. 1999.
13. LOPANDIC K., ZELGER S., BÁNSZKY L., ELISKASES F., PRILLINGER H. **Food Microbiol** 23: 341-350. 2006.
14. BERESFORD T., FITZSIMONS N., BRENNAN N., COGAN T. **Int Dairy J** 11: 259-274. 2001.
15. CHAPMAN H., SHARPE M. **Microbiology of cheese** London and New Jersey: Applied Science Publishers 203-290. 1990.
16. JAY J. **Modern Food Microbiology** (Editorial Chapman and Hall). New York (USA). 1-701. 1992.
17. VILJOEN B., KHOURY A., HATTINGH A. **Food Res Int** 36: 275-283. 2003.
18. BULLERMAN L. **J Food Saf** 2: 47-58. 1980
19. HAYALOGU A., KIRBAG S. **Int J Food Microbiol** 115: 376-380. 2007.
20. KURE C., SKAAR I. **Int J Food Microbiol** 62: 133-137. 2000.
21. KURE C., BORCH E., KARLSSON I., HOMLEID J., LANGSRUD S. **Int J Food Microbiol** 122: 29-34. 2008.
22. MAGDA A., MADEHA A., SAFAA Q., NAGWA E. **Food Chem Toxicol** 48: 3031-3034. 2010.
23. ABELLÁN A. Caracterización del queso de Murcia al Vino. Efecto de la utilización de diferentes coagulantes (para obtener el grado de Doctora). Facultad de Ciencias de la Salud, de la Actividad Física y del Deporte. Universidad Católica San Antonio. Guadalupe (Murcia). 353pp. 2010.
24. PANELLI S., BUFFONI J., BONACINA C., FELIGINI M. **Food Control** 28: 385-391. 2012.
25. KUREC S., KAAR I., BRENDEHAUG J. **Int J Food Microbiol** 93: 41-49. 2004.
26. PEREIRA S., POTES M., MARINHO A., MALFEITO M., LOUREIRO V. **Int J Food Microbiol** 60: 55-63. 2000.
27. FRISON L., COLOMBA P., ARINGOLI E., BASILICO J. **Revista FACIBIB** 16: 78-92.
28. ROOSTITA R., FLEET G. **Int J Food Microbiol** 28: 393-404. 1996.