

Evaluación del efecto del hipoclorito de sodio sobre levaduras aisladas de industrias jugueras en crecimiento planctónico y formando biofilms sobre acero inoxidable en condiciones de no circulación de fluidos

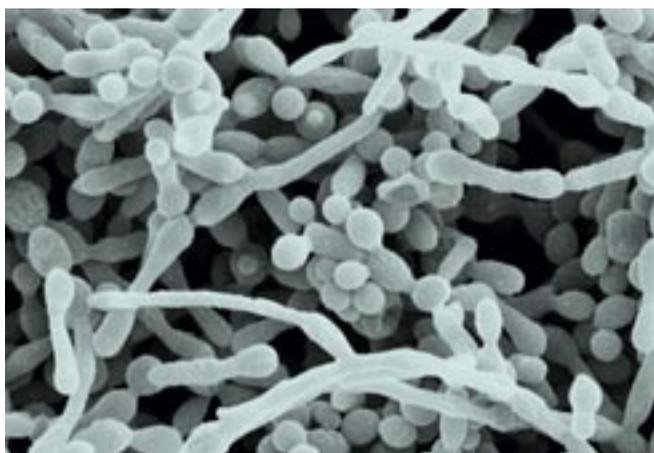
Marucci, Patricia L.¹; Palencia Díaz, Manuel A.²; Brugnoli, Lorena I.^{1,2*}; Tarifa, María Clara³

¹Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia - Universidad Nacional del Sur (UNS). Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

²Instituto de Ciencias Biológicas y Biomédicas del Sur (INBIOSUR, CONICET-UNS). Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina.

³Centro de Investigaciones y Transferencia de Río Negro (CIT Río Negro, CONICET-UNRN) - Universidad Nacional de Río Negro (UNRN). Villa Regina, Río Negro, Argentina.

*brugnoli@uns.edu.ar



RESUMEN

Las levaduras son las principales colonizadoras de las superficies de producción en empresas productoras de jugos de frutas, afectando la calidad y disminuyendo los rendimientos. Los métodos químicos de control microbiano son a menudo ineficaces para erradicar biofilms, ya que las células adheridas presentan mayor resistencia ante agentes antimicrobianos que aquellas en estado planctónico. Tradicionalmente el hipoclorito de sodio (NaClO) ha sido utilizado como agente desinfectante a gran

escala debido a su bajo costo, fácil aplicación y amplio espectro de eficacia. Sin embargo, su uso en concentraciones inadecuadas (sub-inhedorias) puede generar con el tiempo clusters de células resistentes. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de NaClO sobre células planctónicas y biofilms de levaduras aisladas de membranas de ultrafiltración de una planta productora de jugo de manzana y pera del Alto Valle de Río Negro y Neuquén. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando cuatro especies: *Candida tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefir* y *Rhodotorula mucilaginosa*. Para los ensayos sobre células planctónicas, se pusieron en contacto 180 μ L de una suspensión de cada especie (10^5 cél/mL) por separado con 20 μ L de NaOCl en distintas concentraciones (50, 150, 200, 300, 400 y 500 ppm), durante 5, 10, 15 y 30 minutos. En el caso de las células adheridas, se formaron biofilms durante 24 h a 25 °C sobre superficies de acero inoxidable AISI 314 de 1 cm², empleando jugo de manzana clarificado de 12°Brix como matriz de crecimiento. Luego, se enjuagaron para eliminar las células débilmente adheridas y se

pusieron en contacto con 500 ppm de NaOCl durante 10 y 30 min. En ambos ensayos, transcurrido el tiempo de contacto se neutralizó con solución de tiosulfato de sodio al 0,2% (p/v) en buffer fosfato. Los recuentos se llevaron a cabo en agar YGC (48 h-25 °C). Cada condición se analizó por duplicado y se estableció la eficiencia microbicida (EM) expresada en porcentaje. Para las células planctónicas, la EM fue del 100% para *C. kefir* expuesta a 400 ppm durante 5 min, mientras que para las restantes especies el 100% se alcanzó luego de 5 min de exposición a 500 ppm. En el caso de los biofilms expuestos a 500 ppm de NaOCl durante 10 min, la EM fue del 100% para *C. krusei* y *C. kefir*, mientras que para *C. tropicalis* y *R. mucilaginosa*, fue del 37 y 40%, respectivamente. El tratamiento con 500 ppm de NaOCl durante 30 min no modificó la EM para *R. mucilaginosa* (40%), mientras que se incrementó hasta 63% para *C. tropicalis*. Considerando que las concentraciones de NaClO utilizadas en los protocolos de sanitización de las industrias jugueras varían entre 50 y 200 ppm según la etapa del proceso productivo, estos resultados alertan sobre la ineficacia de utilizar las mismas concentraciones indistintamente sobre células planctónicas o biofilms, siendo estos últimos más resistentes. Además, se puso en evidencia las diferentes sensibilidades al NaClO de las especies estudiadas, lo cual plantea la necesidad de un estudio caso por caso.

Palabras clave: Levadura, biofilm, hipoclorito de sodio, eficiencia microbicida, jugos de fruta.

INTRODUCCIÓN

En la industria alimentaria, la presencia de biofilms genera un serio problema higiénico-sanitario, ya que causan pulsos de contaminación difíciles de controlar durante el proceso productivo, comprometiendo la calidad microbiológica del producto, su vida comercial, la efectividad de los tratamientos y la salud del consumidor. Por otro lado, desde un punto de vista tecnológico, la acumulación de biofilms interfiere en el proceso de elaboración del alimento, generando daños en los equipos, disminución en la eficiencia productiva y aumento de los costos energéticos (Zara y col., 2020).

Debido a la alta acidez de los jugos frutas ($\text{pH} < 4$) las levaduras son las principales deteriorantes de este tipo de alimentos, formando parte de la microbiota dominante de las industrias asociadas, impactando negativamente en la apariencia y el sabor del producto final (Aneja y col., 2014). Su presencia es ubicua, desde sistemas de clarificación por membranas hasta cintas transportadoras y accesorios de envasado, con una taxonomía que incluye a diversos géneros como *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Salo y Wirtanen, 2005; Tarifa y col. 2013; Fikri y col., 2023). Se estima que en Estados Unidos el daño causado por biofilms de levaduras en la industria alimentaria alcanza millones de dólares por año (Alonso y col., 2023).

Aunque los procesos tradicionales de limpieza y desinfección remueven la mayor parte de la biomasa microbiana, no son suficientes para eliminar todas las células, las cuales, eventualmente, pueden adherirse y proliferar en las distintas superficies de los equipos de producción, formando biofilms (Yuan y col., 2021). Una de las consecuencias más preocupantes asociadas a la presencia de biofilms es que estos exhiben una mayor resistencia a los procesos diarios de limpieza y desinfección, además de que la matriz extracelular producida por las células incluidas en los biofilms incrementa la tolerancia de aquellas subyacentes y limita la difusión de los desinfectantes al interior (Yuan y col., 2021). Se ha informado que la resistencia a los antimicrobianos puede ser hasta 100 ó 1000 veces mayor en biofilms, en comparación con las células planctónicas (Zara y col., 2020). Desde el punto de vista de la industria alimentaria, esto representa un gran desafío, y el uso de concentraciones inadecuadas de agentes desinfectantes es una de las principales causas de persistencia de microorganismos sobre las superficies de producción (Capita y col., 2017).

Uno de los desinfectantes más comúnmente utilizado en la industria alimentaria es el hipoclorito de sodio (NaClO) debido a su amplio espectro de acción, contiene cloro en estado de oxidación y por lo tanto es un oxidante fuerte, además de ser económico. Es considerado un oxidante no selectivo que reacciona con una gran variedad de compuestos subcelulares y afecta los procesos metabólicos.

Actúa sobre las membranas celulares, cambiando su permeabilidad, inhibe el transporte de sustancias, fragmenta las proteínas y reacciona con los nucleótidos (Porcel de Fernández y col., 2013). Las concentraciones de NaClO utilizadas en los protocolos de sanitización de las industrias jugueras varían entre 50 y 200 ppm de acuerdo con la etapa del proceso productivo. Sin embargo, el control de microorganismos en su estado planctónico y de aquellos que forman parte de biofilms puede resultar muy dispar (Múgica y col., 2018; Miranda y col. 2022).

Para diseñar estrategias apropiadas para el control de biofilms con base en las necesidades propias de cada industria alimentaria, es fundamental comprender su proceso de formación y cómo se asocian e interaccionan las diferentes especies en el microambiente generado en las plantas elaboradoras de alimentos. En este trabajo se utilizaron cuatro levaduras aisladas de membranas de ultrafiltración utilizadas en la clarificación de jugo de manzana y pera, y consideradas como representantes de la microbiota residente, ya que mostraron resiliencia frente a los sucesivos factores de control y estrés aplicados en las diferentes etapas de producción (Tarifa y col., 2013; Tarifa y col., 2018). En consecuencia, la eliminación de los biofilms formados por la microbiota residente en equipos de procesamiento y superficies de contacto con los alimentos juega un rol esencial para garantizar la calidad microbiológica del producto final (Porcel de Fernández y col., 2013; Zara y col., 2020).

Teniendo en cuenta la importancia que tiene una eficiente implementación de sistemas de desinfección y que en las industrias la microbiota asociada puede estar en su forma libre o adherida, es que se plantea el objetivo de evaluar la eficiencia microbiocida de diferentes concentraciones y tiempos de contacto de NaClO sobre células planctónicas y biofilms de levaduras aisladas de membranas de ultrafiltración de una planta productora de jugo de manzana y pera del Alto Valle de Río Negro y Neuquén.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos empleados

Se utilizaron cuatro levaduras: *Candida tropicalis*, *C. krusei*, *C. kefyr* y *Rhodotorula mucilaginosa*, aisladas de sistemas de ultrafiltración (UF) de industrias elaboradoras de jugo de manzana y pera. El aislamiento, selección y caracterización de las especies se realizó previamente de acuerdo con lo descrito por Brugnoli y col. (2007) y Tarifa y col. (2013). Las levaduras fueron conservadas en caldo Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC, Biokar Diagnostics, Francia) con glicerol al 20% (v/v) a -80 °C hasta su uso. A partir de este stock, se suspendieron en caldo YGC y se incubaron por 48 h a 25°C. Posteriormente, las células fueron separadas por centrifugación a 2100 x g durante 5 minutos, lavadas dos veces con buffer PBS (K₂HPO₄ 0,87 g/L, KH₂PO₄ 0,68 g/L, NaCl 8,77 g/L, pH 7,5) y el pellet resultante fue suspendido en PBS hasta alcanzar una concentración celular de aproximadamente 10⁵ células/mL.

Ensayos sobre células planctónicas

Los ensayos de desinfección sobre células planctónicas se llevaron a cabo utilizando el método de microdilución en placas estériles de 96 pocillos. En cada pocillo se pusieron en contacto 180 µL de la suspensión ajustada de cada especie de levadura con 20 µL del NaClO en distintas concentraciones (50, 150, 200, 300, 400 y 500 ppm), durante 5, 10, 15 y 30 minutos. Transcurrido el tiempo de contacto se extrajeron 100 µL de cada pocillo y se colocaron en tubos tipo Eppendorf® con 900 µL de PBS y tiosulfato de sodio al 0,2% (p/v) como agente neutralizante. El recuento total de las levaduras se realizó en agar YGC a 25 °C por 48 h. El límite de detección del método fue de 1 UFC/mL. Se incluyeron muestras controles reemplazando los tratamientos por iguales volúmenes de solución fisiológica.

Ensayos sobre biofilms

Los ensayos de desinfección sobre biofilms se realizaron sobre superficies estériles de acero inoxidable (AI) tipo AISI-304 de 1 cm² colocadas en microplacas estériles de 24 pocillos. Los inóculos de cada levadura (ver Microorganismos empleados) se resuspendie-

ron en jugo de manzana clarificado de 12°Brix esterilizado por microfiltración con membranas de un tamaño de poro de 0,45 µm (Metricel®Grid, Gelman Sciences, MI, EE. UU.). A cada pocillo se le adicionaron 2 mL de la suspensión celular de cada especie de levadura por separado y se incubaron durante 24 h a 25°C a fin de permitir la formación del biofilm. Luego, las superficies se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se las agitó suavemente con el fin de eliminar las células no adheridas o débilmente adheridas. Para la evaluación del efecto antimicrobiano, las superficies se sumergieron en 2 mL de NaClO a una concentración de 500 ppm durante 10 (T1) y 30 min (T2), en función de los resultados obtenidos sobre células planctónicas. Transcurridos los tiempos de exposición, las superficies se retiraron y se colocaron en nuevos pocillos con 2 mL de PBS con 0,2% (p/v) de tiosulfato de sodio como agente neutralizante.

Para el recuento celular, las superficies se colocaron en tubos de ensayo que contenían agua destilada más perlas de vidrio. A fin de desprender las células de los biofilms, se sonicaron a 40 kHz por 2 min a 20°C (Digital Ultrasonic Cleaner, PS-10A) seguido por agitación en vórtex por otro minuto a máxima velocidad (Agustín y col., 2023; Lindsay y Von Holy, 1997). El recuento total de las levaduras se realizó en agar YGC a 25°C por 48 h. El límite de detección del método fue de 1,3 UFC/cm². Se incluyeron muestras controles reemplazando los tratamientos por iguales volúmenes de solución fisiológica.

Efecto microbicida

Tanto en los ensayos de desinfección sobre células planctónicas como sobre biofilms se determinó el efecto microbicida (EM) y el porcentaje de reducción (Reducción [%]) a partir de las siguientes ecuaciones:

$$EM = N_c - N_t,$$
$$\text{Reducción [\%]} = [(N_c - N_t) / N_c] \times 100$$

Donde N_c representa el recuento de células sin tratar expresado en Log₁₀ (UFC/mL o cm²), y N_t el recuento celular luego del tratamiento expresado en Log₁₀ (UFC/cm²).

A fin de considerarse efectivo, un desinfectante debe reducir el número de células planctónicas de levaduras en al menos 4 unidades logarítmicas (BS EN 1275:2005), y en al menos 3 unidades logarítmicas en el caso de células adheridas a superficies (Salo y col, 2005; Mataraci-Kara y col., 2020).

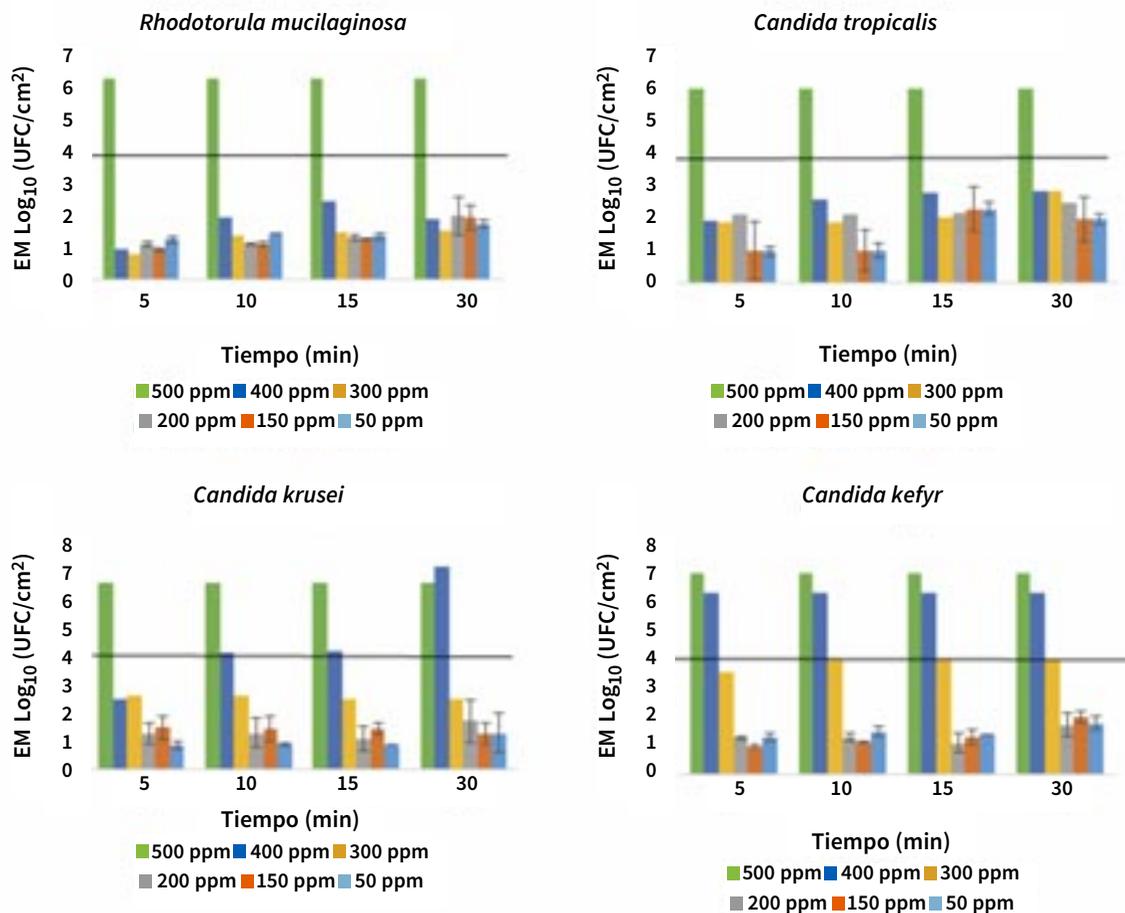
Análisis estadístico

Los resultados obtenidos como UFC/mL o cm² fueron transformados a Log₁₀ a fin de calcular las reducciones logarítmicas. Los resultados se expresaron con su media y desviación estándar (media ± DE) y se calcularon a partir de los datos obtenidos de los recuentos por duplicado en al menos tres experimentos independientes. Las diferencias entre las muestras (controles vs. tratamientos) fueron estudiadas mediante un análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia del 5% (p<0,05), para aquellos casos en los que el efecto del tratamiento fue relevante estadísticamente (SigmaPlot 12).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para las células planctónicas, la reducción fue del 100% para *C. kefir* expuesta a 400 ppm durante 5 min, mientras que para las restantes especies el 100% de reducción se alcanzó luego de 5 min de exposición a 500 ppm. Como se observa en la Figura 1, para *C. kefir* y *C. krusei* se lograron reducciones de más de 4 unidades logarítmicas con concentraciones de NaClO de 300 y 400 ppm, respectivamente, a partir de los 10 min de contacto, en tanto que para *R. mucilaginosa* y *C. tropicalis* esta reducción se alcanzó solamente con 500 ppm a partir de los 5 min.

Figura 1 - Efecto microbicida (EM) de diferentes concentraciones de NaClO sobre levaduras aisladas de industrias jugueras en estado planctónico. La línea negra horizontal corresponde a una EM de 4 unidades logarítmicas.

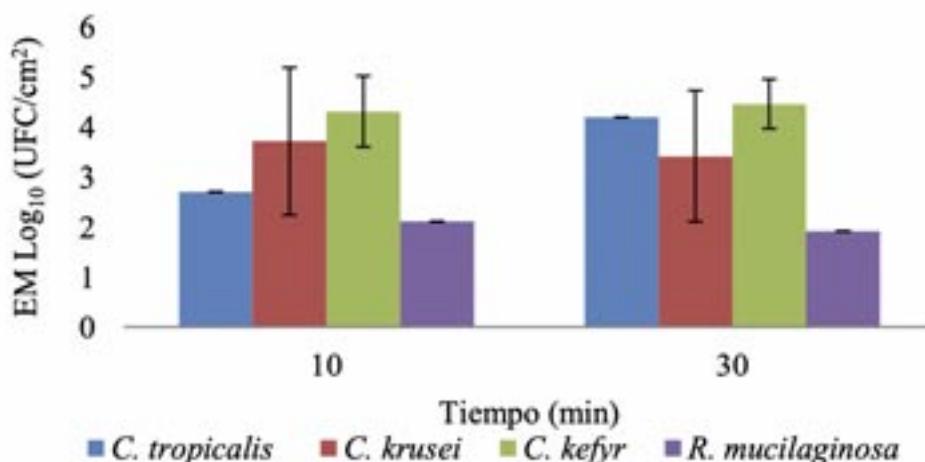


En la **Figura 2** se muestran los resultados obtenidos sobre células en biofilms. Dentro de las especies más susceptibles a los tratamientos se encuentran *C. krusei* y *C. kefyr*, como se observó en los ensayos sobre células planctónicas. En el caso de los biofilms expuestos a 500 ppm de NaOCl durante 10 min, la reducción fue del 100% para ambas especies, mientras que para *C. tropicalis* y *R. mucilaginosa*, fue del 37 y 40%, respectivamente. El tratamiento con 500 ppm de NaOCl durante 30 min no modificó el porcentaje de reducción para *R. mucilaginosa* (40%), mientras que se incrementó hasta 63% para *C. tropicalis*.

En el caso de los biofilms, para ambos tiempos de desinfección se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) comparados con los correspondientes controles en las cuatro especies.

Sin embargo, los efectos de los tiempos de tratamiento fueron diferentes estadísticamente ($p < 0,05$) sólo para *C. tropicalis*, con reducciones mayores a 4 unidades logarítmicas con 30 min de aplicación mientras que con 10 min sólo se lograron reducciones por debajo de 3 unidades logarítmicas. Salo y col. (2005) sostiene que, para ser considerado efectivo, un desinfectante debe reducir en al menos 3 unidades logarítmicas el número de células de levaduras en biofilms, con tiempos de exposición entre 5 y 15 min. Sobre la base de los resultados expuestos en la **Figura 2**, con 10 min de exposición al NaClO a una concentración de 500 ppm, es suficiente para alcanzar un control eficiente de *C. krusei* y *C. kefyr*, con una EM entre 4-5 log₁₀ (UFC/cm²). Sin embargo, un resultado similar para *C. tropicalis* sólo se logró

Figura 2 - Efecto microbicida (EM) de 500 ppm de NaClO sobre biofilms de levaduras aisladas de industrias jugueras. La línea negra horizontal corresponde a una EM de 3 unidades logarítmicas.



con 30 minutos de exposición, y para el caso de *R. mucilaginosa*, se obtuvieron reducciones de aproximadamente 2 unidades logarítmicas con ambos tratamientos. Moore y col. (2017) encontraron que 1000 ppm de NaClO durante 5 min resultaron eficientes para reducir en más de 4 unidades logarítmicas la viabilidad de cultivos planctónicos de *C. auris* y *C. albicans* de origen clínico. Por otra parte, Mataraci-Kara y col (2020), encontraron que la exposición a 100 ppm de NaClO durante 5, 15 y 30 min fue eficiente para reducir en 4 unidades logarítmicas la población de células planctónicas en 8 de 12 especies de *C. albicans* y no-albicans aisladas de sistemas de tratamiento de aguas residuales de un hospital. En ensayos de susceptibilidad sobre biofilms formados por el aislamiento de *C. albicans* que presentó la mayor capacidad de formar biofilm en microplacas durante 24 h, fueron necesarias concentraciones de NaClO de 1000 ppm durante 60 min para lograr una reducción en el número de células de 4 log₁₀/cm².

Los biofilms, como estructuras multicelulares embebidas en una matriz de exopolisacáridos, poseen una incrementada resistencia a los agentes de desinfección químicos y físicos en contraste con cultivos planctónicos (Huang y col., 2019; Zara y col., 2020; Alonso y col., 2023). Frente a un agente antimicrobiano, se sabe que la resistencia depende de la

especie, e inclusive difiere entre distintas cepas de una especie, por lo cual resultan complejas las comparaciones con otros estudios. Además, los resultados del proceso de desinfección sobre biofilms también depende de su madurez, de las características de la superficie de adhesión y del tipo de desinfectante, ya que muchos se inactivan parcialmente en presencia de materia orgánica, entre otros factores (Alonso y col., 2023). Uno de los factores más relevantes que otorga resistencia a los biofilms frente a los antimicrobianos es la matriz extracelular. Existe una gran variedad de sustancias poliméricas extracelulares que pueden formar la matriz del biofilm, dependiendo de los microorganismos presentes, las fuerzas de cizalla experimentadas durante su formación, la temperatura y la disponibilidad de nutrientes.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la variación en la eficacia del NaClO depende del estado fisiológico de la célula evaluada (planctónico o sésil) y de la especie de levadura ensayada. En función a esto, es imprescindible realizar ensayos sobre biofilms en etapas tempranas de adhesión a fin de encontrar la concentración del desinfectante efectiva en un tiempo dado.

Si bien la literatura sugiere diferentes concentraciones de NaClO efectivas frente a biofilms de levaduras, la relevancia de este trabajo radica en el estu-

dio de su susceptibilidad frente al NaClO en condiciones que imitan lo más cercanamente posible las asociadas al proceso de producción de jugos de frutas: matriz alimentaria, microbiota residente, superficies de adhesión, tiempos y temperaturas de trabajo.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta que las concentraciones de NaClO utilizadas en los protocolos de sanitización de las industrias jugueras varían entre 50 y 200 ppm de acuerdo con la etapa del proceso productivo, los resultados de este estudio alertan sobre el riesgo de emplear una única concentración de agente biocida a lo largo de toda la línea de producción. Como se puede observar, las concentraciones utilizadas normalmente no son satisfactorias para el desplazamiento de las especies analizadas, las cuales forman parte de la microbiota residente; con lo cual se plantea la necesidad de un estudio caso por caso.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, PICT 2018- 00974 y PICT 2020-00377.

REFERENCIAS

- Agustín, M. D. R., Tarifa, M. C., Vela-Gurovic, M. S. y Brugnoni, L. I.** (2023). Application of natamycin and farnesol as bioprotection agents to inhibit biofilm formation of yeasts and foodborne bacterial pathogens in apple juice processing lines. *Food Microbiology*, 109, 104123.
- Aneja, K.R., Dhiman, R., Aggarwal, N.K., Kumar, V. y Kaur, M.** (2014). Microbes associated with freshly prepared juices of citrus and carrots. *Journal of Food Science*, 1-7.
- Alonso, V. P. P., Lemos, J. G. y Nascimento, M. (2023). Yeast biofilms on abiotic surfaces: Adhesion factors and control methods. *International Journal of Food Microbiology*, 110265.
- Brugnoni, L.I., Lozano, J.E. y Cubitto, M.A.** (2007). Potential of yeast isolated from apple juice to adhere to stainless steel surfaces in the apple juice processing industry. *Food Research International*, 40, 232-240.
- Capita, R., Buzón-Durán, L., Riesco-Peláez, F. y Alonso-Calleja, C.** (2017). Effect of Sub-Lethal Concentrations of Biocides on the Structural Parameters and Viability of the Biofilms Formed by Salmonella Typhimurium. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(6), 350-356.
- Fikri, S., Lessard, M.H., Perreault, V., Doyen, A. y Labrie, S.** (2023). Candida krusei is the major contaminant of ultrafiltration and reverse osmosis membranes used for cranberry juice production. *Food Microbiology*, 109:104146.
- Huang, K., Dou, F. y Nitin, N.** (2019). Biobased sanitizer delivery system for improved sanitation of bacterial and fungal biofilms. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11, 17204–17214.
- Lindsay, D. A. V. H. y Von Holy, A.** (1997). Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiology*, 14(4), 383-390.
- Mataraci-Kara, E., Ataman, M., Yilmaz, G. y Ozbek-Celik, B.** (2020). Evaluation of antifungal and disinfectant-resistant Candida species isolated from hospital wastewater. *Archives of Microbiology*, 202, 2543-2550.
- Miranda, A. C., Leães, G. F. y Copetti, M. V.** (2022). Fungal biofilms: insights for the food industry. *Current Opinion in Food Science*, 46, 100846.
- Moore, G., Schelenz, S., Borman, A. M., Johnson, E. M. y Brown, C. S.** (2017). Yeasticidal activity of chemical disinfectants and antiseptics against Candida auris. *Journal of Hospital Infection*, 97(4), 371-375
- Múgica, R., Ramírez, A. C., Muro, F. I., Santamaria, C. y Alba, E. F.** (2018). New methods for biofilms control in the food industry. In 22nd Internacional Congress on Project Management and Engineering.
- Porcel de Fernández, N. D., Urueña, R., Gaudio de Allori, M. C. y de Castillo, M. E. C.** (2013). Bactericida de hipoclorito de sodio sobre Staphylococcus cohnii productor de biofilm en una fábrica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 47(4), 693-700.
- Salo, S. y Wirtanen, G.** (2005). Disinfectant efficacy on foodborne spoilage yeast strains. *Food and Bioprocess Technology*, 83(4), 288-296.
- Tarifa, M.C., Brugnoni, L.I. y Lozano, J.E.** (2013). Role of hydrophobicity in adhesion of wild yeast isolated from the ultrafiltration membranes of an apple juice processing plant. *Biofouling*, 29, 841-853.
- Tarifa, M.C., Lozano, J.E., Brugnoni, L.I.** (2018). Desinfection efficacy over yeast biofilms of juice processing industries. *Food Research International*, 105, 473-481.
- Yuan, L., Sadiq, F.A., Wang, N., Yang, Z. y He., G.** (2021). Recent advances in understanding the control of disinfectant-resistant biofilms by hurdle technology in the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(22), 3876-3891.
- Zara, G., Budroni, M., Mannazzu, I., Fancello, F. y Zara, S.** (2020). Yeast biofilm in food realms: Occurrence and control. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, 1-10.