



Canel, Romina Soledad

# Caracterización de los hongos filamentosos superficiales y análisis de la inocuidad de los embutidos secos producidos en Colonia Caroya (Córdoba)



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.  
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

*Cita recomendada:*

Canel, R. S. (2017). *Caracterización de los hongos filamentosos superficiales y análisis de la inocuidad de los embutidos secos producidos en Colonia Caroya (Córdoba)*. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina : Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/247>

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

# **Caracterización de los hongos filamentosos superficiales y análisis de la inocuidad de los embutidos secos producidos en Colonia Caroya (Córdoba)**

*TESIS DOCTORAL*

**Romina Soledad Canel**

rcanel@unq.edu.ar

## **Resumen**

El salame elaborado en Colonia Caroya es un producto reconocido a nivel nacional, con un fuerte anclaje en la comunidad. En el año 2008 el Instituto Nacional de Tecnología de Alimentos comenzó a proporcionar soporte técnico al Municipio de Colonia Caroya y a los elaboradores de salames, con el objetivo de obtener el sello de Indicación Geográfica (IG) para dichos productos.

Para ello, se formó un equipo multidisciplinario con profesionales de todo el país y del exterior y se comenzó a trabajar con el objetivo de determinar los principales factores que le otorgaban una tipicidad exclusiva al salame Caroyense.

La investigación que en este documento se presenta, permitió caracterizar los hongos filamentosos superficiales que confieren el emplume típico a estos productos. Ésta caracterización se constituyó en uno de los elementos importantes que explican el vínculo entre la tipicidad del producto y los factores locales, requisito fundamental para la obtención del sello de IG que el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, otorgó a estos salames típicos en 2014 mediante la Resolución N° 3 7/2014.

Se encontró una alta predominancia de *P. nalgiovensis* sin la utilización de cultivos comerciales iniciadores de emplume. Para la identificación de las especies fúngicas se utilizaron técnicas de cultivo y moleculares.

El trabajar con muestras producidas en diferentes estaciones del año permitió evidenciar que la temperatura de la sala de maduración y secado, juegan un rol importante en la biodiversidad de los hongos filamentosos superficiales de estos salames.

Cuando la temperatura ambiente aumentan, y no existe un control eficiente de la temperatura de la sala de maduración, la actividad de agua de los productos disminuye y esto favorece el desarrollo de *Aspergillus ochraceus*.

Resulta muy importante evitar la contaminación superficial de los salames con esta especie, ya que no solo confiere un aspecto visual desagradable amarillento dorado, el cual no favorece a la tipicidad del producto, sino que además podría generar el riesgo de encontrar ocratoxina A en el interior del mismo (de hallarse una cepa productora de la toxina), debido a la posible difusión de la misma a través de la tripa; lo cual fue comprobado en este trabajo. Sin embargo, es de resaltar, que no se han encontrado salames caroyenses con contaminación con ocratoxina A, aún cuando superficialmente se encontraba *A. ochraceus* en alta concentración. Esto puede deberse o bien a que las cepas no tienen el gen para la producción de la toxina, o bien a que el mismo no fue expresado en las condiciones de elaboración de los salames.

La biodiversidad de especies fúngicas halladas tanto en el aire del sótano de los establecimientos elaboradores de salames de Colonia Caroya, como en la superficie de los productos es baja, predominando casi exclusivamente en ambos casos *P. nalgiovense*.

Es de destacar que la predominancia de las especies fúngicas encontradas en el aire de los sótanos de los establecimientos elaboradores de salames de la colonia, es coincidente con las predominancias encontradas en los productos. Sin embargo, en la inoculación intencional de un sótano de maduración que se llevó a cabo en este trabajo, ésta consideración no ha tenido éxito. Las capacitaciones en buenas prácticas de elaboración realizadas con los elaboradores de salames de Colonia Caroya, tuvieron una implicancia positiva en la calidad higiénico sanitaria de los productos embutidos, encontrándose una mejoría sustancial en los criterios microbiológicos evaluados que exige el Código Alimentario Argentino.

Se demostró que la utilización de bacterias lácticas en la elaboración de salames caroyenses aceleran el tiempo en alcanzar los criterios microbiológicos recomendados, y sin el uso de las mismas 21 días de maduración sería un tiempo adecuado para asegurar la inocuidad microbiológica.

La obtención de este sello permite preservar la identidad del salame típico de Colonia Caroya, disminuyendo la usurpación de marca y garantizando la inocuidad de los mismos, comunicando de esta manera a los consumidores las características particulares del mismo y del territorio que lo origina.

# Tesis Doctoral

*“Caracterización de los hongos filamentosos superficiales y análisis de la inocuidad de los embutidos secos producidos en Colonia Caroya (Córdoba)”*

— 2015 —



Universidad  
Nacional  
de Quilmes



Ing. Canel, Romina Soledad

Directora: Dra. Ludemann, Vanesa

Co-Director: Dr. Wagner, Jorge R.

*A mamá y papá por incentivarme  
siempre a crecer y seguir adelante.  
A mi marido Gustavo y mi hijo Lucio,  
por ser mis pilares fundamentales de la  
vida.  
Los amo inmensamente.*

**L**a culminación de esta Tesis Doctoral no hubiera sido posible sin la ayuda y el apoyo de muchas personas importantes. Por eso hoy quiero agradecer a cada una de ellas.

**A** la Dra Vanesa Ludemann, primero por darme un lugar, pero más importante aún, por hacerme parte del mismo. Por enseñarme día a día, por alegrarse con mis triunfos y apoyarme en los momentos más necesarios. GRACIAS por ser una extraordinaria Directora, pero más aún GRACIAS por ser mi amiga!!!!

**A**l Dr Jorge Wagner por confiar siempre en mí y por transmitirme sus amplísimos conocimientos. Gracias por motivarme a seguir adelante siempre.

**A** las Ingenieras Alfonsina Moavro y Sofía Guerrissi porque sin su apoyo incondicional no lo hubiera logrado. Son muy importantes para mí.

**A** la Ingeniera Mariangeles Recimil por haberme ayudado en una parte de este trabajo desde su trabajo final de Ing. en Alimentos.

**A** la Universidad Nacional de Quilmes por darme la posibilidad de obtener una formación pública y de excelencia.

**A**l Dr. Marcelo Champredonde por habernos convocado para formar parte del proyecto de Indicación Geográfica para el salame típico de Colonia Caroya.

**A** los elaboradores de salames de Colonia Caroya y a Olga Candussi por habernos dejado formar parte de su proyecto y aceptar nuestras críticas constructivas en pos de mejorar sus productos.

**A**l Dr. Sebastián Stenglein por darme asistencia técnica en los ensayos de PCR.

**A** mis compañeras y compañeros de trabajo, todo el grupo del Programa de Investigación en Alimentos de la UNQ, quienes de alguna u otra manera me dieron una mano, un consejo, una ayuda a lo largo de este camino.

**A** mis amigas y familiares por acompañarme y aguantarme durante todos estos largos años.

**A** Gustavo por acompañarme incondicionalmente, dándome el amor más puro y sincero que puedo tener...Gracias por ser el mejor compañero de ruta en esta vida y por darme la posibilidad de conocer juntos al amor de nuestras vidas, LUCIO!!!

**Gracias a cada uno de ustedes hoy puedo decir bien fuerte...**

**LO LOGRÉ !!!!!**

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
----------------------	---

### INTRODUCCIÓN

1. El salame.....	3
2. La industria chacinera caroyense.....	4
3. Indicación Geográfica.....	7
4. Descripción, composición y proceso de elaboración del salame Caroyense.....	11
5. Criterios microbiológicos de embutidos secos según Código Alimentario Argentino.....	15
6. Microflora superficial de salames.....	19
7. Ocratoxina A.....	20

<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	24
-------------------------------	----

### CAPITULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA MICROFLORA SUPERFICIAL DE LOS SALAMES Y DEL AMBIENTE DE LOS ESTABLECIMIENTOS ELABORADORES DE COLONIA CAROYA

<b>1. Objetivo específico</b> .....	25
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	25
2.1 Muestreo.....	25
2.1.1 Determinación de la actividad acuosa.....	26
2.1.2 Caracterización de la microflora superficial de los salames.....	26
2.1.2.1 <i>Recuento de hongos de crecimiento superficial</i> .....	26
2.1.2.2 <i>Aislamiento e identificación de los hongos filamentosos superficiales</i> .....	27
2.1.2.2.1 <i>Identificación a nivel de especie mediante Pitt and Hocking (2009)</i> .....	27
2.1.2.3 <i>Conservación de los aislamientos</i> .....	29
2.1.2.4 <i>Confirmación molecular de la identificación de las especies P. nalgiovense y A. ochraceus</i> .....	29

2.1.2.4.1 Reactivación de aislamientos y obtención de cultivos monospóricos.....	29
2.1.2.4.2 Conservación de aislamientos monospóricos.....	30
2.1.2.4.3 Extracción de ADN.....	30
2.1.2.4.4 Integridad del ADN extraído.....	31
2.1.2.4.5 Cuantificación del ADN extraído.....	32
2.1.2.4.6 Amplificación del fragmento de $\beta$ tubulina para los aislamientos de <i>P. nalgiovense</i> .....	33
2.1.2.4.7 Amplificación del fragmento de ITS para los aislamientos de <i>A. ochraceus</i> .....	34
2.1.2.4.8 Integridad y pureza de los productos de PCR.....	35
2.1.2.4.9 Purificación de los productos de PCR.....	35
2.1.2.4.10 Secuenciación de los productos de PCR.....	36
2.2 Caracterización de los hongos filamentosos del ambiente de los establecimientos elaboradores.....	36
2.2.1 Muestreo.....	36
2.2.2 Recuento, aislamiento e identificación de los hongos.....	37
<b>3. Resultados y Discusión.....</b>	<b>37</b>
3.1 Determinación de la actividad acuosa.....	37
3.2 Caracterización de los hongos filamentosos superficiales de los salames.....	38
3.3 Caracterización de los hongos filamentosos del ambiente de los establecimientos elaboradores.....	55

## **CAPITULO II: INOCULACIÓN INTENCIONAL DE *P. NALGIOVENSE* EN UN SÓTANO DE MADURACIÓN**

<b>1. Objetivo específico.....</b>	<b>70</b>
<b>2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>70</b>
2.1 Inoculación intencional de <i>P. nalgiovense</i> en un sótano de maduración.....	70
<b>3. Resultados y Discusión.....</b>	<b>74</b>
3.1 Inoculación intencional de <i>P. nalgiovense</i> en un sótano de maduración.....	74

## CAPITULO III: INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y ACTIVIDAD DE AGUA SOBRE EL CRECIMIENTO DE *P. NALGIOVENSE* Y *A. OCHRACEUS*

<b>1. Objetivo específico</b> .....	79
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	79
2.1 Reactivación de las cepas fúngicas y preparación del inóculo.....	79
2.2 Preparación de los medios de cultivo.....	80
2.3 Cinéticas de crecimiento de <i>P. nalgiovensis</i> y <i>A. ochraceus</i> en MEA ajustado.....	80
2.4 Crecimiento conjunto de <i>P. nalgiovensis</i> y <i>A. ochraceus</i> en MEA ajustado.....	81
<b>3. Resultados y Discusión</b> .....	82
3.1 Cinéticas de crecimiento de <i>P. nalgiovensis</i> y <i>A. ochraceus</i> en MEA ajustado.....	82
3.2 Crecimiento conjunto de <i>P. nalgiovensis</i> y <i>A. ochraceus</i> en MEA ajustado.....	84

## CAPITULO IV: ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS SALAMES ELABORADOS EN COLONIA CAROYA

<b>1. Objetivo específico</b> .....	88
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	88
2.1 Muestreo.....	88
2.2 Determinaciones microbiológicas.....	89
2.2.1 Preparación y dilución de los homogenatos de salames.....	89
2.2.2 Presencia de coliformes: Técnica del número más probable.....	89
2.2.3 Recuento de coliformes de origen fecal: Técnica del número más probable.....	90
2.2.4 Recuento de <i>E. coli</i> .....	91
2.2.4.1 Técnica para la prueba de Indol.....	91
2.2.4.2 Técnica para la prueba de Rojo de Metilo.....	91
2.2.4.3 Técnica para la prueba de Voges Proskauer.....	92

2.2.4.4 Técnica para la prueba de citrato sódico.....	92
2.2.5 Recuento de anaerobios sulfito reductores (formas vegetativas y esporuladas conjuntamente).....	93
2.2.6 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa+.....	94
2.2.7 Métodos de screening rápido para patógenos.....	95
2.2.7.1 Screening de <i>Salmonella</i> en 25 g por medio de Rapidchek.....	96
2.2.7.2 Confirmación de <i>Salmonella</i> spp. por USDA/FSIS (2008).....	97
2.2.7.2.1 Screening bioquímico para <i>Salmonella</i> .....	97
2.2.7.2.2 Ensayo de Voges Proskauer.....	99
2.2.7.2.3 Ensayo de urea.....	99
2.2.7.2.4 Identificación bioquímica.....	99
2.2.7.2.5 Serología somática.....	101
2.2.7.2.6 Interpretación de resultados.....	102
2.2.7.3 Screening de <i>Listeria</i> spp. por Rapidchek.....	103
2.2.7.4 Confirmación de <i>Listeria monocytogenes</i> por USDA/FSIS (2008).....	104
2.2.7.4.1 Confirmación preliminar.....	105
2.2.7.4.2 Prueba de catalasa.....	105
2.2.7.4.3 Movilidad.....	105
2.2.7.4.4 Pruebas bioquímicas.....	106
2.2.7.5 Screening para <i>E. coli</i> O157 por Rapidchek.....	109
2.2.7.6 Confirmación de <i>E. coli</i> O157:H7/NM por USDA/FSIS (2008).....	109
2.3 Análisis de la influencia del tiempo de maduración y el uso de cultivos iniciadores en la calidad microbiológica de los salames.....	110
<b>3. Resultados y Discusión.....</b>	<b>110</b>
3.1 Análisis microbiológico de los salames de Colonia Caroya.....	110
3.2 Análisis de la influencia del tiempo de maduración y el uso de cultivos iniciadores en la calidad microbiológica de los salames.....	119

## **CAPÍTULO V: INCIDENCIA DE OCRATOXINA A EN LOS SALAMES ELABORADOS EN COLONIA CAROYA**

<b>1. Objetivo específico.....</b>	<b>122</b>
<b>2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>122</b>

2.1 Determinación de ocratoxina A en salames y materias primas.....	122
2.1.1 Muestreo.....	122
2.1.2 Análisis de ocratoxina A en carne (vacuna y porcina).....	124
2.1.2.1 Preparación y extracción de las muestras.....	125
2.1.2.2 Inmunoensayo.....	126
2.1.3 Análisis de ocratoxina A en grasa porcina.....	127
2.1.4 Análisis de ocratoxina A en pimienta blanca molida y vino blanco.....	128
2.1.4.1 Preparación y extracción de las muestras: pimienta blanca molida.....	128
2.1.4.2 Preparación y extracción de las muestras: vino blanco.....	128
2.1.4.3 Inmunoensayo.....	128
2.1.5 Análisis de ocratoxina A en salames.....	129
2.2 Cuantificación del porcentaje de <i>A. ochraceus</i> sobre el total de hongos filamentosos de los salames.....	130
2.2.1 Conservación de los aislamientos.....	130
<b>3. Resultados y Discusión.....</b>	<b>130</b>
3.1 Análisis de ocratoxina A en salames y materias primas.....	130
3.2 Implicancia de <i>A. ochraceus</i> sobre el total de hongos filamentosos superficiales.....	136

## **CAPITULO VI: EVALUACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO QUE IMPLICA EL DESARROLLO DE *ASPERGILLUS OCHRACEUS* SOBRE LA SUPERFICIE DE LOS SALAMES**

<b>1. Objetivo general.....</b>	<b>137</b>
<b>2. Materiales y Métodos.....</b>	<b>137</b>
2.1 Evaluación de la portación del gen <i>otanpsPN</i> involucrado en la biosíntesis de ocratoxina A en las cepas de <i>A. ochraceus</i> aisladas de salames.....	137
2.1.1 Reactivación de los aislamientos y obtención de cultivos monospóricos.....	137
2.1.2 Extracción de ADN.....	138
2.1.3 Integridad del ADN extraído.....	138

2.1.4 Cuantificación del ADN extraído.....	139
2.1.5 Amplificación de un fragmento del gen <i>otanpsPN</i> .....	139
2.1.6 Integridad y pureza de los productos de PCR.....	140
2.1.7 Secuenciación de los productos de PCR.....	140
2.2 Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas de <i>A. ochraceus</i> en CYA.....	141
2.2.1 Reactivación de aislamientos conservados.....	141
2.2.2 Evaluación de la capacidad de producción de OTA in vitro en CYA.....	141
2.2.3 Confirmación de la identidad de OTA en los extractos fúngicos.....	142
2.3 Determinación de la capacidad toxicogénica para la producción de OTA de una cepa de <i>A. ochraceus</i> en medios de simulación.....	143
2.3.1 Desarrollo de medios de simulación similares al salame.....	143
2.3.2 Reactivación de una cepa de <i>A. ochraceus</i> productora de OTA.....	145
2.3.3 Crecimiento de la cepa productora de OTA en los medios de simulación diseñados.....	145
2.3.4 Acondicionamiento de los medios de simulación diseñados mediante la incorporación de membranas.....	146
2.3.5 Crecimiento de la cepa de <i>A. ochraceus</i> productora de OTA sobre los medios/sustratos acondicionados.....	147
2.3.6 Análisis de la difusión de ocratoxina A en medio CYA y en medio E.....	148
<b>3. Resultados y Discusión.....</b>	<b>148</b>
3.1 Evaluación de la portación del gen <i>otanpsPN</i> involucrado en la biosíntesis de ocratoxina A en las cepas de <i>A. ochraceus</i> aisladas de salames.....	148
3.2 Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas de <i>A. ochraceus</i> en CYA.....	152
3.3 Determinación de la capacidad toxicogénica para la producción de OTA de una cepa de <i>A. ochraceus</i> en medios de simulación.....	154
3.3.1 Crecimiento de la cepa productora de OTA en los medios de simulación diseñados con y sin acondicionamiento.....	154
3.3.2 Análisis de la difusión de ocratoxina A en medio CYA y en medio E.....	157

<b>CONCLUSIONES</b> .....	162
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	165
<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS EN RELACIÓN CON ESTE TRABAJO</b> .....	167
<b>REFERENCIAS</b> .....	170
<b>ANEXO I</b>	
MEDIOS DE CULTIVOS, SOLUCIONES Y REACTIVOS.....	182
<b>ANEXO II</b>	
RECUENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS.....	190
<b>ANEXO III</b>	
SECUENCIAS CARGADAS EN EL GENBANK.....	196
<b>ANEXO IV</b>	
FICHA TÉCNICA DMC PROTECT.....	200

## RESUMEN

El salame elaborado en Colonia Caroya es un producto reconocido a nivel nacional, con un fuerte anclaje en la comunidad. En el año 2008 el Instituto Nacional de Tecnología de Alimentos comenzó a proporcionar soporte técnico al Municipio de Colonia Caroya y a los elaboradores de salames, con el objetivo de obtener el sello de Indicación Geográfica (IG) para dichos productos.

Para ello, se formó un equipo multidisciplinario con profesionales de todo el país y del exterior y se comenzó a trabajar con el objetivo de determinar los principales factores que le otorgaban una tipicidad exclusiva al salame Caroyense.

La investigación que en este documento se presenta, permitió caracterizar los hongos filamentosos superficiales que confieren el emplume típico a estos productos. Ésta caracterización se constituyó en uno de los elementos importantes que explican el vínculo entre la tipicidad del producto y los factores locales, requisito fundamental para la obtención del sello de IG que el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación, otorgó a estos salames típicos en 2014 mediante la Resolución N° 37/2014.

Se encontró una alta predominancia de *P. nalgiovense* sin la utilización de cultivos comerciales iniciadores de emplume. Para la identificación de las especies fúngicas se utilizaron técnicas de cultivo y moleculares.

El trabajar con muestras producidas en diferentes estaciones del año permitió evidenciar que la temperatura de la sala de maduración y secado, juegan un rol importante en la biodiversidad de los hongos filamentosos superficiales de estos salames.

Cuando la temperatura ambiente aumentan, y no existe un control eficiente de la temperatura de la sala de maduración, la actividad de agua de los productos disminuye y esto favorece el desarrollo de *Aspergillus ochraceus*.

Resulta muy importante evitar la contaminación superficial de los salames con esta especie, ya que no solo confiere un aspecto visual desagradable amarillento dorado, el cual no favorece a la tipicidad del producto, sino que además podría generar el riesgo de encontrar ocratoxina A en el interior del mismo (de hallarse una cepa productora de la toxina), debido a

la posible difusión de la misma a través de la tripa; lo cual fue comprobado en este trabajo. Sin embargo, es de resaltar, que no se han encontrado salames caroyenses con contaminación con ocratoxina A, aún cuando superficialmente se encontraba *A. ochraceus* en alta concentración. Esto puede deberse o bien a que las cepas no tienen el gen para la producción de la toxina, o bien a que el mismo no fue expresado en las condiciones de elaboración de los salames.

La biodiversidad de especies fúngicas halladas tanto en el aire del sótano de los establecimientos elaboradores de salames de Colonia Caroya, como en la superficie de los productos es baja, predominando casi exclusivamente en ambos casos *P. nalgiovense*.

Es de destacar que la predominancia de las especies fúngicas encontradas en el aire de los sótanos de los establecimientos elaboradores de salames de la colonia, es coincidente con las predominancias encontradas en los productos. Sin embargo, en la inoculación intencional de un sótano de maduración que se llevó a cabo en este trabajo, ésta consideración no ha tenido éxito.

Las capacitaciones en buenas prácticas de elaboración realizadas con los elaboradores de salames de Colonia Caroya, tuvieron una implicancia positiva en la calidad higiénico sanitaria de los productos embutidos, encontrándose una mejoría sustancial en los criterios microbiológicos evaluados que exige el Código Alimentario Argentino.

Se demostró que la utilización de bacterias lácticas en la elaboración de salames caroyenses aceleran el tiempo en alcanzar los criterios microbiológicos recomendados, y sin el uso de las mismas 21 días de maduración sería un tiempo adecuado para asegurar la inocuidad microbiológica.

La obtención de este sello permite preservar la identidad del salame típico de Colonia Caroya, disminuyendo la usurpación de marca y garantizando la inocuidad de los mismos, comunicando de esta manera a los consumidores las características particulares del mismo y del territorio que lo origina.

## INTRODUCCIÓN

### 1. El salame

El Código Alimentario Argentino (CAA) es un reglamento técnico en permanente actualización que establece las normas higiénico-sanitarias, bromatológicas, de calidad y genuinidad que deben cumplir las personas físicas o jurídicas, los establecimientos, y los productos que caen en su órbita.

En el Capítulo VI del CAA, se define a los chacinados como los productos preparados a base de carne y/o sangre, vísceras u otros subproductos animales que hayan sido autorizados para consumo humano, adicionados o no con sustancias aprobadas a tal fin.

Asimismo, en el Art. 303 del código, se establece la definición de embutidos como los chacinados en cualquier estado y forma admitida que se elaboren, que hayan sido introducidos a presión en fracciones de intestino u otras membranas naturales o artificiales aprobadas a tal fin, aunque en el momento del expendio y/o consumo carezcan del continente. Los embutidos pueden ser frescos, secos o cocidos (art. 304, CAA).

Los embutidos secos, son aquellos que han sido sometidos a un proceso de deshidratación parcial para favorecer su conservación por un lapso prolongado de tiempo (art. 306, CAA).

Con el nombre de salame (Figura 1), se entiende al embutido seco elaborado sobre la base de carne de cerdo o carne de cerdo y vacuno, con el agregado de tocino, sal, salitre, azúcar, especias y vino (art. 338, CAA).



**Figura 1:** Salame

## 2. La industria chacinera caroyense

En Argentina, el salame arribó de la mano de los inmigrantes españoles e italianos que desembarcaron durante la Primera Guerra Mundial.

Así fue que en nuestro país surgieron diversas zonas productoras de embutidos secos. En la actualidad, las principales provincias productoras de salames son Buenos Aires (se destacan las localidades de Tandil y Mercedes), Santa Fe, Córdoba (Río Cuarto, Villa María, Oncativo, Colonia Caroya, San Francisco, etc.) y La Pampa.

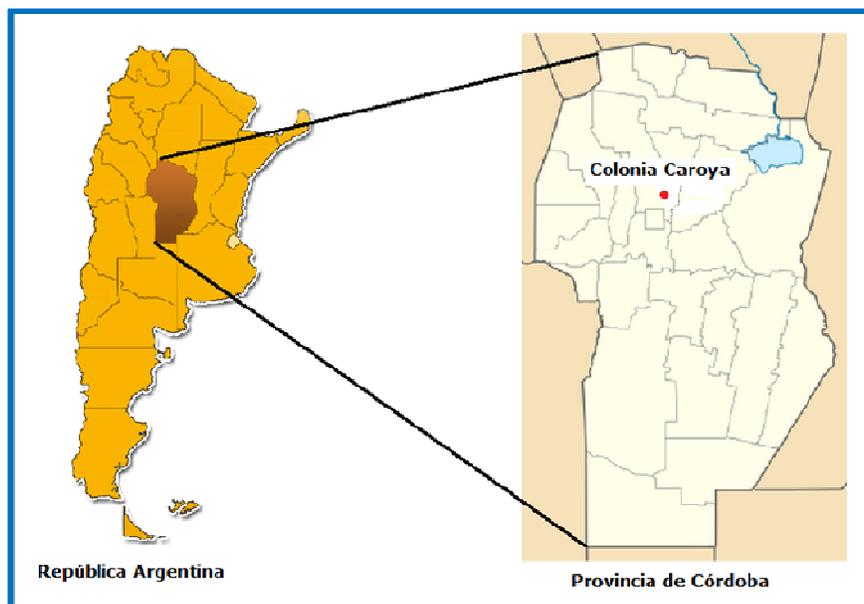
En el sector cárnico, muchas veces se suele llamar a este tipo de productos como “embutidos secos fermentados”, ya que ocurre una fermentación en el producto debida a la actividad metabólica de las bacterias lácticas indígenas o añadidas, la cual es una etapa fundamental para garantizar el éxito del producto.

Los últimos datos a conocer por la ex Oficina Nacional de Control Comercial Agropecuario (ONCCA, 2011) establecen que existen 398 fábricas de chacinados habilitadas en el país, con una alta concentración de las mismas en la provincia de Buenos Aires, seguida por las provincias de Santa Fe y Córdoba.

Dentro de los centros más importantes de producción de salames, se encuentra Colonia Caroya, en el centro de la provincia de Córdoba (Figura 2). Esta actividad es la más importante de la región y en la misma se elabora un salame típico denominado “caroyense”.

La historia de la región menciona que en 1878 se instalaron allí alrededor de 60 familias de inmigrantes italianos provenientes de la región de Friuli (noreste de Italia) los cuales ciertamente resultaron responsables del comienzo de la elaboración del salame.

La receta del salame “caroyense” fue evolucionando desde las recetas originales traídas del Friuli, adaptándose a las nuevas condiciones de vida de los inmigrantes y a los nuevos conocimientos que fueron adquiriendo. En un primer momento la elaboración de los embutidos resultaba una práctica casera, para el consumo familiar, hasta que en el siglo pasado, en la década del 60, comenzaron a producirse salames con fines comerciales.



**Figura 2:** Ubicación de la provincia de Córdoba y de Colonia Caroya en el mapa de Argentina.

Esto se vio favorecido por una crisis económica que atravesó la región debida a pérdidas de cosechas de frutas por causa del granizo que azotó las plantaciones. A medida que pasaron los años aumentó la cantidad de elaboradores comerciales de la colonia, y por consiguiente aumentaron también los volúmenes ofrecidos por algunos de ellos.

En la actualidad, se pueden diferenciar distintas tipologías de empresas elaboradoras de salame, dependiendo de su tamaño y de sus volúmenes de producción: carnicerías (en mayor proporción que el resto), fábricas pequeñas-medianas que se dedican exclusivamente a la elaboración de salame e industrias que manejan importantes volúmenes de producción superiores al resto de las mencionadas.

Hoy en día, existen 29 elaboradores de salame (Figura 3), los cuales son en muchos casos bisnietos o tataranietos de aquellos inmigrantes italianos y cuya receta y cuyo saber-hacer se fue trasladando de generación en generación. Estos elaboradores emplean a más de 150 personas (y a muchas otras de forma indirecta: vendedores, visitas turísticas, etc.), consiguiendo un volumen anual de 645 toneladas de producto terminado y estarían generando alrededor de 9.500.000 de dólares de ventas anuales (Boué, 2012).



Figura 3: Algunos de los establecimientos elaboradores de salames de Colonia Caroya.

Considerando que dentro de las actividades de los habitantes de la colonia, el 75% elabora chacinados, y que todos los elaboradores de chacinados cuentan entre sus productos con el salame (Boué, 2012), se establece la gran importancia que tiene este producto para la ciudad y para su economía, reflejando sus raíces y cultura traída de Italia por los inmigrantes que desembarcaron en Colonia Caroya.

### **3. Indicación Geográfica**

Existe en el mundo un gran número de productos que intuitivamente se pueden asociar a su lugar de origen, donde adquirieron reputación como resultado de la interacción entre la cultura local y el ambiente de la zona de producción, que les confieren características que los hacen especiales y diferentes de sus similares. Se trata de los productos con calidad vinculada al origen. Esta concepción nació en los pueblos del antiguo continente, donde ese lazo entre el territorio y su gente se refleja en el producto.

América Latina, ha sido una tierra de acogida y de inmigración significativa, en particular para los europeos, en los últimos siglos. Estos inmigrantes europeos utilizaron su saber-hacer para recrear sus alimentos, adaptándose a las materias primas locales y de esta manera dieron lugar a nuevos alimentos con identidad propia (Schiafone, 2010).

Tanto en el ámbito internacional como en Argentina estos productos son reconocidos como indicaciones calificadas, y dentro de ellas se encuentran las Indicaciones Geográficas (IG) y las Denominaciones de Origen (DO) (Figura 4). Se trata de dos figuras de protección con requisitos distintos, que poseen el mismo amparo legal y se aplican a los productos cuya calidad diferenciada se halla ligada al origen.

La diferencia principal entre estos dos sellos de calidad radica en que las DO se pueden otorgar a aquellos productos que son producidos, procesados y preparados en el área geográfica, lo cual le da calidad o características que derivan esencialmente del origen geográfico. En cambio, para obtener una IG el producto debe ser producido o procesado o preparado en el área geográfica, lo cual le da calidad, reputación, características o tipicidad atribuibles a la región geográfica.

En Argentina existen dos productos que obtuvieron sellos de DO, el primero fue el Chivito Criollo del Norte Neuquino (2008) y el segundo el Salame de Tandil (2011).



**Figura 4:** Sellos oficiales de calidad vinculada al origen.

Además de distinguir la calidad de un producto agrícola o alimentario, estas herramientas protegen legalmente el nombre, producto y grupo interesado, y tienden a promover el desarrollo rural porque evitan la competencia desleal y el negativo impacto que tiene sobre la imagen del producto la comercialización de imitaciones engañosas para el consumidor.

El potencial de los productos ligados al origen radica en su calidad específica, que es resultado de la combinación de recursos naturales y técnicas o prácticas de producción locales relacionadas con la historia y la cultura (Vandecandelaere *et. al*, 2010).

Las Indicaciones Geográficas son signos distintivos que permiten al consumidor distinguir, en el mercado, un producto de otro del mismo tipo. Son instrumentos útiles en una estrategia de diferenciación de productos en la cual el factor de diferenciación está dado por la calidad intrínseca, valorada y percibida por el consumidor en relación con su origen geográfico.

A diferencia de las marcas, que son signos con capacidad distintiva que permiten diferenciar los productos o servicios de una empresa de los de las demás, las indicaciones geográficas no se inventan, no son signos de fantasía.

Existen en relación con un lugar geográfico determinado, se desarrollan a lo largo del tiempo y se encuentran sujetas a la presencia, en ese territorio, de determinados factores naturales y humanos objetivos.

El salame elaborado en Colonia Caroya es un producto reconocido a nivel nacional, con un fuerte anclaje en la comunidad. Debido a este alto reconocimiento, este salame era víctima de numerosas usurpaciones de marca, por lo que en el año 2006 la Municipalidad de Colonia Caroya y los elaboradores de este producto decidieron comenzar el proceso para construir una IG para los salames caroyenses. No se pensó en la posibilidad de conseguir un sello de DO, ya que muchas veces los animales son carneados en localidades vecinas de Colonia Caroya, y no en el propio territorio.

En el año 2008 el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) a través del proyecto AETA 2683 (“Herramientas para la gestión de calidad de los alimentos- Diferenciación y valorización de los alimentos con identidad territorial”) comenzó a proporcionar soporte técnico al Municipio de Colonia Caroya y a los elaboradores de salames, con el objetivo de obtener el sello de Indicación Geográfica para dichos productos. En este sentido se comenzó a trabajar tratando de lograr determinar los principales factores que le otorgaban esa tipicidad exclusiva al salame, anclados en los saberes empíricos heredados de los inmigrantes friulanos y adaptados a la comunidad local.

El primer diagnóstico fue dirigido por el Ing. Francois Casabianca y el Dr. Marcelo Champredonde (coordinador del proyecto de solicitud de construcción de la IG para los salames caroyenses), y ayudó a identificar los principales factores territoriales que conferían tipicidad al producto, como así también la existencia de elementos que pudieran justificar la constitución de una Indicación Geográfica. En el año 2009, el RIMISP (Centro Latinoamericano para el Desarrollo Rural), a través de su proyecto “Desarrollo Rural con Identidad Territorial”, se interesó por el impacto socio cultural del proceso. Finalmente en el año 2010, el proyecto fue seleccionado como “caso piloto argentino” con el fin de validar el funcionamiento del establecimiento de sellos de calidad vinculados al origen en la Argentina.

Así fue como el Dr. Champredonde comenzó a contactarse con diferentes profesionales del país, reconocidos cada uno en sus líneas de investigación, para abarcar todos los temas relacionados a este proceso que comenzaba. En la Tabla 1 se describe el rol de cada una de las instituciones que participaron de este proceso.

**Tabla 1:** Instituciones involucradas y rol de cada una, en el proceso de obtención de la IG para los salames caroyenses.

Instituciones	Roles principales
INTA	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudio preliminar del sector</li> <li>- Análisis fisicoquímico y sensorial</li> <li>- Definición de las características del salame</li> <li>- Realización del proceso de solicitud de la IG</li> <li>- Elaboración del sistema de control y auditoría</li> <li>- Delimitación del área geográfica</li> </ul>
INTI carnes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Impacto sensorial del uso de aditivos</li> <li>- Impacto fisicoquímico del uso de aditivos</li> <li>- Tecnología de los productos cárnicos</li> </ul>
UNQ	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Análisis microbiológico de los productos</li> <li>- Determinación del tiempo mínimo de maduración</li> <li>- Estudio de los hongos superficiales</li> </ul>
RIMISP	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudio histórico y cultural</li> <li>- Impacto socioeconómico de la IG</li> </ul>
FAO	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ayuda jurídica y organizativa</li> <li>- Apoyo financiero</li> </ul>
Municipalidad de Colonia Caroya	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Líder del proyecto</li> <li>- Monitoreo de la calidad y trazabilidad del producto</li> <li>- Comunicación sobre la IG</li> </ul>

De esta manera se formó un equipo multidisciplinario (Figura 5) con profesionales de todo el país y del exterior, los cuales desde su temática trabajaron con los salames caroyenses en sus respectivos lugares de trabajo y cada dos meses aproximadamente, se reunían en Colonia Caroya para notificar a los productores los diferentes resultados que se iban obteniendo, y organizar con todo el equipo las tareas con las cuales se continuarían.

Particularmente desde la Universidad Nacional de Quilmes, mediante el Laboratorio de Micología de Alimentos participamos en la caracterización de los hongos filamentosos superficiales que confieren el emplume típico a estos productos; como así también se trabajó en el tiempo de maduración a partir del cual el salame se encuentra microbiológicamente apto para ser consumido, a partir de análisis de indicadores de inocuidad y otros aspectos importantes.



**Figura 5:** Algunos de los profesionales que llevaron adelante la obtención de la IG de los salames caroyenses. De izquierda a derecha arriba: Dra. Ludemann Vanesa (UNQ), Lic. Gonzalez Joaquín (INTA Castelar), Ing. Casabianca François (INRA de Córcega), Visintín Fernando (Elaborador), Dra. Benedetto Andrea (CONICET Mendoza; Proyecto DTR-IC, RIMISP), Dr. Champredonde Marcelo (INTA Bordenave), Mazzotta Luis (habitante de la colonia), Dra. Schiavone Elena (Proyecto FAO). Centro: Med. Vet. Carduza Fernando (INTA Castelar), Candussi Olga (Directora de Turismo de la Municipalidad de Colonia Caroya), Ing. Canel Romina (UNQ). Adelante: Dra. Alderete Salas Susana (INTA Catamarca), Dra. Renau Viviana (INTI Carnes), Lic. Sánchez Mariana (INTI Carnes) e Ing. Pilatti Leonor (INTA Catamarca).

#### **4. Descripción, composición y proceso de elaboración del salame caroyense**

Este producto, es un chacinado seco embutido, picado grueso, madurado en sótano. Se encuentra embutido en tripa de origen vacuno, de aproximadamente 25-40 cm de largo y de 45-60 mm de diámetro. Presenta las típicas ataduras de esta clase de productos, a lo largo de todo el cuerpo delimitando segmentos de 7 cm de longitud y una vez madurado tiene una coloración superficial blanquecina o grisácea clara debido a la micobiota autóctona que crece en su superficie.

El producto presenta poca firmeza al tacto y cierta elasticidad. Al ser cortado, la superficie transversal de la rodaja es brillante y se observan

uniformemente distribuidos los dados de tocino de aproximadamente 0,4 a 0,6 cm de lado. Además se aprecia el color rojo oscuro de su interior, que va oscureciéndose aún más al ir desde el centro hasta los bordes (Figura 6).



**Figura 6:** Salame típico de Colonia Caroya.

Para definir las características organolépticas del producto, se conformó un panel sensorial con habitantes y elaboradores de la colonia, que son quienes mejor conocen el producto. Dicho panel fue dirigido por el Méd. Vet. Fernando Carduza (INTA). Se definió entonces al salame caroyense como “un producto de color intenso, dados de tocino grandes, con una intensidad de sabor picante, gusto ácido además de salado, sabor característico a cerdo y cantidad moderada de nervios”. Además, este panel juzgó satisfactoriamente la tipicidad del salame caroyense a partir de sus características sensoriales y pudo establecer también la marcada diferencia que existe entre los salames que se maduran en sótanos y los que no. Todo esto demuestra que existe un perfil sensorial del salame de la Colonia muy característico, típico y único.

En cuanto a la composición de los mismos, se detalla en la Tabla 2 la fórmula consensuada entre los elaboradores participantes, establecida en el pliego presentado para el proceso de obtención de la IG.

El proceso de elaboración (Figura 7) comienza por la recepción de las materias primas, en las cuales se deben controlar las condiciones de higiene y refrigeración de cada ingrediente.

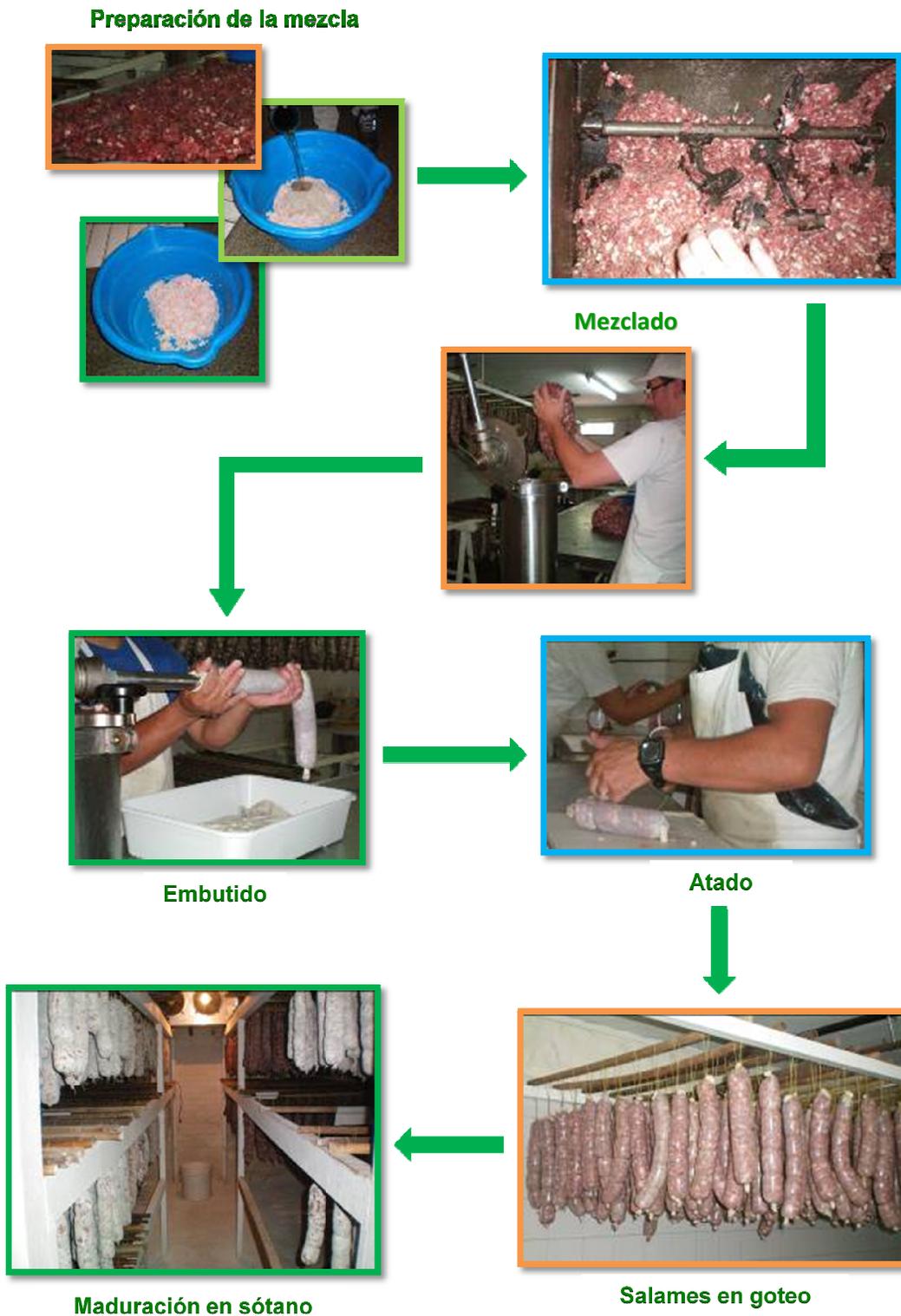


Figura 7: Proceso de elaboración de un salame caroyense.

Las materias primas se clasifican en “cárnicas” (cortes magros de carne vacuna y porcina, además del tocino) y “otros ingredientes”, dentro de los cuales están la pimienta blanca, el vino blanco, la sal, otras especies, etc.

**Tabla 2:** Composición del salame típico de Colonia Caroya.

Ingredientes (para 100 Kg de pasta)	Proporciones aceptables	
	Máximo	Mínimo
Carne bovina	61%	40%
Carne porcina	40%	20%
Tocino	30%	20%
Sal	3,20%	2,00%
Pimienta	0,45%	0,40%
Sal nitro (nitrato de potasio, 30g/100kg)	0,03%	0,0015%
Vino blanco (litros)	5,00	2,50
Ajo fresco (cabezas)	5,00	1,00
Azúcar (opcional)	hasta 1%	
Nuez moscada (opcional)	hasta 0,07%	
Sódio isoascorbato o Acido ascórbico (opcional)	0,05%	

Luego, siguen el desposte y/o selección de la pulpa, que es básicamente la separación del hueso de la carne, y la selección de la masa muscular magra o denominada también “al rojo”. Después se procede al picado de la pulpa y al cubeteado del tocino. La carne magra se introduce en una moldeadora/picadora de carne y el tocino (firme al tacto y de aspecto limpio) se corta manual o mecánicamente en cubos.

Una vez obtenida la pulpa procesada y el tocino en cubos, se mezcla todo (agregando el resto de los ingredientes) de forma manual o utilizando una mezcladora mecánica. Se amasa la preparación de manera que se obtenga una pasta ligada, sin visible separación de ingredientes para luego ser embutida en tripa natural y de origen vacuno. Durante este proceso se debe controlar que la mezcla mantenga baja temperatura y que la presión de la embutidora sea la correcta para evitar la formación de burbujas en el seno de la pasta. Una vez finalizado el embutido, se lo ata por los extremos y se realizan con el mismo hilo (choricero de 5 hebras) varias lazadas a lo largo del producto. Además se le agrega una etiqueta que contiene el lote y la fecha de elaboración.

Luego se cuelga el salame en una vara dentro de una habitación que debe estar acondicionada con una temperatura máxima de 25°C, para favorecer la eliminación del exceso superficial de líquido e iniciar la proliferación de las bacterias lácticas, que son las encargadas del posterior descenso del pH y del cambio de coloración de la carne. En esta habitación permanece el producto, como máximo 5 días, hasta que se observe el viraje en el color, una modificación en el olor del producto (de fresco al del salame) y que comiencen a aparecer indicios del emplume (desarrollo fúngico superficial). Esta etapa es conocida entre los elaboradores como etapa de goteo.

Una vez que concluye la etapa anterior, comienza lo que se denomina maduración o estacionado del salame. Esto es fundamental para la obtención exitosa del producto en cuestión, ya que durante la maduración ocurre el desdoblamiento de hidratos de carbono, la reducción de los nitratos, enrojecimiento, aromatización y pérdida de humedad del salame. En esta etapa, el producto es trasladado al sótano. La temperatura máxima debe ser de 18° C y se recomienda una humedad relativa de no más de 85%.

Una vez que se alcanzan las características típicas del producto (descritas anteriormente) y se verifica su aptitud para el consumo (merma de peso, ausencia de olores y sabores extraños, análisis microbiológicos y fisicoquímicos) el salame se encuentra listo para su venta.

## **5. Criterios microbiológicos de embutidos secos según Código Alimentario Argentino**

En el año 2012 se incorporaron al Código Alimentario Argentino los criterios microbiológicos para embutidos secos (Capítulo VI, Artículo 302), dentro de los que se incluye el salame (Tabla 3).

Los criterios de aceptación se basan en un plan de muestreo como se explica a continuación:

- n: es el número de muestras que se debe analizar del lote.
- M: es el valor de recuento máximo, que si se sobrepasa por cualquiera de las muestras examinadas, hay que rechazar el lote.
- m: es el valor del recuento que separa la calidad adecuada de la marginal, es decir, de los dudosamente aceptables.

- c: es el número máximo de muestras analizadas que pueden ser clasificadas en la categoría de dudosamente aceptables, antes de que sea rechazado el lote.

**Tabla 3:** Límites microbiológicos para embutidos secos y metodología propuesta.

Parámetro	Criterio de aceptación	Metodología
Recuento de <i>E. coli</i> (NMP/g)	n=5, c=0, m<3	ISO 16649-3:2005 ICMSF (Método 1) BAM-FDA:2002 (Método 1)
Recuento de <i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva (UFC/g)	n=5, c=1, m=100, M=1000	ISO 6888-1:1999 ICMSF
Recuento de anaerobios sulfitos reductores (UFC/g)	n=5, c=1, m=100, M=1000	ISO 15213:2003
<i>E. coli</i> O157:H7/NM	n=5, c=0, ausencia en 65g	USDA-FSIS:2010 ISO 16654:2001 BAM-FDA:2011
<i>Salmonella</i> spp.	n=5, c=0, ausencia en 25g	ISO 6579:2002 Co:2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS:2011
<i>Listeria monocytogenes</i>	n=5, c=0, ausencia en 25g	ISO:11290-1:1996 Amd:2004 BAM-FDA:2011 USDA-FSIS:2009

De esta manera, serán aceptables las muestras que estén en un valor de recuento entre 0 y m, serán dudosamente aceptables las que están entre m y M, y serán rechazables las que tengan un valor mayor a M.

Por ejemplo, para el recuento de *E. coli*: se deben analizar 5 muestras y ninguna debe superar el valor de 3 NMP/g.

Recuento de *Staphylococcus* coagulasa positivo: se deben analizar 5 muestras y solo una puede dar recuentos entre 100 y 1000 UFC/g y el resto (es decir las otras 4) menores a 100 UFC/g.

Recuento de anaerobios sulfitos reductores: se deben analizar 5 salames y todos deben dar recuentos menores a 100 UFC/g excepto uno que puede dar entre 100 y 1000 UFC/g.

En cambio para el caso de los microorganismos patógenos (*E. coli* O157:H7/NM, *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*) se exige ausencia en 25 g de producto en el caso de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., y para el caso de *E. coli* O157:H7/NM se exige ausencia en 65 g de producto. En

los 3 casos estos requisitos deben cumplirse para todos los salames analizados, sin excepción.

*E. coli* es una bacteria anaerobia facultativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Es un germen de forma bacilar, casi siempre inmóvil, gramnegativo. Su hábitat natural es el tracto entérico del hombre y de los animales. Por ello, la presencia de este microorganismo en un alimento indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal. La mayoría de las cepas son inocuas, pero existen algunas que son patógenas para el hombre (Pascual Anderson and Calderón Pascual, 2000).

*Staphylococcus aureus* es una especie bacteriana integrada por formas cocáceas que se agrupan irregularmente en racimos. Son inmóviles y carecen de esporos. Son grampositivas. Es una especie muy sensible al calor y a los desinfectantes, su presencia o la de sus toxinas en los alimentos es signo evidente de falta de higiene (Pascual Anderson and Calderón Pascual, 2000).

Asimismo, *S. aureus* es un patógeno que produce una intoxicación causando náuseas, vómitos, diarrea, malestar y debilidad general. Aunque la enfermedad raramente es mortal, los casos graves pueden complicarse, presentándose a veces deshidratación. Los síntomas se deben a las enterotoxinas estafilocócicas. Estas toxinas son liberadas en el propio alimento por *S. aureus* coagulasa positivo. El reservorio natural de estos microorganismos son las mucosas y la piel de la mayoría de los animales de sangre caliente (ICMSF, 1996).

El grupo bacteriano de los sulfitos reductores es un grupo bacteriano asociado al género *Clostridium*, los cuales reducen el sulfito a sulfuro. Son microorganismos Gram positivos, anaerobios, formadores de esporas. Suelen estar ligados a la calidad higiénica del agua y productos de origen animal. La capacidad de esporular de los microorganismos pertenecientes a este grupo les confiere gran resistencia (Pascual Anderson and Calderón Pascual, 2000).

Cuando se encuentran bacterias esporuladas anaeróbicas sulfito reductores en alimentos, en número anormalmente elevado, existe el riesgo de que entre ellas puedan encontrarse *C. perfringens* o *C. botulinum*. La intoxicación por *C. botulinum* se caracteriza por un síndrome no febril, neuromuscular, asociado con alteraciones abdominales y con un índice de mortalidad generalmente elevado. Los vómitos y el dolor epigástrico

frecuentemente producen la aparición de fenómenos paralíticos. Esto se debe a que dicha bacteria produce una toxina termorresistente.

*C. perfringens* produce una enfermedad relativamente leve, la cual es causada por una enterotoxina producida por el microorganismo en el intestino humano y se caracteriza por diarreas y dolor abdominal.

*Salmonella* es un género bacteriano perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* integrado por gérmenes de forma bacilar, no esporulados, habitualmente móviles, aunque existen mutantes inmóviles. Son microorganismos gram negativos, anaerobios facultativos (Pascual Anderson and Calderón Pascual, 2000). Es un microorganismo enteropatógeno para el hombre; produce fiebres tifoideas y paratifoideas o infecciones entéricas. La enfermedad es grave sobre todo en niños y ancianos. Por lo general, los animales son solo portadores que eliminan salmonellas de forma regular. El medio ambiente humano y animal se contamina por excretos humanos y animales. A través de aguas superficiales, de los insectos, las aves y los roedores, pueden contaminarse los alimentos.

*Escherichia coli* O157:H7/NM es una cepa de *Escherichia coli* que produce una potente toxina y puede ocasionar enfermedades graves como el síndrome urémico hemolítico (SUH). Es una enfermedad que se caracteriza por insuficiencia renal, anemia hemolítica, trombocitopenia y defectos de la coagulación (ICMSF, 2000). Es más común en los niños y es la primera causa de insuficiencia renal aguda en menores de 5 años. Puede causar la muerte o dejar secuelas para toda la vida como influencia renal crónica, hipertensión arterial y alteraciones neurológicas.

*Listeria monocytogenes* es un bacilo, no esporulado, móvil, grampositivo, anaerobio facultativo, catalasa positivo y que crece bien a temperaturas de refrigeración (ICMSF, 2000). Es un microorganismo patógeno que produce infecciones en mujeres gestantes, produciendo muchas veces abortos; también infecciones en niños recién nacidos, meningitis, adenitis múltiple y septicemia.

Cuando las muestras analizadas superan los criterios de aceptación para *E. coli*, *Staphylococcus aureus* y anaerobios sulfito reductores, representa un riesgo sanitario moderado, e indica principalmente la necesidad de monitorear el proceso y maximizar la calidad higiénico sanitaria de las materias

primas, de las operaciones básicas del proceso, contaminaciones cruzadas y buenas prácticas de manufactura.

En el caso de muestras que no cumplen con los criterios de aceptación para *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *E. coli* O157:H7/NM, implica un riesgo sanitario grave. En todos aquellos casos donde no se cumpla con alguno de los criterios microbiológicos que establece el CAA para embutidos secos, el lote del cual fueron obtenidas las muestras no debería comercializarse.

## 6. Micoflora superficial de salames

En el exterior del salame, se encuentran los hongos y levaduras del emplume, los cuales conforman, la micoflora superficial, que le otorga al producto su apariencia típica y es fundamental para la maduración. Esta apariencia será variable en función de las especies que conforman la microbiota. La coloración deseable de los salames es generalmente entre blanquecina y blanquecina- grisácea. Algunos productores utilizan cultivos starter con el objetivo de lograr esta apariencia deseable. Estos cultivos comerciales están compuestos fundamentalmente por la especie *Penicillium nalgiovense* biotipo 6 (Leistner, 1990). En contraste, en aquellos productos donde no se utilizan estos cultivos, se esperaría una mayor variabilidad de especies fúngicas conformando la micoflora indígena, la cual se compone principalmente de especies xerófilas de *Aspergillus*, *Eurotium* y *Penicillium* (Wu *et al.* (1974), Monte *et al.* (1986), Rojas *et al.* (1991), Andersen (1995), Núñez *et al.* (1996), Peintner *et al.* (2000), Lopez- Diaz *et al.* (2001), Mižáková *et al.* (2002), Comi *et al.* (2004), Ludemann *et al.* (2004), Tabuc *et al.* (2004), Wang *et al.* (2006), Battilani *et al.* (2007), Sørensen *et al.* (2008), Asefa *et al.* (2009), Castellari *et al.* (2010), Sonjak *et al.* (2011)).

En cuanto a las levaduras presentes en la micoflora superficial, las mismas se ven favorecidas en procesos artesanales, sin ahumado, y en embutidos de diámetro pequeño, y se ve perjudicado en procesos industriales (acelerados), con ahumado, con diámetros gruesos y por el uso de sorbatos. Los géneros más comunes son *Debaryomyces*, *Trichosporon*, *Candida* y *Torulopsis*, siendo *Debaryomyces hansenii* la especie de mayor prevalencia.

Como ya se mencionó anteriormente, Colonia Caroya cuenta con una producción en su mayoría del tipo artesanal, en donde la fuente tradicional de estos hongos es la micoflora natural del ambiente. Ningún elaborador de la Colonia declara la utilización de cultivo iniciador de emplume.

Durante la época estival, la llamada “mufa amarilla”, preocupa a la mayoría de los productores de la Colonia. Consiste de un emplume de coloración amarillento dorado que otorga características organolépticas indeseables a los salames y además proporciona un aspecto inadecuado para el consumidor. Esta problemática preocupa por la pérdida económica que trae aparejada, ya que dichos productos no son comercializados.

## **7. Ocratoxina A**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos en los alimentos. La ingestión de estos alimentos contaminados puede provocar una intoxicación en el hombre o en los animales. Estas intoxicaciones generan problemas agudos o crónicos que pueden afectar distintas funciones del organismo: alteraciones hepáticas, renales, de los centros nerviosos, circulatorias, del tracto digestivo, etc. Los principales géneros fúngicos productores de micotoxinas son: *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria*. Como se mencionó anteriormente, diferentes especies de *Aspergillus* y *Penicillium* son aisladas frecuentemente de la superficie de embutidos secos, entre las cuales se han encontrado frecuentemente *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium nordicum* y *Penicillium verrucosum*; especies capaces de producir ocratoxina A (OTA) (Iacumin *et al.*, 2009). Esta toxina presenta efectos neurotóxicos, inmunosupresores, genotóxicos, carcinogénicos y teratogénicos (Kuiper-Goodman, 1996). La OTA se absorbe en el tracto gastrointestinal y pasa a la circulación sistémica, acumulándose en los órganos de mayor actividad metabólica como el hígado, los riñones y los músculos. También se encontraron niveles de esta toxina en secreciones lácteas, lo que representa un serio riesgo para los recién nacidos (Gareis *et al.*, 1988).

La Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC) clasificó a esta micotoxina en la categoría 2B, que corresponde a agentes posiblemente carcinógenos para el ser humano.

En varios trabajos de investigación se han utilizado métodos de determinación y cuantificación de OTA como:

- Cromatografía en capa delgada (TLC) (López-Díaz *et al.*, 2001; Samson *et al.*, 2004a)
- Cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masa (LC-MS-SM) (Becker *et al.*, 1998)
- Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (Hurst and Martin, 1998)
- Técnica de inmunoensayo (ELISA) (Matrella *et al.*, 2006)

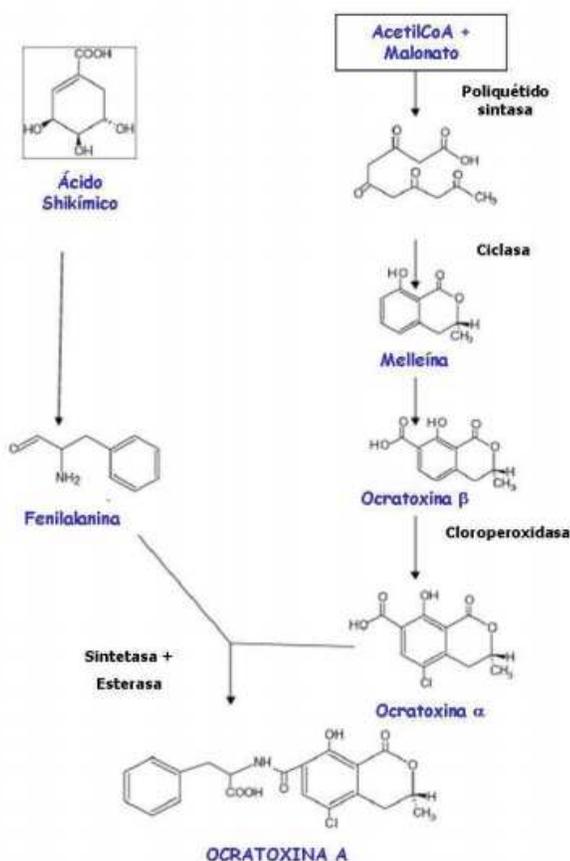
Respecto a la legislación de esta toxina, desde 1991 se encuentra regulada por la JECFA (Comisión mixta FAO/WHO de expertos sobre aditivos alimentarios), estableciendo como la ingesta diaria admitida (IDA) 16 ng/kg. En Canadá, entre 1989 y 1996 determinaron un IDA de 1,2 – 5,7 ng/kg. Posteriormente, en 1998, el Comité Científico de la Comisión Europea sobre alimentación humana valoró nuevamente los riesgos que simultáneamente se estudiaban e investigaban sobre la toxina y se redujeron los niveles de ingesta sugeridos tanto como fuera posible, siempre en valores inferiores a 5 ng/kg por día.

Hoy en día hay países que regulan independientemente los valores de OTA admitidos, que difieren según el tipo de producto; en Italia por ejemplo el límite máximo de OTA permitido en carne de cerdo y derivados es de 1 µg/kg (Circolare Ministero Sanita, n° 10-09/06/1999), mientras que en vino es de 2 µg/L (Arbillaga *et al.*, 2004). En Argentina no existe aún regulación oficial, legislación ni control sobre esta toxina en los alimentos.

Los nuevos desafíos proponen el uso de herramientas basadas en ADN para la detección de hongos micotoxicogénicos, ya que las técnicas basadas en cultivo requieren mucho tiempo operativo, y aún así el metabolito producido requiere su confirmación química.

La ruta de biosíntesis de OTA propuesta por Huff and Hamilton en 1979, postula tres distintas etapas. La primera corresponde a la síntesis de un residuo poliquétido de ocratoxina  $\alpha$  a partir de acetilCoA y malonato. En un primer paso, una enzima poliquétido sintasa inicia la síntesis del residuo ploquétido a través de la vía del acetato-malonato, dando lugar a melleína

como intermediario. A continuación, la melleína es metilada y oxidada, dando lugar a ocratoxina  $\beta$ , y una molécula de cloro es incorporada directamente para dar lugar a ocratoxina  $\alpha$ . En la segunda etapa, se sintetiza el otro precursor, la fenilalanina, a partir de ácido shikímico, que se une a su vez a la ocratoxina  $\alpha$ . Por último, en la tercer etapa, una enzima sintetasa genera ocratoxina C, y una estereasa conduce finalmente a la formación de OTA (Figura 8).



**Figura 8:** Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de OTA propuesta por Huff and Hamilton (1979).

Varios protocolos de PCR basados sobre genes involucrados en la biosíntesis de micotoxinas han sido aplicados para la detección de hongos toxicogénicos encontrados en alimentos (Paterson, 2006; Del Fiore *et. al*, 2010).

Aunque las rutas de biosíntesis de OTA no han sido completamente elucidadas aún, diferentes protocolos de PCR han sido estudiados, todos ellos principalmente enfocados en el gen poliquétido sintasa (*otapksPN*) responsable

de la biosíntesis del grupo isocumarin a través de la acción catalítica de la poliquétido sintasa (Dao *et. al.*, 2005; Bogs *et. al.*, 2006) y sobre el gen peptidil sintetasa no ribosomal (*otanpsPN*), supuestamente responsable de la formación del enlace peptídico entre el poliquétido y la fenilalanina (Bogs *et. al.*, 2006; Luque *et. al.*, 2013). La aplicación de estos métodos persigue la detección temprana de hongos productores de OTA sin discriminar géneros y especies, analizando directamente desde el alimento.

## OBJETIVO GENERAL

Considerando que:

- La producción artesanal de embutidos secos es la actividad más importante en Colonia Caroya (Córdoba).
- El renombre que adquirieron estos productos motivó a los elaboradores y al municipio a iniciar un proceso de construcción de una indicación geográfica (IG).
- En la elaboración artesanal de embutidos secos sin el uso intencional de cultivos fúngicos iniciadores del emplume, los hongos filamentosos que colonizan la superficie de estos productos son los propios del ambiente del sitio elaborador.
- Una micoflora autóctona deseable y controlada constituiría un elemento que se podría sumar al conjunto de factores locales que contribuyen a definir la tipicidad del salame de Colonia Caroya.
- Los hongos filamentosos que colonizan la superficie de los salames elaborados en Colonia Caroya no han sido aún estudiados.
- Algunos de los elaboradores de la Colonia cuentan con la aparición superficial de un emplume amarillo indeseable en los meses de verano, lo cual trae aparejado grandes pérdidas económicas por la no comercialización de estos embutidos.
- La aparición de hongos indeseables sobre la superficie de los salames, además de otorgar un aspecto inadecuado, puede generar la presencia de micotoxinas en el producto.
- Monitorear los criterios microbiológicos recientemente establecidos en el Código Alimentario Argentino para embutidos secos resulta en un diagnóstico importante vinculado a la inocuidad de estos productos.

El objetivo general del presente trabajo es caracterizar los hongos filamentosos superficiales y analizar la inocuidad de los embutidos secos producidos en Colonia Caroya (Córdoba).

## **CAPÍTULO I**

### **CARACTERIZACIÓN DE LA MICROFLORA SUPERFICIAL DE LOS SALAMES Y DEL AMBIENTE DE LOS ESTABLECIMIENTOS ELABORADORES DE COLONIA CAROYA**

#### **1. OBJETIVO ESPECÍFICO**

El objetivo del presente capítulo fue identificar los hongos que desarrollan sobre la superficie de los salames elaborados en Colonia Caroya y poder relacionarlos con aquellos hongos que se encuentran en el ambiente de los establecimientos elaboradores.

#### **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **2.1 Muestreo**

En este estudio fueron incluidos diez establecimientos elaboradores de salames (A-J) localizados en Colonia Caroya (Córdoba, Argentina). Todos los establecimientos evaluados tienen elaboración artesanal, excepto uno que es de elaboración industrial. La distancia máxima que separa a dos establecimientos es de 6 Km.

Fueron analizados en total, 93 salames. Las muestras fueron tomadas directamente del establecimiento elaborador al final del proceso de maduración (entre 15 y 30 días), en dos épocas diferentes del año: 57 muestras en invierno (39 en julio de 2010 y 18 en junio de 2012) y 36 muestras en el verano (20 en febrero de 2011 y 16 en marzo de 2012). Las condiciones climáticas de ambas estaciones de los distintos años analizados estuvieron en concordancia con la información histórica registrada en Córdoba (Argentina). Las temperaturas presentaron un valor medio anual de 17°C, con máxima media de 25°C en verano y mínima media de 10°C en invierno (Solicitud de Reconocimiento Indicación Geográfica para el Salame Típico de Colonia Caroya).

El 90% de los salames analizados se habían elaborado con tripa natural y el 10% restante con tripa sintética. Todos los salames analizados se habían elaborado sin el uso de cultivos iniciadores del emplume.

### **2.1.1 Determinación de la actividad acuosa**

Se midió la actividad acuosa ( $a_w$ ), de los salames pertenecientes a los muestreos realizados en el invierno 2010 y en el verano 2011. Se decidió trabajar con la actividad acuosa del centro del salame ( $a_w$  máxima) debido a la facilidad de obtener muestras más representativas. Según Ludemann (2008) la  $a_w$  máxima de un salame es aproximadamente 0,05 mayor a la  $a_w$  superficial.

Una vez recibidos los salames en el laboratorio se cortaba una rodaja central de aproximadamente 1 cm de espesor, y a su vez se cortaba la fracción central de dicha rodaja con la ayuda de un sacabocado de 8 mm colocándolas en cápsulas para su posterior medición de  $a_w$ . Las mediciones se realizaron con un higrómetro eléctrico Aqualab (Dispositivos Decagon, Modelo CX2). Se realizó la calibración del equipo utilizando soluciones saturadas de diferentes sales ( $KNO_3$ ,  $BaCl_2$ ,  $KCl$ ,  $NaCl$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ ), las cuales se dejaron estabilizar por 24 hs a temperatura ambiente. También se dejaron estabilizar las muestras a esta temperatura. Las mediciones de  $a_w$  de los salames se realizaron por duplicado.

### **2.1.2 Caracterización de la microflora superficial de los salames**

#### ***2.1.2.1 Recuento de hongos de crecimiento superficial***

Para el recuento de hongos de crecimiento superficial, en primera instancia se midió el largo y el diámetro de cada uno de los salames, luego se procedió a retirar, en esterilidad, la tripa de cada uno de ellos, con ayuda de pinzas. Se colocó la totalidad de cada tripa en bolsas estériles y se adicionaron 200 ml de agua de peptona al 0,1%. Las mismas fueron homogeneizadas por 60 segundos en stomacher (Aes Chemunex). A partir de estas suspensiones se realizaron diluciones seriadas en 9 ml de agua de peptona al 0,1% y se sembró 0,1 ml de las diluciones correspondientes en Agar Dicloran Glicerol 18%

(DG18) y 0,1 ml en Agar Extracto de Malta (MEA), extendiendo el inóculo con ayuda de una espátula de Drigalsky hasta su absorción total. Las placas sembradas fueron incubadas en estufa (Medición y Control) a 25°C durante 7 días. Este ensayo fue realizado por duplicado.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se procedió al recuento total en ambos medios. Para ello se utilizaron aquellas placas que contenían entre 10 y 100 unidades formadoras de colonias (UFC) y el recuento total de hongos filamentosos fue calculado como se detalla a continuación:

$$\text{Recuento total (UFC/cm}^2\text{)} = \frac{\text{UFC} \cdot 10^n \cdot 200}{0,1 \cdot (2 \cdot \pi \cdot r \cdot (l + r))}$$

*n* : número de dilución.

**200** : volumen de la suspensión inicial (ml).

**0,1** : volumen del inóculo (ml).

**2. π. r**: área del salame (cm<sup>2</sup>); donde **r** es el radio y **l** el largo.

De igual manera se procedió a realizar el recuento total de levaduras de desarrollo superficial en MEA.

Ambos recuentos fueron expresados como UFC / cm<sup>2</sup> de tripa.

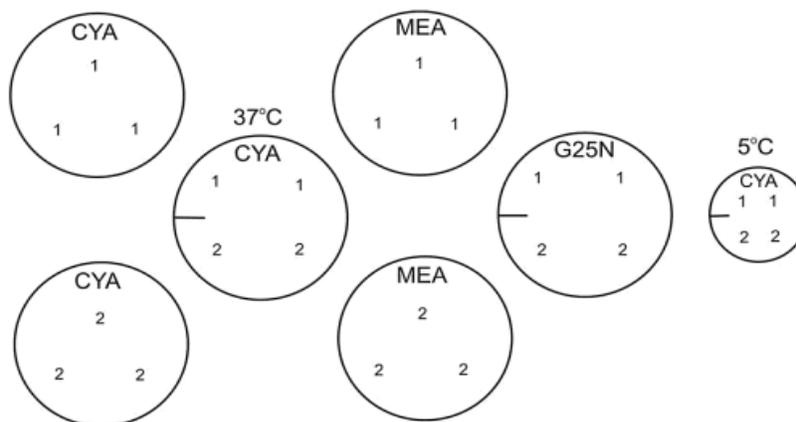
El análisis estadístico fue realizado por análisis de la varianza y test de mínimas diferencias significativas (p<0.05) usando el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1.

### **2.1.2.2 Aislamiento e identificación de los hongos filamentosos superficiales**

#### **2.1.2.2.1 Identificación a nivel de especie mediante Pitt and Hocking (2009)**

Cada una de las colonias visiblemente diferentes obtenidas en MEA y DG18, fueron re- aisladas en MEA para obtener cultivos puros y de tal forma poder realizar la identificación a nivel de especie según Pitt and Hocking (2009). Para ello, los aislamientos se inocularon e incubaron durante 7 días sobre tres medios estándar: Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA), MEA y

Agar Nitrato 25% Glicerol (GN25). Siguiendo el esquema de identificación que se presenta en la Figura 9, se ensayaron tres temperaturas (5, 25 y 37°C) para CYA, y una sola temperatura (25°C) para los medios MEA y G25N. Adicionalmente para aquellos aislamientos pertenecientes al género *Penicillium* se utilizó Agar Neutro Sacarosa Creatina (CSN) el cual se incubó a 25°C durante 7 días.



**Figura 9:** Esquema de identificación según Pitt and Hocking (2009). Donde 1 y 2 representan dos aislamientos distintos.

En términos generales, en los distintos medios de cultivo se observan características macroscópicas tales como color y diámetro de las colonias, presencia de pigmentos y exudados, como así también características microscópicas (textura de las paredes de las estipes, diámetro y forma de los conidios, etc.). Para la identificación a nivel microscópico, los preparados fueron realizados mediante tinción con colorante azul de algodón, a partir de las colonias crecidas en MEA. Todas estas características distintivas fueron observadas en el microscopio (Nikon) con una magnificación de 10, 40 y 100X.

Los diferentes biotipos de *Penicillium nalgiovense* fueron caracterizados de acuerdo a Fink-Gremmels *et al.* (1988). Estos biotipos difieren principalmente en el diámetro de la colonia en MEA, el color y el grado de esporulación sobre CYA y MEA.

La frecuencia relativa de cada especie (Fr) y la densidad relativa (Dr) de cada especie fúngica fueron calculadas de acuerdo a González *et al.* (1995), Pacin *et al.* (2003) y Saleemi *et al.* (2010), como se muestra a continuación:

$$Fr (\%) = \left( \frac{\text{Número de muestras con una especie}}{\text{Número total de muestras}} \right) \times 100$$

$$Dr (\%) = \left( \frac{\text{Número de aislamientos de una especie}}{\text{Número total de aislamientos fúngicos}} \right) \times 100$$

### **2.1.2.3 Conservación de los aislamientos**

Para la conservación de cada una de las cepas aisladas, se tomaron esporas del hongo de una colonia previamente desarrollada en MEA durante 7 días a 25°C, con ansa ojal en esterilidad y se adicionaron a un criovial que contenía agar agua al 0,2%. La nomenclatura utilizada contenía inicialmente las letras “SC” que significaba “salame de caroya”, seguida de letras que representaban a cada elaborador, seguido de un número que representaba de que salame provenía la muestra y por último un número para diferenciar a los aislamientos que provenían de un mismo salame. Todas las cepas (exceptuando a las levaduras, las cuales no fueron conservadas) fueron conservadas en heladera (Laybe) a 5°C en el cepario del Laboratorio de Micología de Alimentos de la UNQ.

### **2.1.2.4 Confirmación molecular de la identificación de las especies *P. nalgiovense* y *A. ochraceus***

#### **2.1.2.4.1 Reactivación de aislamientos y obtención de cultivos monospóricos**

Se reactivaron en MEA diferentes aislamientos de *Penicillium nalgiovense* y *Aspergillus ochraceus*, pertenecientes a los diferentes muestreos realizados en Colonia Caroya y oportunamente guardados en el cepario del Laboratorio de Micología de Alimentos. Para la selección de los aislamientos se tuvo en cuenta que fueran de distintos elaboradores. Se reactivaron 21 aislamientos de *Penicillium nalgiovense* (9 biotipo 6 y 12 biotipo 4): SCEN92, SCSU72, SCR31, SCLC101, SCSU73, SCCEN63, SCG81, SCA52, SC9/773, SCCEN61, SC9/782, SCDA62, SCG111, SCLC22, SCDA31, SCCEN22,

SCG13, SCDJ11, SC9/741, SCR22 y SCF71 y 6 aislamientos de *Aspergillus ochraceus*: SCSU71, SC9/772, SCDA71, SCV71, SCEM91 y SCLC71.

Además se reactivó la cepa de *P. nalgiovense* MOLD 600 comercializada por Christian Hansen.

Para obtener los cultivos monospóricos se realizó una suspensión de esporos a partir de las placas de MEA incubadas 7 días a 25°C en agua de peptona al 0,1%, luego se contaron las esporas en cámara de Neubauer y se realizaron las diluciones seriadas necesarias hasta obtener ente 50 y 100 esporas /ml. Se sembró 0,1 ml de esta suspensión en MEA y se extendió el inóculo con espátula de Drigalsky. A las 24hs se observaron las placas bajo lupa (Nikon) con una magnitud de 40X y se cortó con aguja un esporo individual (por duplicado) para ser transferido en otra placa de MEA. Las placas se incubaron a 25°C durante 7 días.

#### **2.1.2.4.2 Conservación de aislamientos monospóricos**

Colonias desarrolladas en MEA a 25°C durante 7 días a partir de un único esporo, fueron conservadas a partir de los esporos en crioviales con agar agua al 0,2%. Los mismos fueron conservados en heladera (Laybe) a 5°C formando parte del cepario del Laboratorio de Micología de Alimentos de la UNQ.

#### **2.1.2.4.3 Extracción de ADN**

El ADN fue extraído de los aislamientos monospóricos siguiendo la metodología descrita por Stenglein and Balatti (2006), la cual utiliza Cetil-trimetil-bromuro de amonio (CTAB). La misma consta de los siguientes pasos:

1. Se extrajo el micelio de cada placa de crecimiento monospórico utilizando una espátula, se congeló con nitrógeno líquido y se molió rápidamente en un mortero.
2. Se añadió 1000 µl de buffer de extracción CTAB (800 µl de buffer CTAB (100mM Tris-HCl 20mM y 1,4M NaCl pH 8) + 200 µl de CTAB al 10%) + 1 µl de β mercaptoetanol + 1 % polivinilpirrolidone (PVP).
3. Se continuó rápidamente con la molienda.

4. Se pasó el extracto a un eppendorf de 2 ml y se incubó 30 min a 60°C.
5. Se añadió 600 µl de cloroformo-álcohol isoamílico (12:1 v/v) y se mezcló hasta homogeneizar durante 5 min. por inversión de los tubos.
6. Se centrifugó (Thermo Cientific) 5 min. a 10000g.
7. Se tomó la fase líquida superior y se colocó en un eppendorf de 2 ml.
8. Se precipitó con 2/3 de volumen de isopropanol frío (aproximadamente 500-600 µl) y se colocó en el freezer (Gafa) a -20°C hasta que precipite durante una noche.
9. Se centrifugó 10 min. a 10000g. Se descartó la fase líquida.
10. Se lavó el pellet con 400 µl de etanol 75%- acetato de amonio 10mM. Se golpeó suavemente hasta que se desprendió el pellet.
11. Se centrifugó 10 min. a 10000 g. Se descartó la fase líquida.
12. Se lavó 2 veces el pellet con 300 µl etanol 70% frío. Se golpeó suavemente para que se desprenda el pellet.
13. Se centrifugó 5 min. y se descartó la fase líquida.
14. Se secó el pellet dando vuelta los eppendorf sobre un papel absorbente Whatman N°1.
15. Se resuspendió el pellet en buffer TE 1X. Se utilizaron entre 20 y 70 µl de buffer TE 1X aproximadamente dependiendo del tamaño del pellet obtenido, y se realizaron las diluciones necesarias en cada caso.
16. Se conservó el ADN en freezer a -20°C hasta su utilización.

#### **2.1.2.4.4 Integridad del ADN extraído**

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para confirmar la correcta extracción del ADN de los hongos. Para ello, se preparó el gel (0,8 g de agarosa + 10 µl de gel red (concentración 10.000x) + 20 ml buffer TBE 5X+ 80 ml de agua destilada), se disolvió y se colocó en los soportes con el peine adecuado. Cuando solidificó se llevó con cuidado a la cuba electroforética, la cual contenía el solvente de corrida (20 ml de buffer TBE 5X + 80 ml de agua destilada) y se sacó el peine.

Sobre un parafilm se colocaron 2 µl de azul bromofenol (colorante) por cada muestra a correr. Luego, se tomaron 5 µl de cada muestra y se mezclaron cuidadosamente con el colorante y se sembraron en las diferentes calles del

gel. Se puso en funcionamiento la cuba electroforética a 90 volts durante aproximadamente 40 min. Una vez terminada la corrida se visualizó el gel bajo luz UV utilizando un trasluminador (Labnet).

#### **2.1.2.4.5 Cuantificación del ADN extraído**

La cuantificación del ADN fue llevada a cabo con la ayuda del kit Quant-iT Assays (Invitrogen). Para ello, se establecieron los tubos necesarios para cada muestra (1 por muestra) y para los estándares (dos), y se procedió de la siguiente manera:

1. Se hizo la solución de trabajo Quanti-iT por dilución del reactivo Quanti-iT 1:200 en Quanti-buffer; 200  $\mu$ l de solución de trabajo son requeridos para cada muestra y cada estándar.
2. Se prepararon los tubos de acuerdo a la Tabla 4.
3. Se vortexearon los tubos por 2-3 segundos.
4. Se incubaron los tubos por 2 min. a temperatura ambiente.
5. Se leyeron los tubos en un fluorómetro Qubit (Figura 10).
6. Se multiplicó el resultado por el factor de dilución para determinar la concentración de la muestra original.

**Tabla 4:** Preparación de los tubos de los estándares y de las muestras.

	<b>Estándar</b>	<b>Muestra</b>
<b>Volumen de solución de trabajo</b>	190 $\mu$ l	198 $\mu$ l
<b>Volumen del estándar</b>	10 $\mu$ l	-
<b>Volumen de la muestra</b>	-	2 $\mu$ l
<b>Volumen total en cada tubo</b>	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l

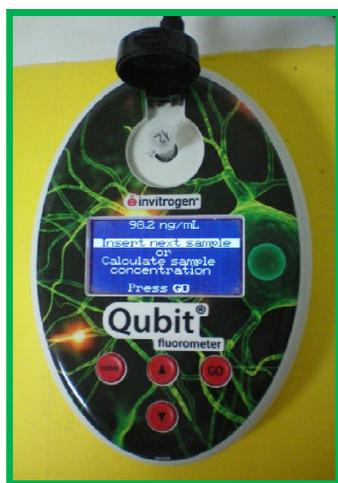


Figura 10: Fluorómetro

#### 2.1.2.4.6 Amplificación del fragmento de $\beta$ tubulina para los aislamientos de *P. nalgiovensis*

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un XP thermal cycler (Bioer Technology Co, Hangzhou, China) para amplificar una parte de la región de la  $\beta$  tubulina (Samson *et al.*, 2004b) (Figura 11), usando los pares de primers Bt2a (5'-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3') y Bt2b (5'-ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC-3') (Glass and Donaldson, 1995).

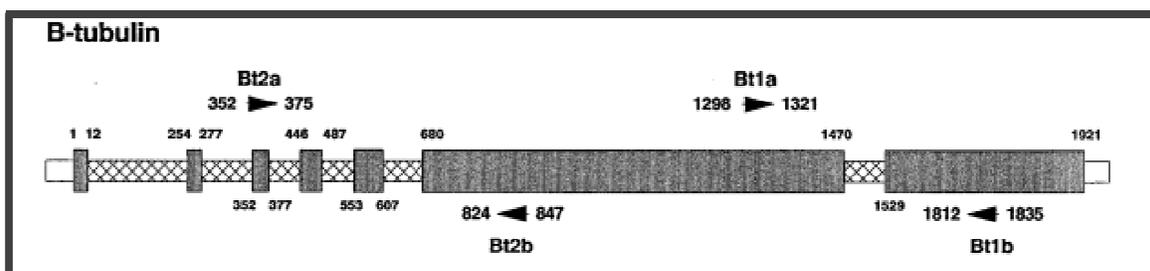


Figura 11: Región del gen de la  $\beta$  tubulina.

Cada reacción de PCR fue llevada a cabo en 50  $\mu$ l de mezcla conteniendo: 2  $\mu$ l del ADN extraído (aproximadamente 10–20 ng), 5  $\mu$ l de buffer de reacción 10X, 2,5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  2,5 mM, 0,3  $\mu$ l de dNTP (0,03 mM de cada uno), 1  $\mu$ l del forward y 1  $\mu$ l reverse primers (1  $\mu$ M cada uno), 0,4  $\mu$ l Taq DNA polimerasa 1 U (Inbio-Highway, Tandil, Argentina), 0,5  $\mu$ l Tween 20; 0,5  $\mu$ l Nonidet P-40, 2,5  $\mu$ l cresol red y 31,8  $\mu$ l de agua destilada estéril. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo usando el siguiente protocolo: un paso

inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min; 35 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 45 s; y una extensión final a 72 °C por 2 min.

#### 2.1.2.4.7 Amplificación del fragmento de ITS para los aislamientos de *A. ochraceus*

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un XP thermal cycler (Bioer Technology Co, Hangzhou, China) para amplificar la región del gen del ADN ribosomal ITS (ITS1-5.8S-ITS2) (Figura 12), utilizando los primers ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'), respectivamente (White *et al.*, 1990).

Cada reacción de PCR fue llevada a cabo en 50 µl de mezcla conteniendo: 2 µl del ADN extraído (aproximadamente 10–20 ng), 5 µl de buffer de reacción 10X, 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 0,3 µl de dNTP (0,03 mM de cada uno), 1 µl del forward y 1 µl reverse primers (1 µM cada uno), 0,4 µl Taq DNA polimerasa 1 U (Inbio-Highway, Tandil, Argentina), 0,5 µl Tween 20; 0,5 µl Nonidet P-40, 2,5 µl cresol red y 31,8 µl de agua destilada estéril. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo usando el siguiente protocolo: un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min; 35 ciclos de 95°C por 30 s, 47°C por 30 s, 72°C por 45 s; y una extensión final a 72 °C por 2 min.

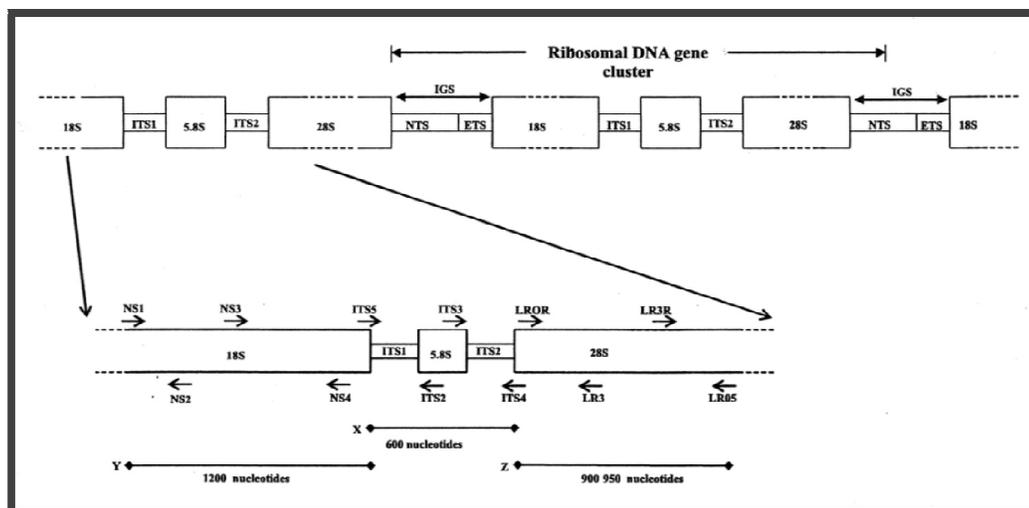


Figura 12: Región ITS del gen del ADN ribosomal.

#### 2.1.2.4.8 Integridad y pureza de los productos de PCR

Para evaluar la integridad y la pureza de los productos de PCR obtenidos se realizó una electroforesis en gel de agarosa (1,5 g de agarosa + 10  $\mu$ l de gel red (concentración 10.000 x) + 80 ml de agua destilada + 20 ml buffer TBE 5 X). Se sembraron 12  $\mu$ l de cada muestra y 3  $\mu$ l de un marcador de peso molecular conocido (Ladder 50pb) el cual abarca el rango de 50-1000 pb. Se puso en funcionamiento la cuba electroforética a 90 volts durante aproximadamente 40 min. Una vez terminada la corrida se visualizó el gel bajo luz UV utilizando un transluminador.

#### 2.1.2.4.9 Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados con ayuda del kit PureLink PCR purification kit (Invitrogen) (Figura 13).



**Figura 13:** Kit de purificación PureLink (Invitrogen).

Para la purificación se procedió de la siguiente manera:

1. Se adicionó 4 volúmenes de buffer binding (B2) con isopropanol a 1 volumen de una muestra de PCR (50-100  $\mu$ l). Se mezcló.

2. Se pipeteó la muestra dentro de una columna PureLink Clean-up Spin en un tubo de lavado. Se centrifugó la columna a 10000 g por 1 min. Se descartó el flujo que pasó a través del filtro.
3. Se re insertó la columna dentro de un tubo de lavado y se adicionó 650 µl de buffer de lavado (W1) con etanol. Se centrifugó la columna a 10000 g por 1 min.
4. Se descartó el flujo que pasó a través de la columna y se la volvió a colocar en el mismo tubo de lavado. Se centrifugó este nuevo tubo a la velocidad máxima por 2-3 min.
5. Se colocó la columna dentro de un tubo de elución de 1,7 ml. Se adicionó 32 µl de buffer de elución (E1) a la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min. y se centrifugó la columna a la velocidad máxima por 1 min.
6. Se almacenaron los tubos con el producto de PCR purificado a -20°C hasta su uso.

#### **2.1.2.4.10 Secuenciación de los productos de PCR**

La secuenciación del ADN, 5´- 3´ y 3´- 5´ fue realizada por Macrogen Inc. (República de Corea).

La identificación de las especies se obtuvo realizando una comparación con las secuencias de la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 'network server' utilizando el algoritmo BLASTX (Altschul *et al.*, 1990). El alineamiento de las secuencias y su comparación se realizó con CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994).

## **2.2 Caracterización de los hongos filamentosos del ambiente de los establecimientos elaboradores**

### **2.2.1 Muestreo**

El muestreo de los hongos filamentosos del ambiente se realizó en 8 diferentes establecimientos elaboradores de salames de Colonia Caroya. El primer muestreo fue realizado en época otoñal, el segundo muestreo fue

realizado en época estival y el tercer muestreo también fue realizado en época estival.

En cada uno de los establecimientos se colocaron placas de Petri de 64 cm<sup>2</sup> de área con MEA en distintos puntos de la fábrica (por duplicado), las cuales se mantuvieron abiertas durante diferentes tiempos de exposición (1- 30 min.). Posteriormente se incubaron todas las placas durante 7 días a 25°C en estufa (Medición y Control) para luego poder realizar el recuento total de los hongos filamentosos. Si bien existen muestreadores de aire, la utilización de placas fue debido a que nuestro propósito era poder analizar qué ocurre naturalmente cuando se cuelgan los salames en la sala de maduración, es por eso que dejamos que las esporas presentes en el aire del sótano se depositaran naturalmente sobre las placas, sin realizar ningún tipo de succión forzada sobre ellas.

Asimismo se muestrearon simultáneamente salames de algunos de los establecimientos analizados para evaluar los hongos del emplume y ver su correlación con los hongos presentes en el ambiente.

### **2.2.2 Recuento, aislamiento e identificación de los hongos**

En el caso de los salames, se realizó el recuento de hongos filamentosos totales tal como fue descrito en el Inciso 2.1.2.1, y en el caso de los hongos del ambiente se realizó un recuento de UFC por área de la placa por tiempo.

Cada morfología diferente en el medio de cultivo se identificó a nivel de género, y aquellas predominantes a nivel de especie (Pitt and Hocking, 2009) según fue descrito en el Inciso 2.1.2.2.

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1 Determinación de la actividad acuosa**

Se observó una disminución de la  $a_w$  de los salames elaborados en verano respecto de los elaborados en invierno de entre el 2 y 10 % aproximadamente, los valores medios encontrados fueron de 0,92 en las

muestras de invierno y 0,86 en las de verano (Tabla 5). Si bien los valores de actividad de agua informados en diferentes trabajos sobre salames suelen ser de aproximadamente 0,89 (López-Díaz, 2002; Muthukumarasamy and Holley, 2006), Colonia Caroya al tener una elaboración del tipo artesanal tiene mucha influencia sobre este factor la temperatura ambiental, por eso podemos ver que durante el verano hay una importante disminución.

**Tabla 5:** Valores promedios de actividad de agua ( $a_w$ ) máximas de los salames de Colonia Caroya de invierno 2010 y de verano 2011.

Elaborador	$a_w$ máxima	
	Invierno 2010	Verano 2011
A	0,91 ± 0,03	0,89 ± 0,02
B	0,86 ± 0,03	0,88 ± 0,03
C	0,91 ± 0,03	0,88 ± 0,03
D	0,90 ± 0,03	0,84 ± 0,02
E	0,92 ± 0,02	0,82 ± 0,01
F	0,95 ± 0,02	0,88 ± 0,03
G	0,94 ± 0,02	0,83 ± 0,03
H	0,93 ± 0,02	0,88 ± 0,02
I	0,93 ± 0,03	0,90 ± 0,02
J	0,92 ± 0,03	0,84 ± 0,03

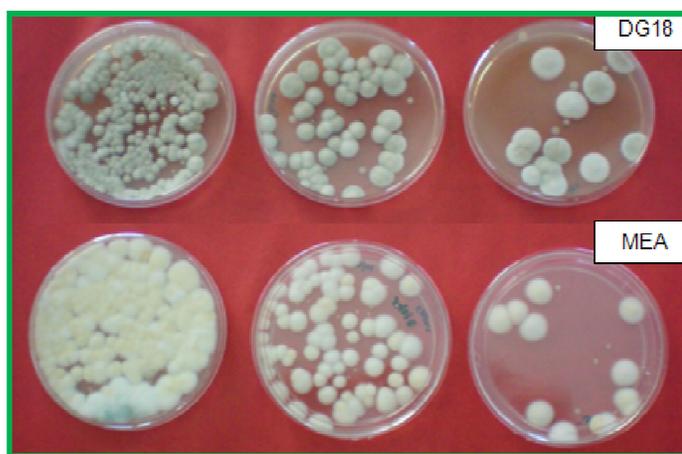
+/-: desviación estándar.

### 3.2 Caracterización de los hongos filamentosos superficiales de los salames

El recuento de los hongos filamentosos superficiales de los embutidos secos elaborados en Colonia Caroya, no mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), utilizando DG18 o MEA como medio de cultivo, tanto en verano como en invierno (Figura 14, Tabla 6). Los promedios para ambas estaciones y en ambos medios estuvieron en el orden de  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup> (Tabla 6).

El recuento total de levaduras superficiales en MEA estuvo en promedio alrededor de  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup> tanto en verano como en invierno (Tabla

7). Si bien estos valores son similares a los encontrados para hongos filamentosos, se debe remarcar que la percepción visual sobre la superficie de los salames es casi exclusiva de los hongos filamentosos.



**Figura 14:** Placas de petri correspondientes a las diluciones de los recuentos de hongos filamentosos en MEA y DG18 de una tripa de un salame.

**Tabla 6:** Recuentos de hongos filamentosos (UFC cm<sup>-2</sup>) de salames de Colonia Caroya elaborados en invierno y en verano, en dos medios de cultivo (DG18 y MEA).

Parámetros	Invierno 2010 / 2012		Verano 2011 / 2012	
	DG18	MEA	DG18	MEA
N° de muestras	57	57	36	36
Recuento menor (UFC cm <sup>-2</sup> )	2,1 10 <sup>5</sup>	1,0 10 <sup>5</sup>	1,8 10 <sup>6</sup>	2,2 10 <sup>6</sup>
Recuento mayor (UFC cm <sup>-2</sup> )	2,1 10 <sup>9</sup>	2,3 10 <sup>9</sup>	6,5 10 <sup>8</sup>	7,2 10 <sup>8</sup>
Recuento promedio (UFC cm <sup>-2</sup> )	2,1 10 <sup>8</sup>	1,5 10 <sup>8</sup>	2,6 10 <sup>8</sup>	1,7 10 <sup>8</sup>

Las especies fúngicas aisladas en ambos medios de cultivo se muestran en forma compilada en la Tabla 8, con su correspondiente frecuencia (Fr.) y densidad relativa (Dr.) y en forma detallada en el Anexo II.

**Tabla 7:** Recuentos de levaduras (UFC cm<sup>-2</sup>) de salames de Colonia Caroya elaborados en invierno y en verano, en MEA.

Parámetros	Invierno 2010 / 2012	Verano 2011 / 2012
N° de muestras	57	36
Recuento menor (UFC cm <sup>-2</sup> )	4,9 10 <sup>5</sup>	5,6 10 <sup>4</sup>
Recuento mayor (UFC cm <sup>-2</sup> )	1,3 10 <sup>9</sup>	1,4 10 <sup>9</sup>
Recuento promedio (UFC cm <sup>-2</sup> )	1,3 10 <sup>8</sup>	1,6 10 <sup>8</sup>

**Tabla 8:** Frecuencia y densidad relativa de los hongos filamentosos aislados de los salames elaborados en Colonia Caroya (Córdoba).

Género	Especie	Invierno 2010 n=39			Invierno 2012 n=18			Verano 2011 n=20			Verano 2012 n=16		
		N° aislam.	Fr (%)	Dr (%)	N° aislam.	Fr (%)	Dr (%)	N° aislam.	Fr (%)	Dr (%)	N° aislam.	Fr (%)	Dr (%)
<i>Penicillium</i>	<i>nalgiovense</i>	50	100	76,9	20	100	66,7	21	90	42	19	100	48,7
	<i>simplicissimum</i>	1	2,6	1,5	3	16,7	10	0	0	0	0	0	0
	<i>fellutatum</i>	0	0	0	0	0	0	1	5	2	0	0	0
	<i>brevicompactum</i>	2	5,1	3,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>implicatum</i>	1	2,6	1,5	0	0	0	1	5	2	2	12,5	5,1
	<i>olsonii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6,2	2,6
	<i>citreonigrum</i>	0	0	0	0	0	0	2	10	4	0	0	0
<i>Aspergillus</i>	<i>ochraceus</i>	0	0	0	0	0	0	18	90	36	13	81,2	33,3
	<i>aculeatus</i>	1	2,6	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mucor</i>	<i>hiemalis</i>	1	2,6	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>racemosus</i>	5	12,8	7,7	4	22,2	13,3	4	20	8	0	0	0
	<i>circinelloides</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	18,7	7,7
<i>Cladosporium</i>	<i>cladosporioides</i>	0	0	0	1	5,5	3	2	10	4	1	6,2	2,6
<i>Scopulariopsis</i>	<i>candida</i>	3	7,7	4,6	2	11	6,7	0	0	0	0	0	0
<i>Geotrichum</i>	<i>candidum</i>	0	0	0	0	0	0	1	5	2	0	0	0
<i>Eurotium</i>	<i>rubrum</i>	1	2,6	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total aislamientos		65			30			50			39		

Fr: Frecuencia relativa

Dr: Densidad relativa

Todas las especies fueron identificadas utilizando las claves taxonómicas de Pitt and Hocking (2009). Para ello es necesario, luego de la incubación en los distintos medios de cultivo (MEA, CYA y GN25), a las diferentes temperaturas (5, 25, 37°C) observar tanto características macroscópicas como microscópicas. En las Tablas 9 y 10 se muestran las características macroscópicas generales observadas para el caso de las 2 especies predominantes en este trabajo: *P. nalgiovense* y *A. ochraceus*.

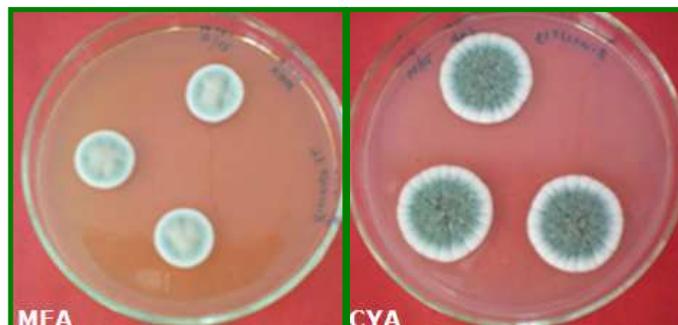
**Tabla 9:** Características macroscópicas observadas, que concuerdan mayoritariamente con las descriptas para *P. nalgiovense* (Pitt and Hocking, 2009).

<i>P. nalgiovense</i>			
Exámen Macroscópico	CYA	MEA	GN25
Diámetro (mm)	28 – 35	10 – 30	14 – 22
Color	Blanco – Verde	Blanco - Verde	Blanco – Verde
Aspecto	Surcado	Flocoso - Surcado	Surcado
Reverso	Amarillo – Dorado	Naranja – Marrón	Amarillo – Marrón
Exudado	Si – No	No	No
Pigmento	No	No	No
A 37°C	No crece	-	-
A 5°C	Germinal	-	-

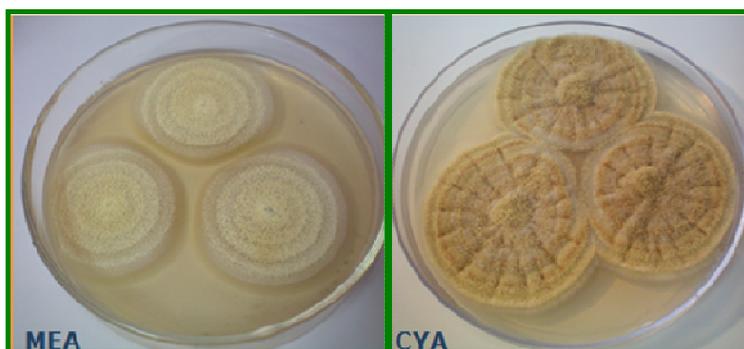
**Tabla 10:** Características macroscópicas observadas, que concuerdan mayoritariamente con las descriptas para *A. ochraceus*. (Pitt and Hocking, 2009).

<i>A. ochraceus</i>			
Exámen Macroscópico	CYA	MEA	GN25
Diámetro (mm)	40–45	40–55	20-30
Color	Amarillo–Dorado	Amarillo	Amarillo
Aspecto	Radiado, surcado, polvoriento.	Radiado, polvoriento.	Radiado, polvoriento.
Reverso	Naranja–Marrón	Dorado–Marrón	Amarillo–Marrón
Exudado	Si–No	No	No
Pigmento	No	No	No
A 37°C	Crece 0–30 mm	-	-
A 5°C	No crece	-	-

En las Figuras 15 y 16 se pueden observar estas 2 especies luego del crecimiento por 7 días a 25°C en MEA y CYA.



**Figura 15:** Apariencia macroscópica de *P. nalgiovensis* (biotipo 4), incubado por 7 días a 25°C.

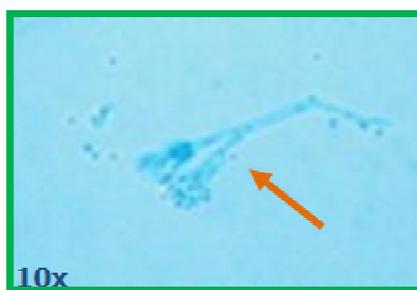


**Figura 16:** Apariencia macroscópica de *A. ochraceus*, incubado por 7 días a 25°C.

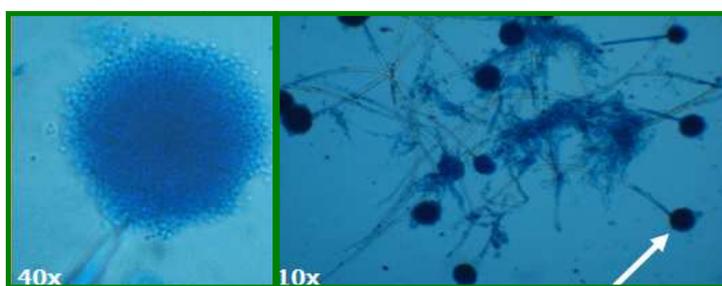
En cuanto a las características microscópicas generales de *P. nalgiovensis* (Figura 17) se distingue por conidióforos terverticilados o tetraverticilados, hialinos, septados, con paredes lisas. Las estipes comúnmente tienen un largo de 150-400  $\mu\text{m}$ . Las métulas miden alrededor de 7-15 x 2,5-3  $\mu\text{m}$ , las cuales dan inicio a 2-6 fiálides, las cuales poseen forma de botella de 7 -10  $\mu\text{m}$  de longitud. Los conidios son esféricos o sub esféricos, hialinos, con paredes lisas y miden alrededor de 2,8-4  $\mu\text{m}$  de diámetro (Pitt and Hocking, 2009; Samson *et al.*, 2000).

En cuanto a las características microscópicas de *Aspergillus ochraceus* (Figura 18), posee una vesícula esférica, hialina de hasta 60  $\mu\text{m}$  de diámetro, finamente rugosa. Posee estructura biseriada. Las fiálides crecen sobre las métulas, 11 x 2,0  $\mu\text{m}$ . Las métulas miden aproximadamente 15 x 5,0-5,5  $\mu\text{m}$ . Posee conidios esféricos a sub-esféricos, de 3,5-5,0  $\mu\text{m}$  de diámetro, hialinos,

de paredes finamente rugosas o lisas (Pitt and Hocking, 2009; Samson *et al.*, 2000).



**Figura 17:** Microscopía de *P. nalgiovense*.



**Figura 18:** Microscopía de *A. ochraceus*.

Observando la Tabla 8, vemos que en los 39 salames elaborados en invierno 2010, se encontraron e identificaron un total de 65 aislamientos de hongos filamentosos. Estos aislamientos pertenecieron a 6 géneros fúngicos y 9 especies, de las cuales 5 pertenecían a *Penicillium*. El resto de las especies pertenecieron a los géneros: *Aspergillus*, *Mucor*, *Scopulariopsis* y *Eurotium*.

En el verano de 2011, de los 20 salames analizados se encontraron 52 aislamientos, los cuales pertenecieron a 5 géneros fúngicos y 8 especies, dentro de estas se identificaron 7 especies diferentes de *Penicillium*. El resto de las especies pertenecieron a los géneros: *Aspergillus*, *Mucor*, *Cladosporium* y *Geotricum*. De los 52 aislamientos obtenidos las especies predominantes fueron *Penicillium nalgiovense* con un densidad relativa del 42 % y *Aspergillus ochraceus* con una densidad relativa del 36%.

En el segundo invierno (2012), de los 18 salames analizados se encontraron 30 aislamientos, los cuales pertenecieron a 4 géneros fúngicos y 5 especies, dentro de las cuales se encontraron 2 especies diferentes de

*Penicillium*. El resto de las especies pertenecieron a los géneros: *Mucor*, *Cladosporium* y *Scopulariopsis*.

En el segundo verano (2012), de los 16 salames analizados se encontraron 39 aislamientos, los cuales pertenecieron a 4 géneros fúngicos y 6 especies, dentro de las cuales se identificaron 3 especies diferentes de *Penicillium*. El resto de las especies pertenecieron a los géneros: *Aspergillus*, *Mucor* y *Cladosporium*. Al igual que en el verano 2011, se encontraron principalmente las especies de *P. nalgiovense* y *A. ochraceus* con densidades relativas similares al año anterior (48,7% y 33,3 % respectivamente), lo cual nos muestra que no se encontraron diferencias entre un verano y el siguiente.

En cuanto a las especies minoritarias encontradas en este trabajo, algunas ya han sido reportadas por otros autores como parte de la micoflora de embutidos secos fermentados de otras partes del mundo. *Penicillium fellutatum*, *Penicillium implicatum* y *Penicillium brevicompactum* han sido aisladas de embutidos secos fermentados elaborados en Argentina (Castellari *et al.*, 2010; Ludemann *et al.*, 2004). A su vez, *P. brevicompactum* también fue aislada de salames uruguayos (Galvalisi *et al.*, 2012) y salames Italianos (Andersen, 1995; Grazia *et al.*, 1986). En el caso de *Penicillium olsonii* es una de las especies más frecuentemente encontrada en este tipo de productos, después de *P. nalgiovense*; la misma fue aislada de salames de España (López Díaz *et al.*, 2001), de Italia (Andersen, 1995; Iacumin *et al.*, 2009; Perrone *et al.*, 2015), de Grecia (Papagianni *et al.*, 2007) y de Argentina (Ludemann *et al.*, 2004; Castellari *et al.*, 2010). En la actualidad se ha aislado de salames italianos una nueva especie estrechamente relacionada con *P. olsonii*, a la cual denominaron *P. salamii* (Perrone *et al.*, 2015). En cuanto a *Cladosporium cladosporioides* fue aislado de embutidos secos elaborados en Grecia (Papagianni *et al.*, 2007), en España (López Díaz *et al.*, 2001) y en Noruega (Asefa *et al.*, 2009). En el caso de *Penicillium citreonigrum*, no hay reportes en la actualidad que hayan reportado esta especie en salames, pero si fue encontrada en jamones italianos (Comi *et al.*, 2013). Especies del género *Mucor* han sido encontradas en diferentes embutidos analizados en el mundo (Grazia *et al.*, 1986; Andersen, 1995; López Díaz *et al.*, 2001; Papagianni *et al.*, 2007; Castellari *et al.*, 2010), en nuestro trabajo hemos aislado 3 especies de este género: *M. hiemalis*, *M. racemosus* y *M. circinelloides*.

Las especies del género *Mucor*, tuvieron una densidad relativa cercana al 10% en ambas estaciones, pero solo cuando se utilizó MEA como medio para su enumeración y aislamiento. Si bien, como se mencionó anteriormente, no hay diferencias significativas en el orden de los recuentos entre los medios, la utilización de DG18 resulta indispensable, ya que en muchas ocasiones los recuentos en MEA no se pueden realizar, debido a que las placas se encuentran contaminadas y colonizadas en su totalidad por hongos del género *Mucor* (Figura 19). Estos hongos pertenecen al orden de los *Zygomycetes*. Poseen hifas no tabicadas, lo cual les facilita su rápido crecimiento. Poseen micelios vellosos y voluminosos (Pitt and Hocking, 2009), que dificultan muchas veces el recuento y/o aislamiento de otras cepas que crecen a menor velocidad.



**Figura 19:** Placa de Petri de MEA obtenida del recuento de hongos filamentosos de la tripa de un salame, colonizada íntegramente por un hongo del género *Mucor*.

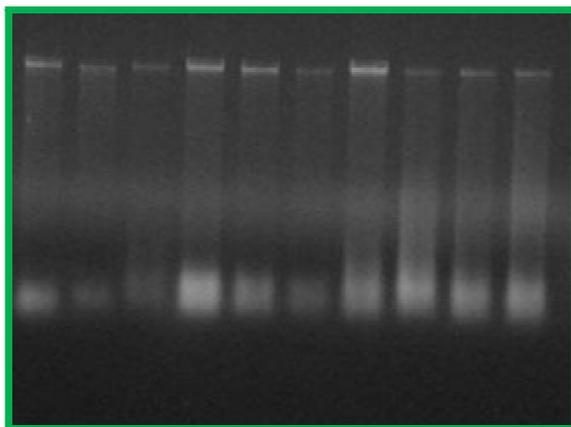
En el caso de *Geotrichum candidum* fue encontrada en salames de Grecia (Papagianni *et al.*, 2007). *Eurotium rubrum* ha sido aislada de embutidos cárnicos italianos (Iacumin *et al.*, 2009; Andersen, 1995). En el caso de las especies *Aspergillus aculeatus* y *Scopulariopsis candida*, hasta el momento, no han sido reportadas en trabajos de micoflora de embutidos secos.

Si bien en nuestro trabajo se encontraron en total 16 especies distintas, sólo 2 de ellas predominan de forma absoluta en función de la estación del año analizada. En invierno, *Penicillium nalgiovense* apareció en la totalidad de las muestras analizadas con una densidad relativa promedio del 71,8%.

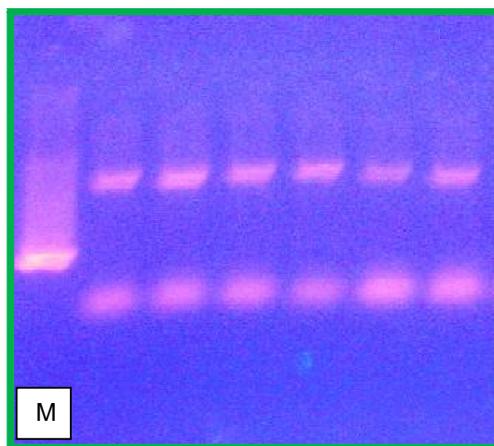
El 19% de los aislamientos identificados como *P. nalgiovense* mediante las claves taxonómicas de Pitt and Hocking (2009) fueron analizados por

biología molecular para confirmar su identidad. La extracción del ADN fue exitosa en todos los aislamientos analizados (Figura 20).

La amplificación del ADN extraído utilizando los cebadores Bt2a y Bt2b, permitió obtener una única banda de 495 pb (Figura 21).



**Figura 20:** Visualización del gel perteneciente a la extracción de ADN de 10 aislamientos de *P. nalgioense*.



**Figura 21:** Visualización del gel del producto de PCR de 6 cepas de *P. nalgioense*. M: marcador molecular.

Las secuencias obtenidas en nuestro trabajo mostraron un 99-100% de similitud con varias secuencias de *P. nalgioense* cargadas en el GenBank (Tabla 11), las cuales habían sido aisladas de diferentes matrices en diferentes partes del mundo.

**Tabla 11:** Referencia de acceso al GenBank de las secuencias de *P. nalgiovense* obtenidas y porcentaje de homología con secuencias similares.

Id Aislamiento	Especie	Biotipo	Homología Blast (%)	Ref. de acceso a GenBank de secuencias similares	Ref. de acceso a GenBank de nuestros aislamientos
SCEM92	<i>P. nalgiovense</i>	4	100	JF909956	KC295422
SCSU72	<i>P. nalgiovense</i>	4	100	JX996837	KC295423
SCR31	<i>P. nalgiovense</i>	4	100	JX996825	KC295424
SCLC101	<i>P. nalgiovense</i>	4	99	AY371601	KC295425
SCSU73	<i>P. nalgiovense</i>	4	100	JF909956	KC295426
SCCEN63	<i>P. nalgiovense</i>	4	100	JX996837	KC295427
SCG81	<i>P. nalgiovense</i>	4	100	JX996825	KC295428
SCA52	<i>P. nalgiovense</i>	4	100	JX996837	KC295429
SC9/773	<i>P. nalgiovense</i>	4	100	JF909956	KC295430
SCCEN61	<i>P. nalgiovense</i>	6	100	JX996825	KC295431
SC9/782	<i>P. nalgiovense</i>	6	100	JX996825	KC295432
SCDA62	<i>P. nalgiovense</i>	4	100	JF909956	KC295433
SCG111	<i>P. nalgiovense</i>	6	100	JX996837	KC295434
SCLC22	<i>P. nalgiovense</i>	6	100	KF225059	No cargada
SCDA31	<i>P. nalgiovense</i>	6	100	KF225060	No cargada
SCCEN22	<i>P. nalgiovense</i>	6	96	KF225059	No cargada
SCG13	<i>P. nalgiovense</i>	6	100	KF225059	No cargada
SCDJ11	<i>P. nalgiovense</i>	6	100	KF225059	No cargada
SC9/741	<i>P. nalgiovense</i>	6	99	JX996837	No cargada
SCR22	<i>P. nalgiovense</i>	6	100	KF225059	No cargada
MOLD 600	<i>P. nalgiovense</i>	6	100	KF225059	No cargada
SCF71	<i>P. nalgiovense</i>	4	100	KF225059	No cargada

Por ejemplo, las cepas SCR31, SCG81, SCCen61 y SC9/782 mostraron un 100% de similitud con una cepa de *P. nalgiovense* aislada de un salame de Alemania (CBC 109610) (Houbraken *et al.*, 2012). La cepa SCDA31 tuvo un 100% de similitud con una cepa de *P. nalgiovense* (UBOCC A 101431) perteneciente a la Universidad de Bretagne Occidental de Francia, la cual fue aislada de un producto cárnico. Las cepas SCEM92, SCSU73, SC9/773 y SCDA62 mostraron un 100% de similitud con una cepa de *P. nalgiovense* aislada de queso Ellischauer (CBS 352.487 o NRRL 911), el cual es un queso similar al camembert que se elabora tradicionalmente en la región Nalzovy de República Checa (Houbraken *et al.*, 2011), y la cepa SCLC101 mostró un 99% de similitud con esta misma cepa (Scott *et al.*, 2004). Así es, que esta especie, es frecuentemente encontrada en matrices tales como quesos y carnes (Wicklow and Rebar, 1988).

A su vez la mayoría de los aislamientos dieron un 99% de similitud con secuencias de la especie *P. dipodomys* (Ej., números de acceso AY495992, AY495989, JF909950), la cual es normalmente encontrada en ambientes desérticos sobre acúmulo de semillas. En relación a las características distintivas, *P. dipodomys* crece a 37°C, a diferencia de *P. nalgiovense* (Frisvad and Samson, 2004a). Debido a que nuestros aislamientos no crecieron a 37°C y fueron aislados de productos cárnicos, es adecuado considerar que estos aislamientos corresponden a la especie *P. nalgiovense*. Algunas de las secuencias generadas en este estudio fueron depositadas en el GenBank con los números de acceso: KC295422- KC295434 (Figura 22). Las secuencias completas se muestran en el Anexo III.

Si bien, los resultados encontrados en este trabajo en relación a la especie mayormente encontrada *P. nalgiovense*, son concordantes con el tipo de especie predominante en la gran mayoría de los trabajos realizados en otras regiones geográficas del mundo, es disímil respecto al porcentaje de dicha predominancia. Según Andersen (1995) y Iacumin (2009) la predominancia máxima de *P. nalgiovense* representó un 50% y un 16% respectivamente, del total del total de hongos filamentosos para salames elaborados en el norte de Italia. Ludemann *et al.* (2004) informó un 20 % de densidad relativa de dicha especie para salames comerciales y 15% para salames artesanales, todos elaborados en Argentina. Según Asefa *et. al* (2009) *P. nalgiovense* fue la especie dominante representando un 38% de los aislamientos en productos ahumados y sin ahumar provenientes de Noruega; Sonjak *et. al* (2011) encontró en salames de Eslovenia una densidad relativa máxima del 51% para *P. nalgiovense*. Y en el caso de López Díaz *et. al* (2001) la especie más encontrada fue *P. commune* obteniendo una densidad relativa del 33% en productos embutidos españoles. De esta manera, podemos observar que en ninguna de las regiones analizadas se obtuvo un valor tan alto para *P. nalgiovense* o para la especie predominante en cada caso.



Los resultados obtenidos en nuestro trabajo muestran una alta predominancia de *P. nalgiovense* sin la utilización de cultivos comerciales iniciadores de emplume, ni tampoco inoculaciones intencionales con cepas autóctonas. La alta predominancia encontrada de *P. nalgiovense* podría deberse a que la elaboración de salames en Colonia Caroya tiene más de 100 años de antigüedad, es decir que los sótanos de maduración están ampliamente colonizados por esta cepa.

Además, otro aspecto positivo a resaltar es que dicha especie hasta el momento no está reportada como toxicogénica.

En cuanto a la frecuencia de aparición *Penicillium nalgiovense* fue encontrado en casi el 100% salames analizados en ambas estaciones y en los diferentes muestreos, siendo el biotipo 4 el más frecuentemente encontrado (79% en invierno y 77% en verano) (Tabla 12). Este biotipo, a diferencia del usado comercialmente (biotipo 6), da una coloración blanquecina grisácea en la superficie de los salames (Figura 23), pero en MEA su coloración es verdosa azulada (Figura 24). El biotipo 6 en cambio, da una coloración blanquecina en los salames y también sus colonias en MEA son blancas (Figura 24).

**Tabla 12:** Diferentes biotipos de *Penicillium nalgiovense* aislados de salames de Colonia Caroya.

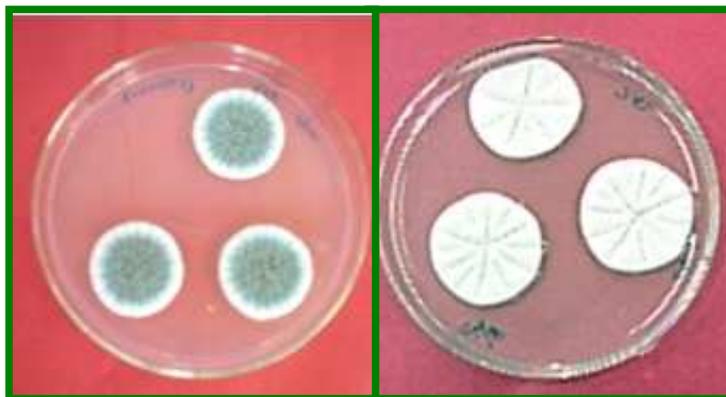
Biotipo	Invierno 2010		Invierno 2012		Verano 2011		Verano 2012	
	N° aislam.	Dr.(%)	N° aislam.	Dr.(%)	N° aislam.	Dr.(%)	N° aislam.	Dr.(%)
1	5	10	0	0	2	9,5	0	0
3	2	4	0	0	0	0	0	0
4	34	68	18	90	15	71,4	16	84,2
6	9	18	2	10	4	19	3	15,8

Dr: Densidad Relativa



**Figura 23:** Predominancia de *P. nalgiovense* biotipo 4 sobre la superficie del salame.

Por otro lado en verano, se encontró que entre la especie *Penicillium nalgioense* y *Aspergillus ochraceus*, reúnen un total de 78% de la flora total para febrero 2011, (42% para *Penicillium nalgioense* y 36% para *Aspergillus ochraceus*) y un total de 82% para marzo 2012 (48,7% para *Penicillium nalgioense* y 33,3% para *Aspergillus ochraceus*).



**Figura 24:** Biotipo 4 (izquierda) y biotipo 6 (derecha) de *P. nalgioense* desarrollados en MEA, 7 días a 25°C.

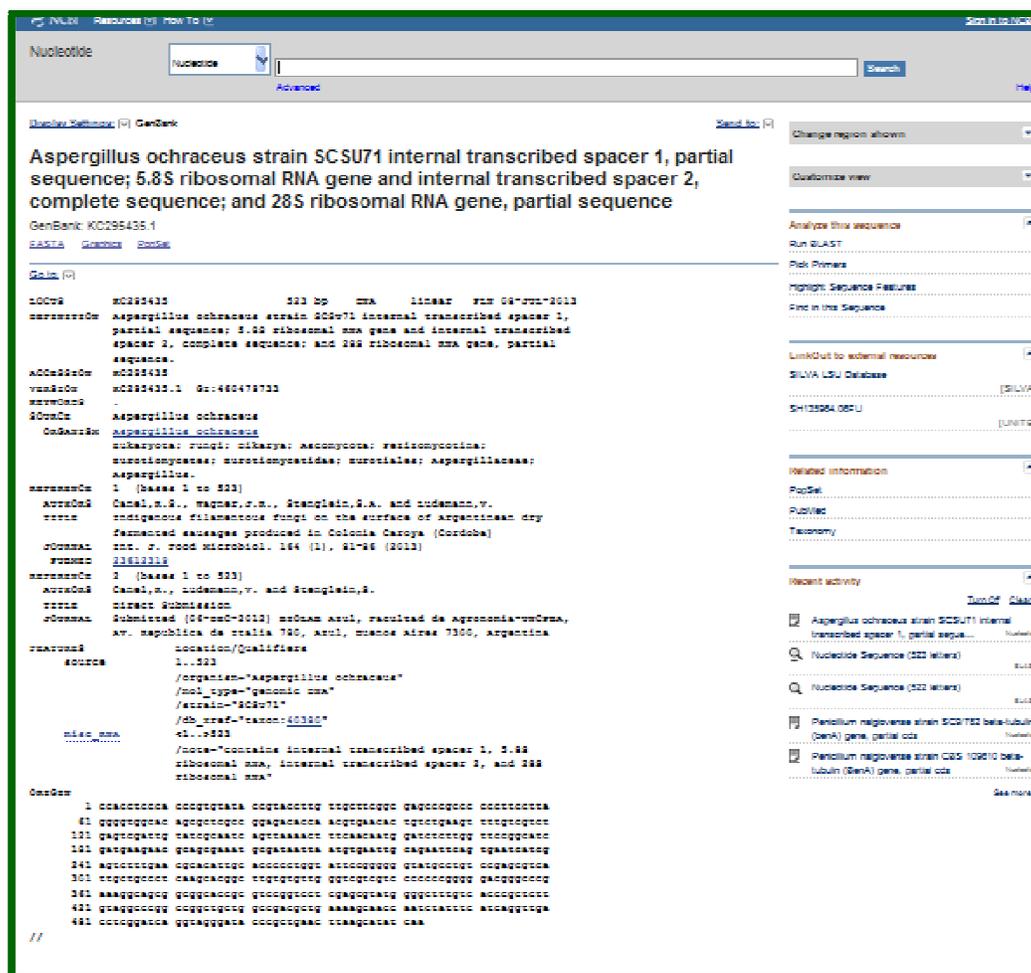
El 19% de los aislamientos identificados como *Aspergillus ochraceus* mediante las claves taxonómicas de Pitt and Hocking (2009) fueron analizados por biología molecular para confirmar su identidad. La extracción del ADN fue exitosa en todos los aislamientos analizados. La amplificación del ADN extraído utilizando los cebadores ITS4 e ITS5, permitió obtener productos de PCR que mostraron una única banda cercana a 600 pb.

Las secuencias obtenidas para los aislamientos identificados morfológicamente como *A. ochraceus* tenían un 99-100% de similitud con varias secuencias del GenBank de *A. ochraceus* (Tabla 13) y especies relacionados como *A. westerdijkiae* (Ej. números de acceso JN793950, FM986325, FM986326). *A. ochraceus* crece a 37°C, a diferencia de *A. westerdijkiae* (Pitt and Hocking, 2009). Además *A. westerdijkiae* es una especie normalmente encontrada en granos de café verde (Pitt and Hocking, 2009). Debido a que nuestros aislamientos provenían de embutidos y los mismos crecían a 37°C, fue que se descartó la especie *A. westerdijkie*.

**Tabla 13:** Referencia de acceso al GenBank de las secuencias de *A. ochraceus* obtenidas y porcentaje de homología con secuencias similares.

Id Aislamiento	Especie	Homología Blast (%)	Ref. de acceso a GenBank de secuencias similares	Ref. de acceso a GenBank de nuestros aislamientos
SCSU71	<i>Aspergillus ochraceus</i>	100	JX523615	KC295435
SC9/772	<i>Aspergillus ochraceus</i>	100	GU134890	KC295436
SCDA71	<i>Aspergillus ochraceus</i>	100	AY373854	KC295437
SCV71	<i>Aspergillus ochraceus</i>	100	JX523615	KC295438
SCEM91	<i>Aspergillus ochraceus</i>	99	JX523615	KC295439
SCLC71	<i>Aspergillus ochraceus</i>	100	GU134890	KC295440

Las secuencias obtenidas para cada uno de los aislamientos de *A. ochraceus* analizados fueron depositadas en el GenBank (Figura 25). Las secuencias completas obtenidas en este trabajo se muestran en el Anexo III.



**Figura 25:** Ejemplo de acceso al GenBank del aislamiento de *A.ochraceus* SCSU71.

Entre las cepas de *A. ochraceus* depositadas en el GenBank y que encontramos 100% de similitud con las cepas aisladas de los salames caroyenses, ninguna de ellas fue aislada de un embutido cárnico. La cepa AY373854 (ATCC 18412) fue aislada de lúpulo cervecero, la cepa JX523615 de una medicina fermentada de china y la cepa GU134890 de una planta.

Otros trabajos en esta línea, también han encontrado especies contaminantes de *Aspergillus*, pero ningún trabajo informa tan alta incidencia. Castellari *et al.* (2010) han encontrado *A. ochraceus* sólo durante los meses de verano, pero frecuencia del 22%, considerando los embutidos de maduración larga. En el resto de los trabajos se ha encontrado alguna especie de *Aspergillus* pero con muy baja densidad relativa: Hwang (1993) 2,4%, Andersen (1995) 4%, Ludemann (2004) 10%, Asefa (2009) 0,7%, Iacumin (2009) 10% y Sonjak (2011) 7%.

*Aspergillus ochraceus* fue aislado con una frecuencia del 80-90 % en los salames caroyenses elaborados en verano. Sin embargo, no fue encontrado en ninguna de las muestras de invierno.

La aparición de *Aspergillus ochraceus* en los salames de verano podría atribuirse a la elevada temperatura ambiente, lo cual favorece el desarrollo de este hongo, cuya temperatura óptima de crecimiento es 30°C (Pitt and Hocking, 2009). Además, estas altas temperaturas conducen a que los salames tengan una baja  $a_w$ , tal como se observó en la Tabla 5, cual también favorece el desarrollo de este hongo xerófilo.

En la Tabla 14 se resume el porcentaje de contaminación de *Aspergillus ochraceus*, expresado como el recuento de dicha especie/ recuento de los hongos filamentosos totales.

**Tabla 14:** Incidencia de *Aspergillus ochraceus* (%) sobre el total de los hongos filamentosos de la superficie de salames elaborados en Colonia Caroya en los veranos 2011/ 2012.

Elaborador	Muestra	Verano 2011		Verano 2012	
		Tripa	% <i>A. ochraceus</i>	Tripa	% <i>A. ochraceus</i>
A	A1	N	7,7	N	2,3
	A2	N	5,6	N	<1,3
B	B1	N	2,5	S	<0,9
	B2	S	8,1	N	<2,6
C	C1	N	6,5	N	77
	C2	Nd	Nd	N	90
D	D1	S	9,7	Nd	Nd
	D2	S	2,5	Nd	Nd
E	E1	N	29	N	<2,5
	E2	N	30	S	<2,1
F	F1	S	93	Nd	Nd
	F2	S	54	Nd	Nd
G	G1	N	80	N	32
	G2	N	80	N	16
H	H1	N	55	N	2,4
	H2	N	75	N	7,6
I	I1	N	21	N	75
	I2	N	<0,2	N	14
J	J1	N	86	N	87
	J2	N	60	N	90
	J3	N	80	Nd	Nd

S: tripa sintética; N: tripa natural. Nd: No determinado.

En el verano 2011 el 60% de los salames analizados presentaron niveles entre el 21-93% de *A. ochraceus*, mientras que en el verano 2012, el 50% de los salames analizados presentaron niveles entre 14-90%.

Se pudo establecer que los salames con un porcentaje de contaminación por *Aspergillus ochraceus* mayor al 55%, presentaban un emplume amarillento dorado bien visible y desarrollo micelial flocoso (Figura 26), característico de este hongo. Por lo que podemos ver que en el verano 2011, 4 elaboradores tenían problemas perceptibles con esta especie (F, G, H y J), mientras que en el verano 2012, 3 elaboradores (C, I y J) tenían problemas con este hongo. Por lo que podemos observar que sólo el establecimiento J tuvo problemas de

contaminación superficial de los salames con la especie *A. ochraceus* en ambos veranos. Hay que remarcar que estos productos no eran comercializados por lo cual las pérdidas económicas de dichos elaboradores eran altas. No se encontró una correlación entre el uso de tripa natural o sintética y el porcentaje de *A. ochraceus* encontrado. El desarrollo de este hongo sobre la superficie de los salames caroyenses es una problemática que aqueja en verano a algunos de los elaboradores de la Colonia desde hace varios años. La misma, es denominada por ellos como “mufa amarilla”.



**Figura 26:** Predominancia de *Aspergillus ochraceus* (90%) sobre la superficie de un salame elaborado en verano.

### 3.3 Caracterización de los hongos filamentosos del ambiente de los establecimientos elaboradores

En el primer muestreo realizado en época otoñal se analizaron los hongos filamentosos del aire de 3 elaboradores de salames de Colonia Caroya (A, F y G). Se muestrearon durante 30 min. diferentes partes de cada sitio elaborador: salas de elaboración, salas de venta, sótanos, etc.

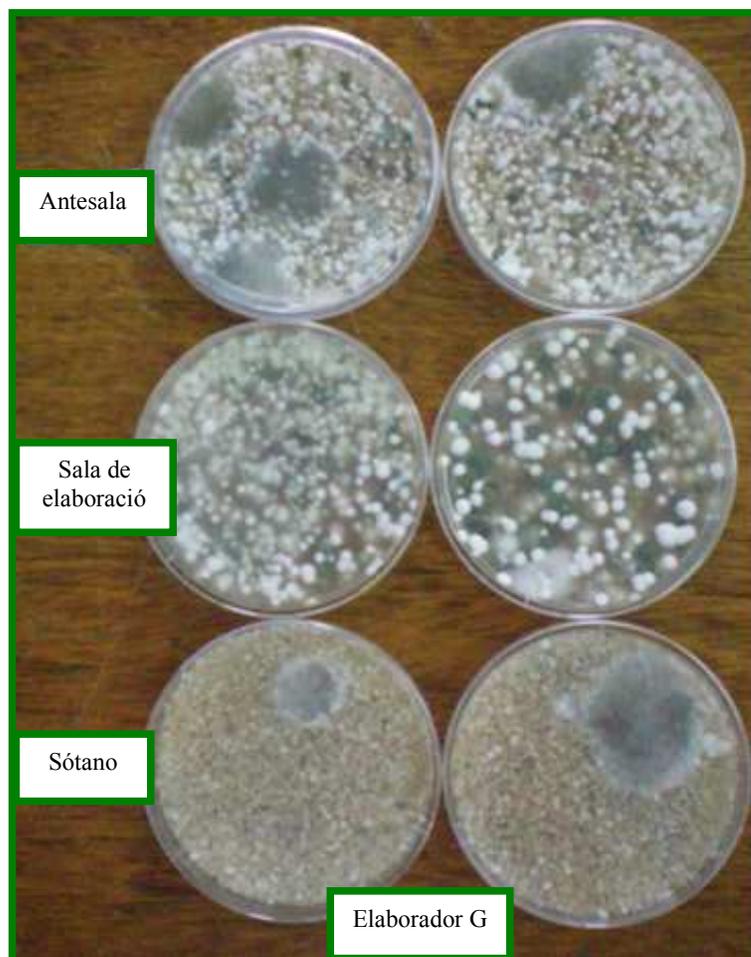
Se pudo observar que el tiempo de exposición de las placas fue excesivo para los 3 establecimientos y en todos los sitios muestreados, ya que las UFC por placa superaban ampliamente al máximo de 100 UFC/ placa que es lo recomendado (ICSMF, 2000). Si bien por este motivo fue difícil realizar recuentos fúngicos, se pudo apreciar que la biodiversidad de hongos en los 3 sitios era relativamente baja. Esto se diferencia de lo observado por Castellari *et al.* (2010), quienes analizaron las especies fúngicas presentes en el aire de 5 establecimientos productores de salames de la zona de Tandil (Argentina), colocando placas de MEA y DG18 durante 30 min. en diferentes puntos de los sótanos y observando una alta biodiversidad fúngica (15 especies diferentes).

En el caso del establecimiento F, tanto en el sótano como en el sitio “tipo sótano” que es una cámara de maduración que también utilizan, se observó casi un 100% de predominio de *P. nalgiovense*. En la antesala y en la sala de venta también hay un alto predominio de esta especie, pero aparecen algunas otras especies minoritarias, identificando algunas de estas como *Cladosporium*, el cual es un género que suele aislarse del aire (Pitt and Hocking, 2009). Un dato importante a evaluar es que en ninguno de los sitios muestreados de este establecimiento apareció *A. ochraceus*, es decir la especie fúngica implicada en los problemas de mufa amarilla (Figura 27). Hay que tener en cuenta que este análisis fue realizado en época otoñal, donde todavía las temperaturas ambientes no son tan altas.



**Figura 27:** Biodiversidad fúngica del aire (por duplicado) de diferentes sitios del establecimiento F en época otoñal.

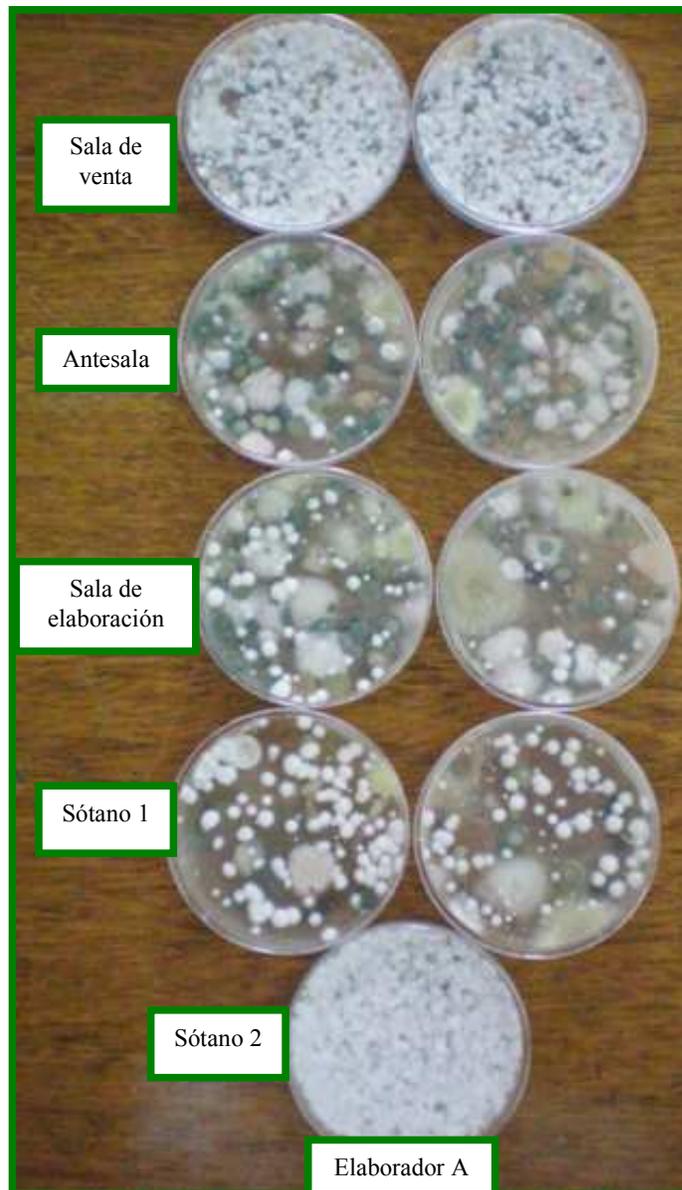
En el caso del establecimiento G, se observó la aparición de *A. ochraceus* en todos los sectores muestreados, pero especialmente en la antesala y en el sótano. La biodiversidad fúngica, al igual que en el sitio elaborador anterior, también es baja. Además de *Aspergillus ochraceus* se encontró *P. nalgiovense*, *Cladosporium cladosporioides* y *Mucor racemosus* (Figura 28).



**Figura 28:** Biodiversidad fúngica del aire (por duplicado) de diferentes sitios del establecimiento G en época otoñal.

Por último en este primer muestreo, el establecimiento A mostró recuentos similares entre el sótano 1, la sala de elaboración y la antesala (aproximadamente 100 UFC/ 64 cm<sup>2</sup>), encontrando en el sótano 1 un predominio de *P. nalgiovense*, seguida de algunas especies minoritarias, entre las que se encontraban algunas del género *Cladosporium*. El sótano 2 y la sala

de venta tienen un predominio casi exclusivo de *P. nalgiovense*. En ninguno de los sitios muestreados se observó la aparición de *A. ochraceus* (Figura 29).



**Figura 29:** Biodiversidad fúngica del aire (por duplicado, excepto el sótano 2) de diferentes sitios del establecimiento A en época otoñal.

La especie predominante en este primer muestreo ambiental realizado en otoño fue *P. nalgiovense*, lo cual concuerda con lo informado por Catellari *et al.* (2010) y por Perrone *et al.* (2015), quienes también estudiaron

los hongos filamentosos del aire de los sótanos pertenecientes a plantas elaboradoras de chacinados de Argentina (Tandil) y de Italia respectivamente. Este resultado nos demuestra que los tipos de hongos encontrados en el aire de los sótanos de los establecimientos elaboradores de salames de Colonia Caroya son prácticamente los mismos que los encontrados en la superficie de los salames, ya que la especie *P. nalgiovense* fue encontrada en casi el 100% de los salames caroyenses analizados.

En cuanto, al segundo muestreo, el cual fue realizado en época estival se muestrearon los sótanos de 6 establecimientos elaboradores. El tiempo de exposición de las placas se redujo a 1 minuto. Asimismo se tomaron salames a fin de correlacionar los datos de la micoflora del aire con la que se encontraba en ese momento en la superficie de los productos.

Se pudo establecer que el tiempo de exposición de 1 minuto para las placas fue suficiente, ya que los recuentos del aire estuvieron entre 9 y 108 UFC/64 cm<sup>2</sup> (Tabla 15). En cuanto a los recuentos fúngicos de la superficie de los salames dieron un promedio en el orden de 10<sup>8</sup> UFC/cm<sup>2</sup>. No se encontró una correlación entre los recuentos fúngicos del aire del sótano y del salame del mismo elaborador. Sin embargo, sí se encontró una correlación entre las especies fúngicas encontradas en el aire y en el salame, predominando *P. nalgiovense* en ambos casos. Esta especie representó entre el 48 y 97% de la micoflora del aire y entre el 74 y 100% en los salames, siendo el biotipo 4 el más encontrado. Sólo un salame de los analizados presentó otra especie (*A. ochraceus*) como mayoritaria. *A. ochraceus* apareció en todas las muestras de aire analizadas, representando entre el 3 y el 30% de la micoflora presente, pero solo apareció en 2 salames, en uno de ellos representando un bajo nivel (3%) y en el otro siendo la especie principal (73%). Este último salame concuerda que tiene altos niveles de contaminación con este hongo tanto en el aire del sótano como en el producto. En términos generales, la biodiversidad fúngica hallada fue muy baja, ya que entre las especies *P. nalgiovense* y *A. ochraceus* representaron en promedio casi el 90% de la micoflora hallada tanto en el aire del sótano como en la superficie de los salames (Tabla 15 y 16).

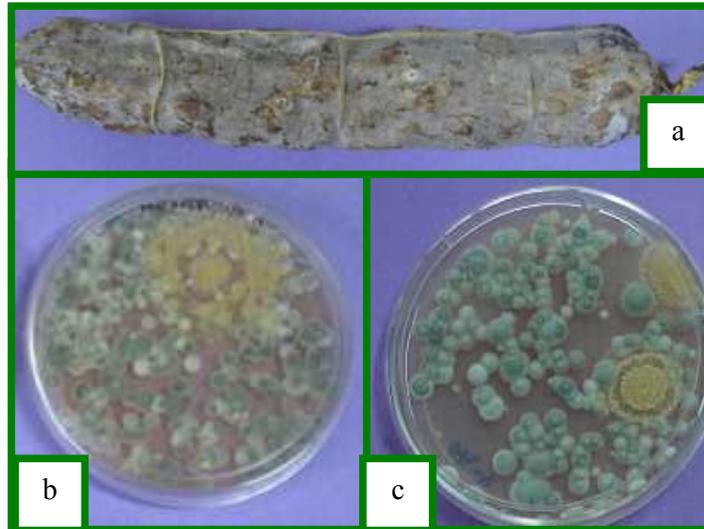
**Tabla 15:** Recuentos (UFC/64 cm<sup>2</sup>) fúngicos del aire de los sótanos (promedios) en verano de diferentes elaboradores de salames de Colonia Caroya y % respecto al recuento total de las diferentes especies aisladas.

Establecimiento	Recuento total del aire del sótano (UFC/64 cm <sup>2</sup> )	% <i>P. nalgiovensis</i> biotipo 4	% <i>P. nalgiovensis</i> biotipo 6	% <i>A.ochraceus</i>	% otras especies
A	108	77	17	6	0
C	36	78	19	3	0
G	72	97	0	1,5	1,5
J	64	84	6	8	2
K	9	56	0	11	33
L	23	0	48	30	22

**Tabla 16:** Recuentos fúngicos superficiales de salames de verano (UFC/cm<sup>2</sup>) de diferentes elaboradores y % respecto al recuento total de las diferentes especies aisladas.

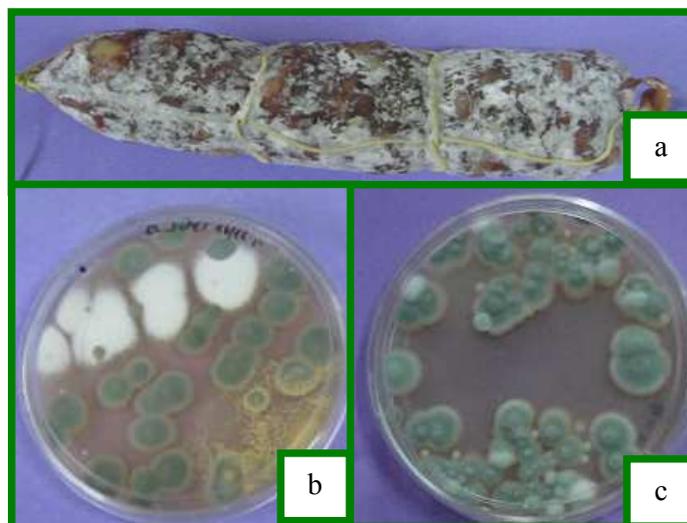
Establecimiento	Recuento total por salame (UFC/cm <sup>2</sup> )	% <i>P. nalgiovensis</i> biotipo 4	% <i>P. nalgiovensis</i> biotipo 6	% <i>A.ochraceus</i>	% otras especies
A	1,8 10 <sup>9</sup>	69	25	0	6
C	9,3 10 <sup>7</sup>	58	42	0	0
G	1,4 10 <sup>7</sup>	97	0	3	0
J	4,4 10 <sup>8</sup>	70	4	0	26
K	2,6 10 <sup>9</sup>	58	18	0	24
L	1,5 10 <sup>7</sup>	0	18	73	9

En el caso del establecimiento G, el muestreo ambiental mostró una baja biodiversidad fúngica, predominando en un 97% *P. nalgiovensis*. Se encontró minoritariamente la especie *A. ochraceus* (Tabla 15). Ambas especies fueron también encontradas en el salame muestreado en proporciones muy similares (Tabla 16, Figura 30). Respecto al muestreo anterior, realizado en época otoñal, este elaborador redujo considerablemente los niveles de contaminación del aire del sótano con *A. ochraceus*.



**Figura 30:** a) Salame del establecimiento G. b) Recuento ambiental de aire del sótano. c) Recuento fúngico total de la superficie del salame.

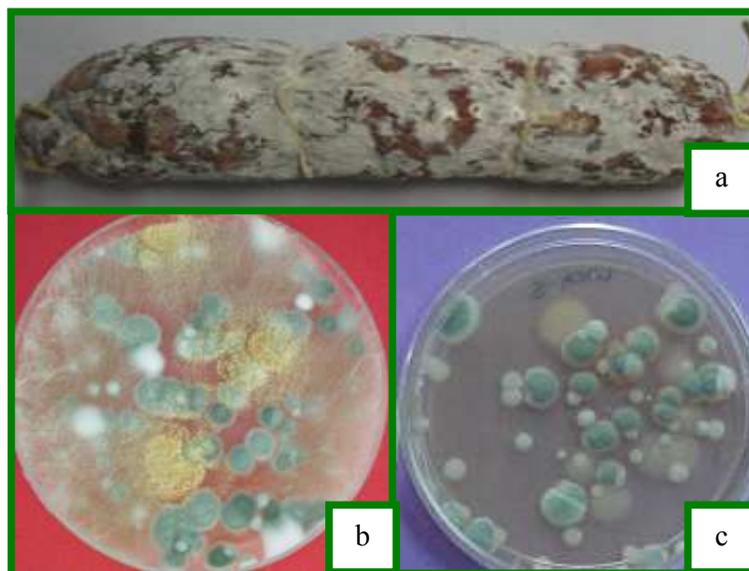
En el caso del establecimiento C, el muestreo ambiental también mostró una baja biodiversidad fúngica, predominando en un 97% *P. nalgiovense* (biotipo 4 y 6). Se encontró minoritariamente la especie *A. ochraceus* (Tabla 15). La especie *P. nalgiovense* también fue la predominante en la superficie del salame muestreado (100% de predominancia), pero *A. ochraceus* no fue aislada del producto (Figura 31).



**Figura 31:** a) Salame del establecimiento C. b) Recuento ambiental de aire del sótano. c) Recuento fúngico total de la superficie del salame.

En el caso del establecimiento L, el muestreo ambiental también mostró una baja biodiversidad fúngica, predominando en un 48% *P. nalgiovense*. La especie *A. ochraceus* se encontró en un 30% y las especies minoritarias representaron un 22%, entre las que se encontraban especies de *Cladosporium* (Tabla 15). En el caso del salame de dicho elaborador, la especie predominante fue *A. ochraceus* (73% de predominancia), seguida por *P. nalgiovense* (18%) y las especies minoritarias representaron el 9% restante.

En cuanto al establecimiento J, el muestreo ambiental también mostró una baja biodiversidad fúngica, predominando en un 90% *P. nalgiovense*. La especie *A. ochraceus* se encontró en un 8% y la especie minoritaria representó un 2%, siendo la misma perteneciente al género *Mucor* (Figura 32). En el caso del salame de dicho elaborador, la especie predominante fue *P. nalgiovense* (74% de predominancia) y las especies minoritarias representaron el 26% restante. *A. ochraceus* no fue aislada del salame en este caso.

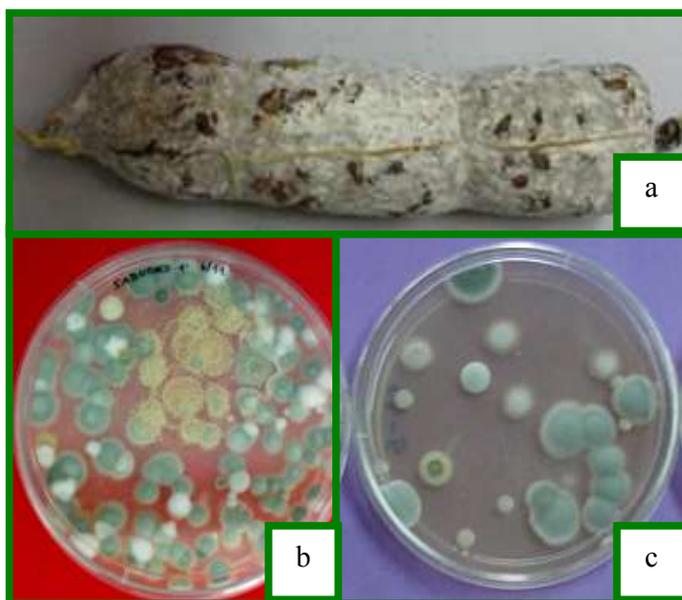


**Figura 32:** a) Salame del establecimiento J. b) Recuento ambiental de aire del sótano. c) Recuento fúngico total de la superficie del salame.

El establecimiento K mostró un 56% de predominancia de la especie *P. nalgiovense* en el aire del sótano, seguida de otras especies con un 33%, entre las que se encontraba especies del género *Cladosporium* y por últimos se encontró la especie *A. ochraceus* con un 11% (Tabla 15). En cuanto al salame

analizado de dicho elaborador, el 76% de los hongos filamentosos superficiales estaban conformados por *P. nalgiovense* y el 24% restante por otras especies minoritarias entre las que se encontraban especies del género *Cladosporium*. La especie *A. ochraceus* no fue aislada de la superficie de los productos.

Por último, el establecimiento A mostró un 94% de predominancia de la especie *P. nalgiovense* en el aire del sótano, seguida de la especie *A. ochraceus* con un 6% (Tabla 15). En cuanto al salame analizado de dicho elaborador, el 94% de la micoflora estaba conformada por *P. nalgiovense* y el 6% restante por las especies minoritarias (Figura 33). La especie *A. ochraceus* no fue aislada de la superficie de los productos (Tabla 16).



**Figura 33:** a) Salame del establecimiento A. b) Recuento ambiental de aire del sótano. c) Recuento fúngico total de la superficie del salame.

En el tercer muestreo realizado también en época estival se muestrearon los sótanos de 6 establecimientos elaboradores. El tiempo de exposición de las placas fue de 1 minuto, igual que en el muestreo anterior. Asimismo se tomaron salames a fin de correlacionar los datos de los hongos filamentosos del aire con los que se encontraban en ese momento en la superficie de los productos.

En 4 establecimientos el tiempo de exposición de las placas fue suficiente, dando valores entre 15 y 60 UFC/64 cm<sup>2</sup>. Sin embargo, en 2 establecimientos, este tiempo fue excesivo (Tabla 17).

Nuevamente, en cuanto a los recuentos fúngicos de la superficie de los salames dieron un promedio en el orden de 10<sup>8</sup> UFC/cm<sup>2</sup>, igual que en el muestreo anterior realizado en la misma época del año. No se encontró una correlación entre los niveles de recuentos fúngicos del aire del sótano y del salame del mismo elaborador, excepto en el caso del establecimiento I, el cual obtuvo el mayor recuento fúngico para el salame y en el aire fue incontable la carga fúngica en 1 minuto de exposición. Sin embargo, sí se encontró una correlación entre las especies fúngicas encontradas en el aire y en el salame, igual que en el muestreo anterior, predominando *P. nalgiovense* en casi todos los casos. Esta especie representó entre el 7 y 97% de los hongos filamentosos del aire, siendo en promedio de 62%, y entre el 8 y 100% en los salames, siendo en promedio de 83%. *A. ochraceus* apareció en todas las muestras de aire analizadas, representando entre el 1,5 y el 41% del total de hongos filamentosos presentes, pero solo apareció en 3 salames, en dos de ellos representando un bajo nivel (3 y 7%) y en el tercero siendo la especie principal (92%). Este último salame concuerda que tiene altos niveles de contaminación con este hongo tanto en el aire del sótano como en el producto, y además en el muestreo anterior dieron casi exactamente los mismos resultados. En términos generales, la biodiversidad fúngica hallada fue muy baja, ya que entre las especies *P. nalgiovense* y *A. ochraceus* representaron en promedio casi el 77% de la micoflora hallada en el aire del sótano y casi el 99% del total de la micoflora encontrada en la superficie de los salames (Tabla 18).

En cuanto al establecimiento A, la especie predominante tanto en el aire del sótano como en el salame fue *P. nalgiovense*, mostrando entre un 87% y 100% de predominancia. La coloración superficial blanquecina del salame demostraba la predominancia del biotipo 6 de dicha especie (Figura 34). En el aire del sótano también apareció en menor medida *A. ochraceus* (7%) y otras especies (6%), pero estas no fueron encontradas en el salame.

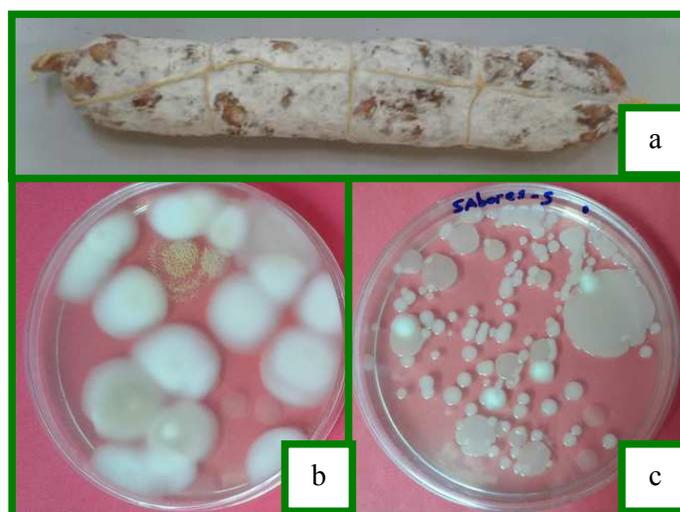
**Tabla 17:** Recuentos fúngicos (UFC/64 cm<sup>2</sup>) del aire de los sótanos en verano (promedios) de diferentes elaboradores de salames de Colonia Caroya y % respecto al recuento total de las diferentes especies aisladas.

Establecimiento	Recuento total del aire del sótano (UFC/64 cm <sup>2</sup> )	% <i>P. nalgiovense</i>	% <i>A. ochraceus</i>	% otras especies
A	15	87	7	6
C	>100	nd	nd	nd
I	>100	nd	nd	nd
J	60	97	1,5	1,5
K	15	7	13	80
L	27	56	41	3

nd: no determinado.

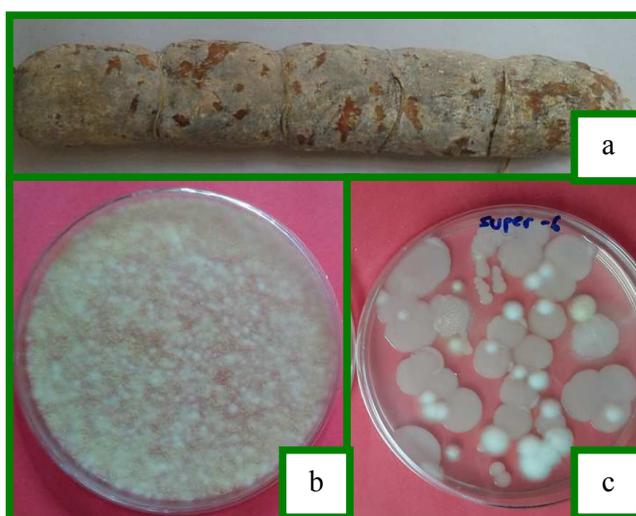
**Tabla 18:** Recuentos fúngicos (UFC/cm<sup>2</sup>) de la superficie de salames de diferentes elaboradores en verano y % respecto al recuento total de las diferentes especies aisladas.

Establecimiento	Recuento total por salame (UFC/cm <sup>2</sup> )	% <i>P. nalgiovense</i>	% <i>A. ochraceus</i>	% otras especies
A	3,4 10 <sup>6</sup>	100	0	0
C	1,8 10 <sup>8</sup>	93	7	0
I	7,9 10 <sup>8</sup>	96	3	1
J	1,4 10 <sup>8</sup>	100	0	0
K	2,2 10 <sup>8</sup>	100	0	0
L	1,0 10 <sup>8</sup>	8	92	0



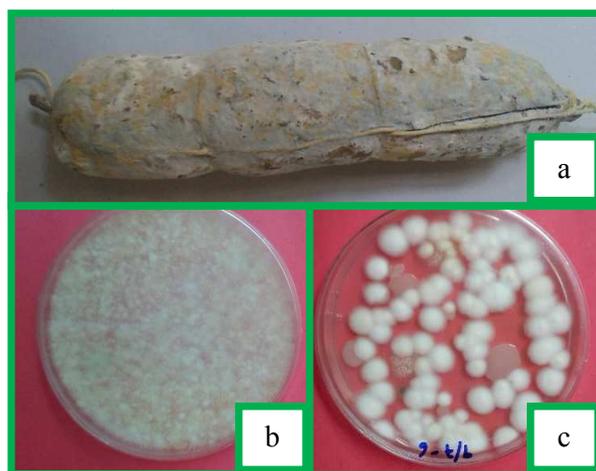
**Figura 34:** a) Salame del establecimiento A. b) Recuento ambiental de aire del sótano. c) Recuento fúngico total de la superficie del salame.

En el establecimiento C, igual que en el establecimiento I, tampoco se pudo realizar un recuento de la carga fúngica del aire, debido a la saturación de colonias en la placa (Figura 35). Pero se pudo visualizar que las especies predominantes eran *P. nalgiovense* y *A. ochraceus*, al igual que en el caso del establecimiento I. En el caso del salame del establecimiento C, se observaban en la superficie del producto algunas pintitas amarillas (Figura 34) que mostraban la presencia seguramente de *A. ochraceus*. Los resultados en este corroboraron que esta especie se encontraba en una baja proporción (7%) y la especie predominante era nuevamente *P. nalgiovense* (93%).



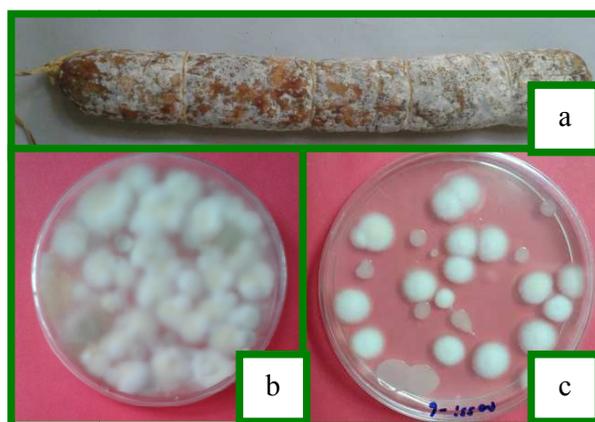
**Figura 35:** a) Salame del establecimiento C. b) Recuento ambiental de aire del sótano. c) Recuento fúngico total de la superficie del salame.

Tal como se mencionó anteriormente, en el establecimiento I no se pudo realizar un recuento de la carga fúngica del aire, ya que con 1 minuto de exposición de la placa, la misma se saturó de colonias. Pero se pudo visualizar que las especies predominantes eran *P. nalgiovense* y *A. ochraceus*. En el caso del salame de dicho establecimiento, se observaban en la superficie del producto pintitas amarillas (Figura 36) que mostraban la presencia seguramente de *A. ochraceus*. Los resultados en este corroboraron que esta especie se encontraba en una baja proporción (3%) y la especie predominante era nuevamente *P. nalgiovense* (96%).



**Figura 36:** a) Salame del establecimiento I. b) Recuento ambiental de aire del sótano. c) Recuento fúngico total de la superficie del salame.

En cuanto al establecimiento J la especie predominante tanto en el aire del sótano como en el salame fue *P. nalgiovensis*, mostrando un 97% y 100% de predominancia respectivamente. En el aire del sótano también apareció como especie minoritaria (1,5%) *A. ochraceus*, pero la misma no fue hallada en el salame (Figura 37).



**Figura 37:** a) Salame del establecimiento J. b) Recuento ambiental de aire del sótano. c) Recuento fúngico total de la superficie del salame.

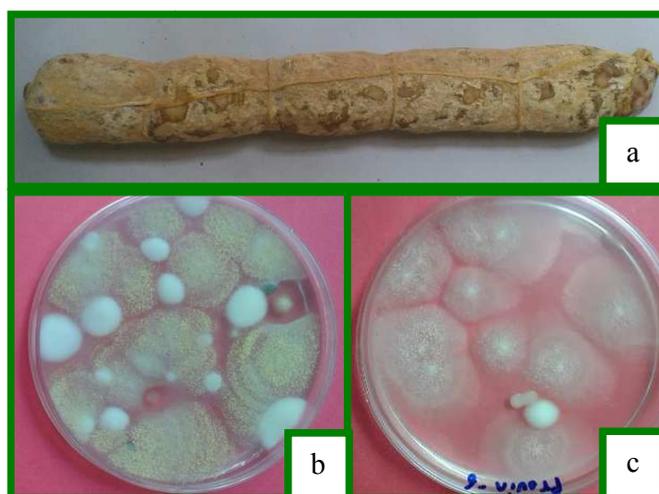
En cuanto al establecimiento K, *P. nalgiovensis* y *A. ochraceus* fueron las especies minoritarias en el aire del sótano (Figura 37), a diferencia de todos los resultados expuestos hasta aca. En el caso del salame de este elaborador *P. nalgiovensis*, fue la única especie hallada (100% de predominancia) (Figura

38). Por lo cual, este sería el único caso en donde no concuerda de manera tan exacta la diversidad fúngica encontrada en el aire y en la superficie del producto.



**Figura 38:** a) Salame del establecimiento K. b) Recuento ambiental de aire del sótano. c) Recuento fúngico total de la superficie del salame.

El establecimiento L mostró una alta predominancia de *A. ochraceus* tanto en el salame (92%) como en el aire del sótano (41%) (Tablas 17 y 18). El salame presentaba una coloración amarillenta dorada en toda su superficie (Figura 39), lo cual se vio reflejado en los resultados, ya que la especie *A. ochraceus* representó el 92% del total de hongos filamentosos. *P. nalgiovensis* fue la segunda especie más encontrada, representando un 56% en el aire y un 8% en el salame.



**Figura 39:** a) Salame del establecimiento L. b) Recuento ambiental de aire del sótano. c) Recuento fúngico total de la superficie del salame.

Como conclusión del muestreo ambiental realizado, podemos observar que las especies fúngicas presentes en el aire de los sótanos de los sitios elaboradores de salames de Colonia Caroya, son prácticamente las mismas que las aisladas de la superficie de los salames. A veces, se observa que la especie *A. ochraceus* se encuentra en el aire pero no en el producto, esto podría explicarse ya que si bien las esporas se encuentran presentes en el aire, las mismas no pueden desarrollar sobre el producto debido a que las temperaturas usualmente usadas durante la maduración de estos productos es de 15-17°C, las cuales no favorece el desarrollo de este hongo.

## CAPITULO II

### INOCULACIÓN INTENCIONAL DE *P. NALGIOVENSE* EN UN SÓTANO DE MADURACIÓN

#### 1. OBJETIVO ESPECÍFICO

El objetivo de este capítulo fue disminuir la predominancia de *Aspergillus ochraceus* sobre los salames producidos en un establecimiento elaborador de Colonia Caroya.

#### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

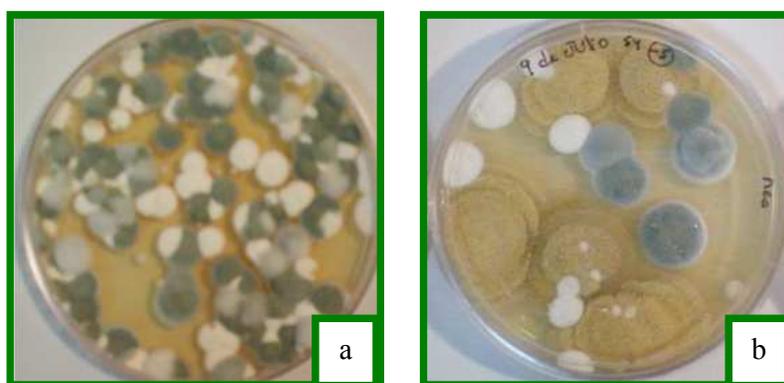
##### 2.1 Inoculación intencional de *P. nalgiovensis* en un sótano de maduración

Durante los meses de bajas temperaturas, éste elaborador tenía salames con una micoflora casi exclusivamente conformada por *P. nalgiovensis* biotipo 4 y biotipo 6 (Figura 40 a), lo cual daba como resultado un salame con coloración grisácea blanquecina. Pero en época estival, además de estas dos especies aparecía en muy alta frecuencia la especie *A. ochraceus* (Figura 40 b), la cual era la responsable del color amarillento dorado indeseable en la superficie del producto.

Se decidió trabajar con la inoculación intencional en el sótano de maduración de dicho elaborador en primavera, para ver como repercutía la misma con la llegada de las temperaturas ambientales más altas, donde los problemas con esta especie se acentuaban.

Debido a que no contábamos, previo a este ensayo, con muestreo del aire del sótano de dicho elaborador, fue que se decidió inocular la micoflora típica de estos salames en las mismas proporciones halladas en el producto, en el aire del sótano. Esto se basó en los resultados obtenidos en los muestreos ambientales de otros elaboradores (ver Capítulo I, Inciso 3.3), donde se pudo concluir que las especies fúngicas halladas en el aire del sótano eran prácticamente las mismas que las encontradas en los salames y estas tenían una predominancia muy similar. Teniendo en cuenta esto, es que se

reactivaron en MEA dos cepas de *P. nalgiovense*: SC9/752 (biotipo 4) y SC9/741 (biotipo 6) aisladas previamente de salames de dicha planta elaboradora y oportunamente guardadas en el cepario del Laboratorio de Micología de Alimentos de la UNQ. Luego de 7 días de incubación a 25°C, se prepararon suspensiones de esporas en agua destilada estéril de cada uno de los biotipos, de aproximadamente  $1 \times 10^7$  esporas/ml y se mezclaron ambas suspensiones en proporción 1:1 para obtener una suspensión mezcla. La misma fue verificada en placa, dando casi idéntica cantidad de ambos biotipos ( $7,8 \times 10^4$  esporos/ml del biotipo 4 y  $8,5 \times 10^4$  esporos/ml del biotipo 6).



**Figura 40:** Desarrollo de colonias en MEA de dos tripas de salames del mismo elaborador, a) sin mufa amarilla (salame elaborado en invierno) y b) con mufa amarilla (salame elaborado en verano).

Considerando que necesitábamos tener cultivos de *P. nalgiovense* activos, de fácil transporte desde Buenos Aires a Colonia Caroya, se decidió utilizar la metodología de crecimiento de los hongos sobre membranas de papel, lo cual fue previamente estudiado por nuestro grupo de trabajo (Ludemann *et al.*, 2010). Para ello, se cortaron discos de papel Whatman N° 1 del mismo diámetro que el interior de las placas de Petri. Los mismos se sumergieron completamente en agua destilada y se autoclavaron. Una vez solidificado el MEA en las placas de Petri se colocó una membrana estéril sobre el medio con la ayuda de pinzas estériles y espátula de Drigalsky para lograr la completa adhesión de la membrana al medio. Luego, se inoculó 1 ml de la suspensión mezcla sobre las placas con membrana y se dispersó el inóculo con espátula de Drigalsky. Se inocularon en total 16 placas con

membrana. Luego de 7 días de incubación a 25°C, con ayuda de pinzas estériles se removieron las membranas con el hongo crecido (Figura 41), y se colocaron dentro de bolsas de plástico estériles con cierre, las cuales fueron transportadas hacia Colonia Caroya refrigeradas.



**Figura 41:** Extracción de la membrana de papel, con el hongo crecido, del medio de cultivo.

En el establecimiento elaborador, para garantizar el éxito de la inoculación a llevarse a cabo, en primer lugar se desinfectó el sótano de maduración del establecimiento con aproximadamente 35 litros de lavandina diluida al 10%. El sótano consta de 2 habitaciones divididas por una pared, comunicadas por una abertura entre ellas. Las dimensiones de cada habitación del sótano son de aproximadamente 4,2 x 5 x 2,8 metros. También la sala de goteo fue desinfectada utilizando lavandina diluida.

Tres días después de la desinfección, se extrajeron las esporas de las membranas agregando 1 litro de agua destilada a la bolsa que las contenía, agitando y frotando las membranas durante 5 min. Posteriormente, se agregó el resto del agua para llegar a un volumen final de 10 litros. Se estimó que la concentración final de la suspensión que se inoculó fue de  $2,7 \cdot 10^{10}$  esporas/ml. Esta estimación se basó en un trabajo realizado por Ludemann *et al.* (2010). Posteriormente, se inoculó la suspensión mezcla de hongos mediante un

pulverizador de 10 litros (Figura 42), tanto en el sótano de maduración como en la sala de goteo.



**Figura 42:** Elaborador pulverizando la suspensión de esporas de *P. nalgiovense* en el sótano de maduración y en la sala de goteo.

Al día siguiente se llevó al sótano una producción de salames preparados hacía 48 hs, los cuales se encontraban en la etapa de goteo.

Luego de 3 meses, se colocaron placas en distintas posiciones del sótano por duplicado y se abrieron durante 5, 10 y 15 min. Se incubaron las mismas durante 7 días a 25°C y se realizó el recuento total de hongos filamentosos. Aquellas morfologías diferentes en el medio de cultivo se identificaron a nivel de especie según Pitt and Hocking (2009).

Una vez verificado el desequilibrio fúngico generado en el aire del sótano (ver Resultados y Discusión), se decidió realizar una segunda inoculación intencional con *P. nalgiovense* biotipo 6 para tratar de balancear nuevamente los hongos del ambiente del sótano y lograr tener nuevamente salames blanquecinos grisáceos, sin mufa amarilla.

Lo primero que se hizo, antes de la segunda inoculación, fue realizar dos limpiezas del sótano con lavandina diluida al 10%. Posteriormente se pintó el sótano con cal y se aplicó con rodillo el antifúngico DMC Protec (Marca Arysa) (Anexo IV). La composición de este producto se basa en copolímeros vinílicos, cargas inorgánicas, colorante (dióxido de titanio) y biocida. El mismo se utiliza como fungicida, bactericida y alguicida de interiores. Está especialmente recomendado para la protección de paredes en cámaras frigoríficas, secaderos, salas de manipulación y de embalaje de alimentos. Se

recomienda dar una primera mano en la pared diluyendo el producto con agua al 70% y una segunda mano al 95%, y dejar secar al menos 3 hs. a temperatura ambiente.

Por otro lado, se reactivó en MEA la cepa SC9/741 de *P. nalgiovense* biotipo 6. Se preparó una suspensión en agua destilada estéril de  $10^7$  esporas/ml, y se inoculó 1 ml en MEA con membrana, por triplicado. Las tres membranas fueron extraídas del medio con pinzas estériles y puesta en bolsas de stomacher con 1 litro de agua destilada estéril. Se homogeneizaron durante 5 min. y se adicionaron los 4 litros de agua restantes. La concentración estimada de la suspensión resultante estuvo en el orden de  $10^9$  esporas/ml. Dicha suspensión fue inoculada en todo el sótano de maduración mediante un pulverizador. Al día posterior de la inoculación se volvió hacer un recuento de la carga fúngica del aire.

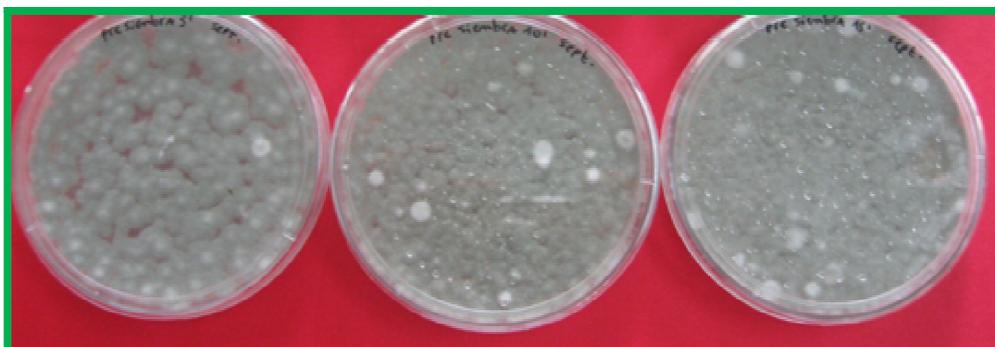
Veinte días después de esta segunda inoculación se volvió a realizar un recuento e identificación a nivel de especie (Pitt and Hocking, 2009) de la carga fúngica del aire del sótano de maduración y de los salames de dicho elaborador.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Inoculación intencional de *P. nalgiovense* en un sótano de maduración

Luego de 3 meses de realizar la primer inoculación intencional con la mezcla de *P. nalgiovense* biotipo 4 y 6, los salames comenzaron a tener una coloración superficial verde indeseable, lo cual demostraba que se había generado un desequilibrio fúngico en el ambiente del sótano, ya que por alguna razón el biotipo 4 se asentó en mayor medida que el biotipo 6. Al realizar un recuento de los hongos filamentosos presentes en el aire del sótano, se corroboró el desequilibrio fúngico, encontrándose un altísimo predominio y una muy alta concentración de *P. nalgiovense* biotipo 4 (Figura 43). Si bien, el objetivo de disminuir la presencia de *A. ochraceus* se había logrado, se pudo demostrar con este ensayo que fue un error querer simular la predominancia de las especies encontradas en la superficie de los salames, en el aire del sótano. Aunque colocamos los 2 biotipos en iguales proporciones, por alguna razón el

biotipo 4 predominó. A su vez, podemos observar que la concentración del inóculo utilizada fue excesiva.

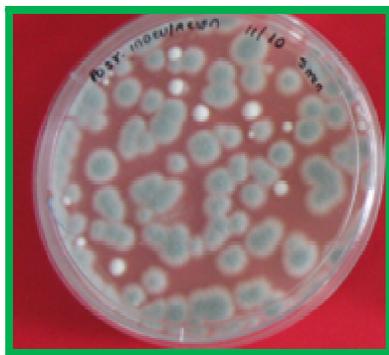


**Figura 43:** Recuento ambiental del aire del sótano (5, 10 y 15 min. de exposición) luego de la inoculación intencional con *P. nalgiovense* biotipo 4 y biotipo 6

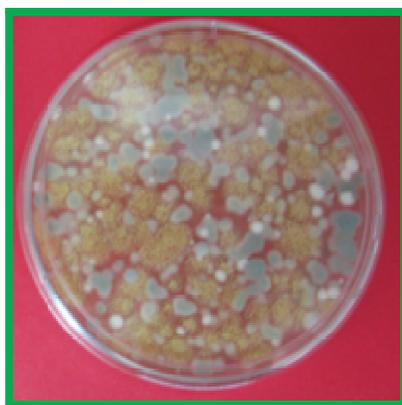
Una vez verificado el desequilibrio fúngico generado en el aire del sótano, se realizó una segunda inoculación intencional con *P. nalgiovense* biotipo 6 para tratar de balancear nuevamente los hongos del ambiente del sótano y lograr tener nuevamente salames blanquecinos grisáceos, sin *A. ochraceus*. Antes de la segunda inoculación se volvió a limpiar con lavandina diluida el sótano y se colocó un antifúngico en las paredes, como se explicó en Materiales y Métodos.

Los resultados del recuento de hongos del aire del sótano al día después de esta segunda inoculación intencional mostraron que si bien la carga fúngica total había disminuido (128 UFC/64 cm<sup>2</sup> en 5 min.) y seguía predominando en un 92% el biotipo 4 de *P. nalgiovense*, el biotipo 6 comenzaba a aparecer como especie minoritaria (8% de predominancia) (Figura 44). Cabe destacar que *A. ochraceus* no apareció en este muestreo. Si bien habíamos disminuido en un orden la concentración del inóculo y se adicionó la mitad de suspensión que en el caso anterior, la carga fúngica seguía siendo elevada.

Veinte días después de esta segunda inoculación intencional, se volvió a muestrear el aire del sótano de dicho elaborador, mostrando como resultado que, a pesar de todas las limpiezas e inoculaciones intencionales efectuadas, *P. nalgiovense* biotipo 4 seguía predominando en el aire del sótano y *A. ochraceus* había vuelto a aparecer (Figura 45).



**Figura 44:** Recuento ambiental del aire del sótano al día posterior de la inoculación intencional con *P. nalgiovensis* biotipo 6.



**Figura 45:** Recuento ambiental del aire del sótano luego de 20 días de la inoculación intencional con *P. nalgiovensis* biotipo 6.

Además, se pudo observar una vez más que la carga fúngica total del sótano era elevada, debido a que 1 minuto de exposición de las placas fue excesivo para lograr un exitoso recuento de la carga fúngica del aire (Figura 45).

Estos resultados nos demuestran que evidentemente el problema de la aparición de *A. ochraceus* no fue erradicado de la fábrica. Si bien el sótano y la sala de goteo fueron exhaustivamente limpiados e inoculados intencionalmente, el resto del establecimiento quizás no fue del todo desinfectado y esto produce que con el pasar de los días, las esporas de *A. ochraceus* que están en diferentes puntos del establecimiento sean trasladadas sin intención al sótano. Si bien en el aire del sótano encontramos esta especie, cuando analizamos un salame de ese mismo tiempo (Figura 46), esta especie

no se logró aislar. El emplume del salame estaba conformado por *P. nalgiovense* biotipo 4, biotipo 6 y levaduras, al igual que en los análisis anteriores realizados en invierno para dicho elaborador (Figura 46).



**Figura 46:** Salame y recuento de la micoflora superficial del establecimiento en el cual se realizó la inoculación intencional del sótano.

Como se mencionó anteriormente, el hecho de no haber encontrado *A. ochraceus* en el salame pero sí en el aire del sótano, puede explicarse debido a que si bien las esporas del hongo están en el sótano de maduración, las mismas no logran desarrollarse sobre la superficie del salame porque la temperatura utilizada habitualmente para esta etapa es cercana a los 15°C, en la cual vimos que *P. nalgiovense* se desarrollaba mejor. Por este motivo es que encontramos a esta especie como componente prioritario de la micoflora de estos salames. Este dato nos estaría indicando que dicho elaborador finalmente comprendió la importancia de mantener las temperaturas adecuadas durante todo el proceso, ya que previo a las inoculaciones intencionales el elaborador había declarado apagar el equipo de frío durante las noches por el gasto energético que traía aparejado.

Como conclusión general de esta inoculación intencional en un sótano de maduración podemos decir que no es suficiente para un control biológico de este tipo tratar de simular las condiciones encontradas en los productos al aire del sótano. Habrá que tener en cuenta otros factores para poder lograr el éxito, como por ejemplo la competencia que puede ejercer un biotipo sobre otro a la hora de llegar a desarrollarse sobre el producto y considerar colocar una concentración de inóculo apropiada. A su vez, también sería importante utilizar

una metodología de descontaminación eficiente, antes de realizar la inoculación intencional en el sótano, tratando de partir de una carga fúngica verdaderamente muy baja. Esto podría lograrse, por ejemplo, utilizando gas ozono (Iacumin *et al.*, 2012). Por otro lado, podría evaluarse además de inocular intencionalmente el aire del sótano con la especie seleccionada, sumergir o rociar los salames recién embutidos con una suspensión de este hongo.

## CAPITULO III

### INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y ACTIVIDAD DE AGUA SOBRE EL CRECIMIENTO DE *P. NALGIOVENSE* Y *A. OCHRACEUS*

#### 1. OBJETIVO ESPECÍFICO

El objetivo de este capítulo fue evaluar la influencia de la temperatura y la actividad del agua en el crecimiento de cepas de *P. nalgiovense* y *A. ochraceus* aisladas previamente de salames de Colonia Caroya.

#### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

##### 2.1 Reactivación de las cepas fúngicas y preparación del inóculo

Se reactivaron 3 cepas de *P. nalgiovense*, dos del biotipo 4 (SC9/773 y SC9/752) y una biotipo 6 (SC9/782), y 3 cepas de *A. ochraceus* (SC9/771, SC9/772 y SC9/743). Las cepas seleccionadas eran todas pertenecientes al mismo elaborador, aisladas de los salames de Colonia Caroya y oportunamente guardadas en el cepario del Laboratorio de Micología de Alimentos de la UNQ.

A partir de crioviales conteniendo esporos fúngicos en agar agua al 0,2% y conservados a 5°C, se tomó una alícuota y se dispersó en placa de MEA. Las mismas fueron incubadas a 25°C durante 7 días.

Una vez desarrollados los cultivos, se prepararon suspensiones de esporas de cada uno de los hongos, tomando con ansa ojal conidios y dispersándolos en tubos con 10 ml de agua destilada estéril conteniendo 0,01 ml de tween 80. Cada suspensión tenía una concentración en el orden de  $10^8$  esporas/ml. Se llamó suspensión A, a la mezcla de las 3 cepas de *P. nalgiovense*, la cual estaba compuesta por iguales cantidades de las suspensiones de cada una de las cepas. Y se llamó suspensión B a la mezcla de iguales cantidades de las 3 cepas de *A. ochraceus*. La concentración final de las suspensiones A y B fue del orden de  $10^7$  esporas/ml.

## 2.2 Preparación de los medios de cultivo

Se preparó MEA, ajustado a tres  $a_w$  diferentes (0,86; 0,90 y 0,94). Las mismas fueron elegidas contemplando los valores de  $a_w$  que tenían en promedio los salames caroyenses (Capítulo I).

Para la preparación del medio a diferentes  $a_w$ , se ajustó el mismo con diferentes porcentajes de glicerol (Tabla 19) considerando lo informado para soluciones acuosas por Chirife *et. al* (1980) y teniendo en cuenta la ecuación de Ross (1975). De esta manera, podemos considerar que:

$$a_w \text{ MEA ajustado} = a_w \text{ MEA} \times a_w \text{ Solución acuosa con glicerol}$$

**Tabla 19:** Porcentajes de glicerol utilizados para preparar MEA a diferentes actividades de agua.

$a_w$ MEA ajustado	% glicerol (p/p)
0,86	40
0,90	32
0,94	20

La actividades acuosas fueron medidas utilizando un higrómetro eléctrico Aqualab (Dispositivos Decagon, Modelo CX2), previamente calibrado con soluciones salinas saturadas como fue explicado en el inciso 2.1.1 (Capítulo I). Todo el ensayo se realizó a aproximadamente 25°C.

## 2.3 Cinéticas de crecimiento de *P. nalgiovensis* y *A. ochraceus* en MEA ajustado

Se inocularon las placas, conteniendo MEA ajustado a las diferentes  $a_w$ , centralmente con 2  $\mu$ l de las suspensiones A y B por separado. El ensayo se realizó por duplicado. Todas las placas fueron incubadas a 3 temperaturas diferentes (15, 20 y 25°C) hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. Para mantener constante la humedad relativa durante el período de incubación, las placas correspondientes a cada  $a_w$  fueron guardadas en bolsas de un

material de alta barrera al oxígeno conteniendo un recipiente con una solución de agua y glicerol con la misma  $a_w$  del medio.

Durante todo el período de incubación se midieron los diámetros (mm) de cada colonia y luego se calcularon las velocidades de crecimiento de cada cepa en cada condición de temperatura y  $a_w$  ensayada, utilizando el software DMFit (DM: Dinamic Modelling Version 2.1). Este modelo se utiliza para ajustar curvas donde una fase lineal es precedida y seguida de una fase estacionaria.

DMFit se ajusta a la función sigmoidea descrita por Baranyi and Roberts (1994):

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left( e^{-v \cdot t} + e^{h_0} - e^{-v \cdot t - h_0} \right) - \frac{1}{m} \ln \left( 1 + \frac{e^{m \mu_{\max} t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln \left( e^{-v \cdot t} + e^{h_0} - e^{-v \cdot t - h_0} \right) - 1}}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right)$$

Donde  $y(t)$  es el diámetro de las colonias (mm),  $t$  tiempo (días),  $y_0$  es diámetro a  $t=0$  (mm),  $\mu_{\max}$  es la velocidad máxima (mm día<sup>-1</sup>),  $m$  y  $v$  son parámetros de curvatura para caracterizar la transición de la fase exponencial,  $h_0$  es un parámetro adimensional que cuantifica el estado fisiológico inicial de las células,  $y_{\max}$  es el diámetro máximo de la colonia .

## 2.4 Crecimiento conjunto de *P. nalgiovensis* y *A. ochraceus* en MEA ajustado

Estos ensayos pretenden evaluar el crecimiento conjunto de *P. nalgiovensis* y *A. ochraceus*, tal como ocurre en el emplume de salames.

De esta manera, en un primer ensayo en placas de MEA a tres  $a_w$  diferentes (0,86; 0,90 y 0,94) se inocularon 0,1 ml de la suspensión A (*P. nalgiovensis*), descrita en el ítem anterior y se dispersó con espátula de Drigalsky; sobre ella se dispuso en el centro de la placa un disco de papel Whatman de 14 mm de diámetro embebido con 0,05 ml de la suspensión B (*A. ochraceus*), descrita en el ítem anterior. El ensayo fue realizado por duplicado. Se realizaron los correspondientes controles colocando solamente el disco embebido en la suspensión B sobre el agar, sin inoculación de la suspensión A. Todas las placas fueron incubadas a las 3 temperaturas (15, 20 y 25°C)

durante un máximo de 11 días. En todos los casos, se registraron los diámetros de la colonia de *Aspergillus ochraceus* en crecimiento conjunto con *P. nalgiovense* y en crecimiento individual, en función del tiempo. Se calculó el porcentaje de reducción de *A. ochraceus* en crecimiento conjunto con *P. nalgiovense*.

En el siguiente ensayo, se mezclaron iguales alícuotas de las dos suspensiones (A y B) para obtener una suspensión mezcla (C), y se inocularon 0,1 ml de las diluciones decimales -3, -4 y -5 de dicha suspensión con espátula de Drigalsky sobre placas de MEA con tres  $a_w$  diferentes. El ensayo fue realizado por triplicado y se incluyeron como control 0,05 ml de las diluciones decimales -3, -4 y -5 de suspensión A y 0,05 ml de las diluciones decimales -3, -4 y -5 de la suspensión B inoculados en placas individualmente.

Las placas fueron incubadas a 3 temperaturas diferentes (15, 20 y 25°C) durante 7 días, donde se realizó el recuento de cada uno de los hongos y una valoración visual de coloración de las colonias mediante fotografías.

En ambos ensayos, para mantener constante la humedad relativa durante el período de incubación, las placas correspondientes a cada  $a_w$  fueron guardadas en bolsas conteniendo un recipiente con una solución de agua y glicerol con la misma  $a_w$  del medio, al igual que en los ensayos anteriores.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Cinéticas de crecimiento de *P. nalgiovense* y *A. ochraceus* en MEA ajustado

En cuanto al primer ensayo, en donde se midió el crecimiento de *P. nalgiovense* y *A. ochraceus* por separado, se pudo observar que conforme aumenta la temperatura y la actividad de agua del medio, ambas especies fúngicas presentan una mayor velocidad de crecimiento (Tabla 20) (Figura 47).

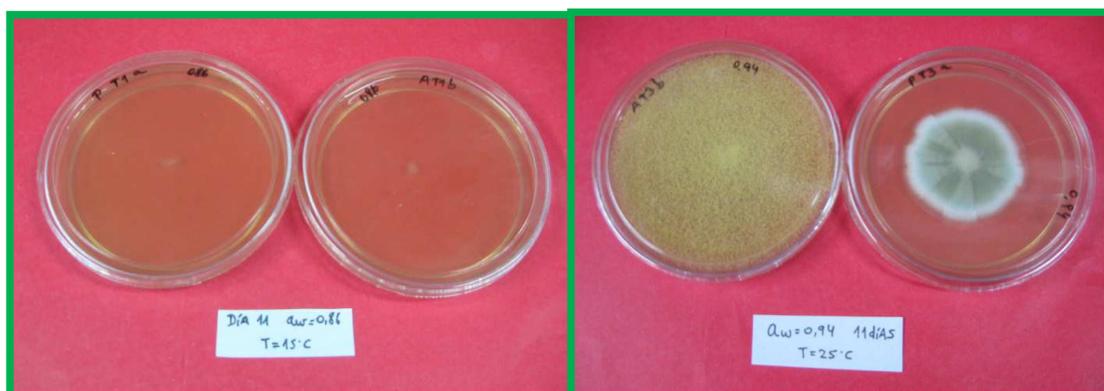
De las condiciones ensayadas, las velocidades óptimas de crecimiento (K) para ambos hongos se presentaron a 0,94 de  $a_w$  y 25° C, obteniendo valores de K de 14,23 mm/ día y 4,60 mm/ día para *A. ochraceus* y *P. nalgiovense*, respectivamente. Por lo cual observamos que *A. ochraceus* tiene

una velocidad de crecimiento en estas condiciones muy superior a la otra especie.

**Tabla 20:** Velocidad de crecimiento K (mm/día) de *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium nalgiovense* a diferentes temperaturas (15, 20 y 25 °C) y actividades de agua (0,86; 0,90 y 0,94) y comparación de crecimiento entre ambas cepas (K\*/K\*\*).

T°	a <sub>w</sub>	<i>A. ochraceus</i> (K*)	<i>P. nalgiovense</i> (K**)	K*/K**
15°C	0,86	0,47 ± 0,01	0,42 ± 0,05	1,12
	0,90	2,86 ± 0,12	1,51 ± 0,14	1,89
	0,94	5,04 ± 0,09	2,66 ± 0,10	1,89
20°C	0,86	1,95 ± 0,02	1,34 ± 0,03	1,45
	0,90	3,78 ± 0,13	1,58 ± 0,02	2,39
	0,94	8,09 ± 0,09	3,62 ± 0,01	2,23
25°C	0,86	2,72 ± 0,07	1,57 ± 0,10	1,73
	0,90	6,11 ± 0,19	2,36 ± 0,07	2,58
	0,94	14,23 ± 0,09	4,64 ± 0,02	3,06

Si comparamos los valores obtenidos en este trabajo para *A. ochraceus* con los informados por Koaudio *et al.* (2007) y Palacios Cabrera *et al.* (2005), nuestros valores son prácticamente el doble a 25°C y 0,94 de a<sub>w</sub>. Hay que considerar que estos dos autores trabajaron con medios de cultivo distintos a los nuestros (agar café y agar dicloran glicerol al 18%, respectivamente) y por supuesto con otras cepas de *A. ochraceus*.



**Figura 47:** Condición de crecimiento más desfavorable (0,86 de a<sub>w</sub> y 15°C) y más favorable (0,94 de a<sub>w</sub> y 25°C) para ambos hongos en el día 11 de incubación.

López Díaz *et al.* (2002) trabajaron con una cepa de *P. nalgiovense*, encontrando valores por debajo de los nuestros, ya que a 25°C esta cepa

creció 4 mm/día en MEA sin glicerol, es decir  $a_w$  cercana a 0,98, mientras que nuestra cepa de *P. nalgiovense* estuvo cercana a 4,6 mm/ día a una  $a_w$  menor (0,94).

Podemos observar en base a nuestros resultados que la condición en la cual la diferencia entre las velocidades de crecimiento de *A. ochraceus* y *P. nalgiovense* se minimiza es a 0,86 de  $a_w$  y 15°C. A las tres temperaturas ensayadas siempre la diferencia se minimiza a la menor  $a_w$  analizada (Tabla 20).

### 3.2 Crecimiento conjunto de *P. nalgiovense* y *A. ochraceus* en MEA ajustado

En cuanto al ensayo en el cual se hizo crecer *A. ochraceus* en el centro de la placa sobre un césped de *P. nalgiovense*, podemos observar que luego de 11 días de incubación a medida que aumenta la  $a_w$  y la temperatura, aumenta el crecimiento de *A. ochraceus*, llegando a un valor máximo de 21 mm tanto a 0,90 como 0,94 de  $a_w$  y 25°C (Tabla 21). En el caso de *P. nalgiovense* a todas las  $a_w$  y temperaturas logra crecer exitosamente en forma de césped, sin embargo a los 11 días de incubación se observa que a medida que aumenta la  $a_w$  el césped se hace mas homogéneo y más verdoso, es decir que a menor  $a_w$  se percibe una inhibición de la esporulación del hongo (Figura 48).

**Tabla 21:** Crecimiento promedio (mm) de *A. ochraceus* sobre un césped de *P. nalgiovense* al día 11 de incubación a diferentes  $a_w$  y temperaturas.

$a_w / T^\circ$	15°C	20°C	25°C
<b>0,86</b>	14 ± 0,01	16 ± 0,07	20 ± 0,07
<b>0,90</b>	16 ± 0,02	16 ± 0,05	21 ± 0,06
<b>0,94</b>	18 ± 0,07	17 ± 0,01	21 ± 0,09

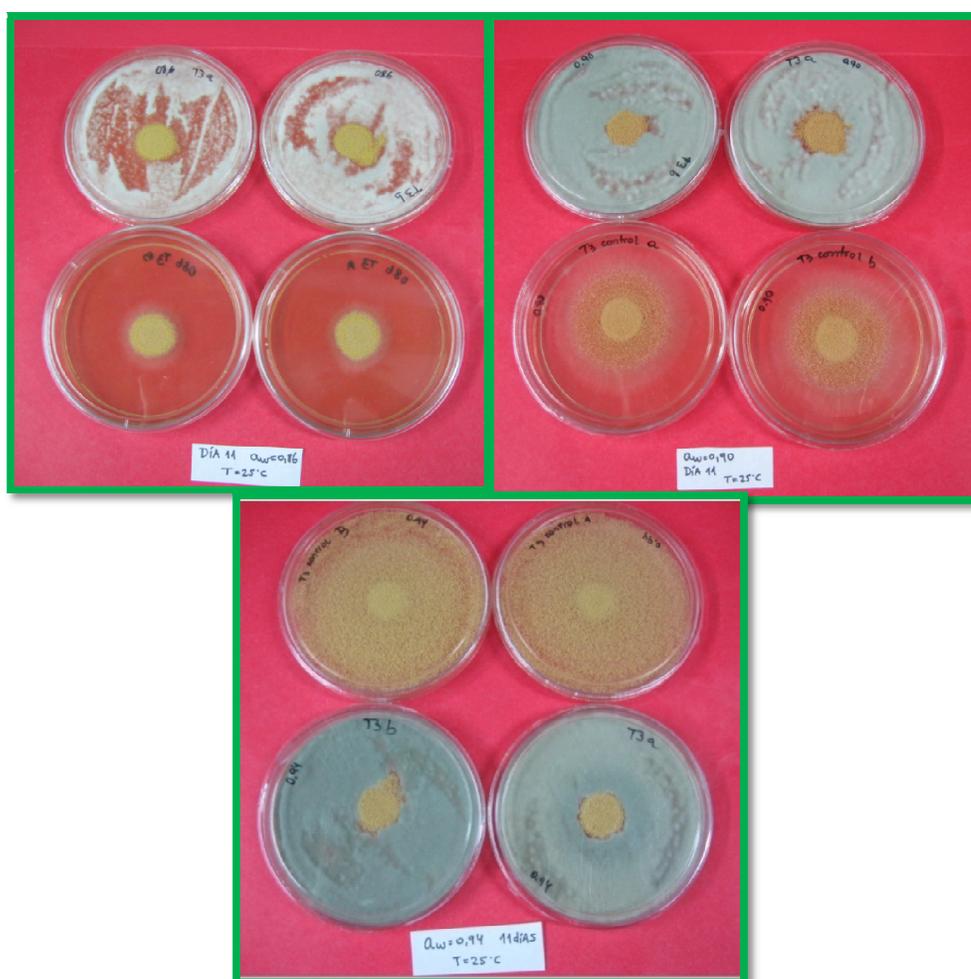
**Tabla 22:** Crecimiento promedio (mm) de *A. ochraceus* al día 11 de incubación a diferentes  $a_w$  y temperaturas.

$a_w / T^\circ$	15°C	20°C	25°C
<b>0,86</b>	14 ± 0,03	17 ± 0,08	27 ± 0,02
<b>0,90</b>	22 ± 0,02	34 ± 0,02	60 ± 0,03
<b>0,94</b>	54 ± 0,05	75 ± 0,07	>90

**Tabla 23:** Reducción del crecimiento (%) a los 11 días de incubación entre *A. ochraceus* crecido solo y crecido sobre un césped de *P. nalgiovense*.

$a_w / T^\circ$	15°C	20°C	25°C
0,86	0	6	26
0,90	27	53	65
0,94	67	77	>77

Podemos observar que al crecer *A. ochraceus* sobre un césped de *P. nalgiovense* se reduce notablemente su crecimiento, si lo comparamos con el ensayo en donde se hace crecer *A. ochraceus* solo (Tabla 22), disminuyendo el crecimiento entre un 6 y un 77%, notándose la mayor reducción a la mayor temperatura y mayor  $a_w$  (25°C y 0,94) (Tabla 23).



**Figura 48:** Crecimiento de *A. ochraceus* sobre un césped de *P. nalgiovense* y solo, a 0,86; 0,90 y 0,94 de  $a_w$  y 25°C, al día 11 de incubación.

Observando los resultados del último ensayo, en donde se hizo crecer los dos hongos juntos, se pudo ver que en todas las condiciones ensayadas, los recuentos de cada una de las especies, a los 7 días de incubación, fueron prácticamente los mismos que los de los controles. Es decir que la viabilidad de ambos hongos se mantuvo, no observándose prácticamente diferencias entre los recuentos de cada hongo respecto al crecimiento en forma individual (Tablas 24, 25 y 26), lo que quiere decir que no hay inhibición de una u otra especie al crecer juntas.

**Tabla 24:** Recuento de *P. nalgiovense* y *A. ochraceus* (UFC/ml) inoculados conjuntamente en MEA a diferentes  $a_w$  (0,86; 0,90 y 0,94) y temperaturas (15, 20 y 25°C), a los 7 días de incubación.  
A: *A. ochraceus*, P: *P. nalgiovense*

$a_w / T^\circ$	15°C	20°C	25°C
<b>0,86</b>	2,5 $10^7$ P y 3,5 $10^7$ A	2,6 $10^7$ P y 5,5 $10^7$ A	2,4 $10^7$ P y 6,6 $10^7$ A
<b>0,90</b>	3,8 $10^7$ P y 4,8 $10^7$ A	4,0 $10^7$ P y 3,2 $10^7$ A	3 $10^6$ P y 1,3 $10^7$ A
<b>0,94</b>	3,9 $10^7$ P y 3,5 $10^7$ A	3,5 $10^7$ P y 4,1 $10^7$ A	3,0 $10^7$ P y 3,8 $10^7$ A

**Tabla 25:** Recuento de controles de *P. nalgiovense* (UFC/ml) en MEA a diferentes  $a_w$  (0,86; 0,90 y 0,94) y temperaturas (15, 20 y 25°C), a los 7 días de incubación.

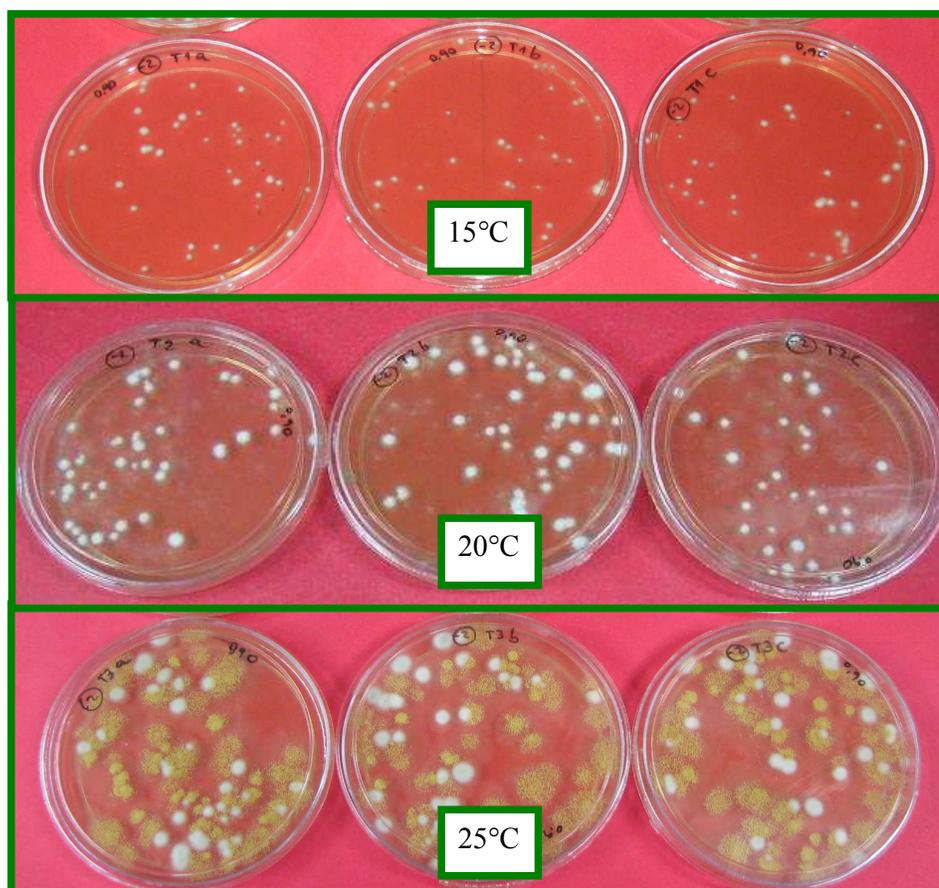
$a_w / T^\circ$	15°C	20°C	25°C
<b>0,86</b>	4,2 $10^7$	3,8 $10^7$	4,1 $10^7$
<b>0,90</b>	3,7 $10^7$	2,9 $10^7$	9 $10^6$
<b>0,94</b>	4,6 $10^7$	3,5 $10^7$	3,7 $10^7$

**Tabla 26:** Recuento de controles de *A. ochraceus* (UFC/ml) en MEA a diferentes  $a_w$  (0,86; 0,90 y 0,94) y temperaturas (15, 20 y 25°C), a los 7 días de incubación.

$a_w / T^\circ$	15°C	20°C	25°C
<b>0,86</b>	6,8 $10^7$	8,2 $10^7$	9,8 $10^7$
<b>0,90</b>	9,0 $10^7$	5,9 $10^7$	8 $10^6$
<b>0,94</b>	4,4 $10^7$	7,5 $10^7$	7,8 $10^7$

En la Figura 49 se puede observar el crecimiento de ambas especies al ser inoculadas juntas a 0,90 de  $a_w$  en las 3 temperaturas analizadas. Si comparamos el crecimiento de ambos hongos, a 15°C y a 0,86 y 0,90 de  $a_w$  predomina visualmente *P. nalgiovense*, viendo sólo la germinación de *A. ochraceus*. Este es un dato importante considerando que la temperatura de

15°C es la que se utiliza habitualmente en la maduración de los salames, por lo cual una correcta aplicación de frío en los sótanos de maduración, es una herramienta para minimizar la aparición de *A. ochraceus*, tal como se pudo observar en aquellos salames que habían sido elaborados en los meses de bajas temperaturas (Capítulo I).



**Figura 49:** Crecimiento conjunto de *P. nalgiovensis* y *A. ochraceus* a diferentes temperaturas (15, 20 y 25°C) y 0,90 de  $a_w$ , a los 7 días de incubación.

## **CAPITULO IV**

### **ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS SALAMES ELABORADOS EN COLONIA CAROYA**

#### **1. OBJETIVO ESPECÍFICO**

El objetivo de este capítulo fue determinar la calidad microbiológica de los salames elaborados en Colonia Caroya. Para ello, se realizó el análisis de microorganismos patógenos y microorganismos indicadores según el Código Alimentario Argentino.

#### **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **2.1 Muestreo**

Se realizaron 3 muestreos de salames desde 2011 hasta 2013 que incluyeron en total 129 muestras pertenecientes a 21 establecimientos elaboradores de salames de Colonia Caroya.

El primer muestreo se realizó entre julio y septiembre de 2011, se muestrearon en total 16 establecimientos elaboradores (3 salames por establecimiento) y se realizó una pequeña encuesta a cada uno de ellos, en la cual se consultó sobre los días de goteo de cada salame, días de maduración, la utilización de tripa natural o sintética y el uso de cultivos iniciadores (bacterias lácticas).

En aquellos establecimientos en donde se evidenció la presencia de algún microorganismo patógeno se volvió a tomar muestras dos meses después y se realizaron nuevamente los análisis microbiológicos.

El segundo muestreo fue realizado en junio 2012 a 12 establecimientos elaboradores (3 salames por establecimiento) y también fue realizada una pequeña encuesta a cada elaborador contemplando las mismas preguntas que en el muestreo anterior.

El tercer muestreo fue realizado en septiembre de 2013 a 10 establecimientos elaboradores (3 salames por establecimiento).

Las muestras se conservaron a temperatura ambiente hasta el momento del análisis.

## **2.2 Determinaciones microbiológicas**

Se analizaron los criterios microbiológicos que establece el CAA en su Capítulo VI Artículo 302, considerando los criterios correspondientes a embutidos secos, los cuales fueron mostrados en la Tabla 3 de la Introducción.

Cabe aclarar que al inicio de estos análisis (2011), el CAA no tenía especificado los criterios microbiológicos para chacinados, pero la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL) ya estaba trabajando sobre los mismos y nosotros habíamos tenido acceso al expediente (1-0047-2110- 4179-11-2). En ese momento los parámetros que habían establecido eran los mismos que hoy figuran en el CAA, pero variaban los criterios de aceptación propuestos para *Staphylococcus coagulasa* positivo y anaerobios sulfito reductores, ya que en aquel momento el criterio era  $n=5$ ,  $c=1$ ,  $m=10$ ,  $M=100$ , y actualmente este cambio a  $n=5$ ,  $c=1$ ,  $m=100$ ,  $M=1000$ .

### **2.2.1 Preparación y dilución de los homogenatos de salames (ICMSF 2000, Método 2)**

1. Se retiró la tripa del salame trabajando en condiciones estériles.
2. Se pesaron 10 g de salame en una bolsa para stomacher estéril.
3. Se añadieron 90 ml de agua de peptona al 0,1% (de esta manera, se obtiene la dilución  $10^{-1}$ ).
4. Se homogeneizó en stomacher (Aes Chemunex) durante 60 segundos.
5. Se tomó una alícuota de 1 ml y se colocó en un tubo con 9 ml de agua de peptona al 0,1% (dilución  $10^{-2}$ ).
6. Se tomó una alícuota de 1 ml de la dilución  $10^{-2}$  y se colocó en un tubo con 9 ml de agua de peptona al 0,1% (dilución  $10^{-3}$ ).

### **2.2.2 Presencia de coliformes: Técnica del número más probable (ICMSF 2000, Método 1)**

1. Se tomó 1 ml de las primeras tres diluciones del homogenato y se colocó en tubos con 10 ml de caldo lauril sulfato triptosa (LST) con campanita de Durham invertida, utilizando tres tubos por cada dilución. Se incubaron los tubos en estufa (Tecnología Educativa) a 37°C durante 24 y 48 hs.
2. Pasadas las primeras 24 hs., se anotaron los tubos que presentaban producción de gas, la cual se identifica viendo burbujas dentro de la campanita de Durham. Aquellos tubos que no presentaban producción de gas, se incubaron 24 hs. más
3. Pasadas las 48 hs., se anotaron todos los tubos que mostraron producción de gas.

Si todos los tubos dieron negativos, se informó para el recuento de *E. coli* como < 3NMP/g. Si alguno de los tubos mostró producción de gas se continúa con el análisis de presencia de coliformes de origen fecal.

### **2.2.3 Recuento de coliformes de origen fecal: Técnica del número más probable (ICMSF 2000, Método 1)**

1. Se tomaron todos los tubos de LST gas positivos, procedentes del inciso anterior (punto 3).
2. Se inocularon con un ansa ojal desde cada tubo positivo a tubos con 10 ml de caldo *Escherichia Coli* (EC) con campanita de Durham invertida. Se incubaron a 44,5°C durante 24 y 48 hs.
3. Pasadas las primeras 24 hs., se anotaron los tubos que presentaban producción de gas. Se incubaron 24 hs. más, aquellos tubos que no presentaban producción de gas.
4. Pasadas las 48 hs., se anotaron todos los tubos que mostraron producción de gas. Estos se consideran positivos de organismos coliformes de origen fecal.

Si todos los tubos dieron negativos, quiere decir que es < 3NMP/g el recuento de coliformes de origen fecal y por lo tanto se informó para el

recuento de *E. coli* como < 3NMP/g. Si alguno de los tubos mostró producción de gas se continuó el análisis de recuento de *E. coli*.

#### **2.2.4 Recuento de *E. coli***

1. Se sembró por estría con una ansada de cada tubo de caldo EC positivo en placas de agar eosina azul de metileno (EMB), utilizando una placa por cada tubo. Se incubaron las placas por 24 hs. a 37°C.
2. Se tomó una colonia representativa (nucleada con o sin brillo metálico) de cada placa y se resembró en estría en una placa de agar nutritivo (AN). Se incubó la placa durante 24 hs. a 37°C.
3. A partir de cada placa de AN se hizo una extensión y se tiñó por el método gram para confirmar la presencia de bacilos gram negativos no esporulados.
4. Se continuó con las pruebas de identificación IMVIC a partir de las placas del AN, las cuales constan de 4 pruebas: Indol, Rojo de Metilo, Voges Proskauer y Citrato Sódico.

##### **2.2.4.1 Técnica para la prueba de Indol (Kovacs, 1928)**

1. Se inocularon tubos de agua de peptona a partir de cultivos puros y se incubaron a 37°C durante 24 hs.
2. Se añadió a cada tubo 0,3 ml del reactivo de Kovacs y se agitó.
3. Se esperaron 10 min. y se observa la coloración de la superficie. En aquellos tubos en los que apareció un color rojo oscuro en la superficie de la capa de alcohol amílico, indica la posible presencia de escatol y debe anotarse como reacción positiva.

##### **2.2.4.2 Técnica para la prueba de Rojo de Metilo (Ljutov, 1961)**

1. Se inocularon tubos de caldo Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MR-VP) a partir de cultivos puros y se incubaron los tubos sembrados a 37°C durante 5 días.

2. Se pipetearon 5 ml de cada cultivo en tubos vacíos estériles y se añadió a cada tubo 5 gotas de la solución de rojo de metilo. Se agitaron.
3. Se anotaron como positivos aquellos tubos en los que apareció un color rojo bien definido y como negativos aquellos con un color amarillo.

#### **2.2.4.3 Técnica para la prueba de Voges Proskauer (Levine, 1916)**

1. Se inocularon tubos de caldo MR-VP a partir de cultivos puros y se incubaron a 37°C durante 48 hs.
2. Se pipeteó 1 ml de cada cultivo en tubos vacíos estériles y se añadió a cada uno de ellos 0,6 ml de la solución de  $\alpha$ -naftol y 0,2 ml de la solución de hidróxido potásico 40%.
3. Se agitaron los tubos y se dejaron en reposo durante 4 hs. a temperatura ambiente. La aparición en la mezcla de un color rosa a carmesí se consideró como reacción positiva.

#### **2.2.4.4 Técnica para la prueba de citrato sódico (Simmons, 1926)**

1. Se inocularon tubos de agar inclinado de citrato de Simmons a partir de cultivos puros. Para ello se utilizó un alambre recto, a fin de sembrar un inoculo pequeño, ya que de otro modo la transferencia de nutrientes con el inóculo podría invalidar la reacción. Se sembró por picadura en la columna de agar y por estría en la superficie inclinada.
2. Se incubaron los tubos a 35-37°C durante 48 hs.
3. Se anotaron como positivos aquellos tubos en donde el crecimiento era visible. Generalmente el crecimiento se manifiesta por el cambio de color del medio del verde claro al azul.

Se consideran como positivos para *Escherichia coli* aquellos cultivos que dieron positivos para la reacción de indol y para la prueba de rojo de metilo, y negativos para la pruebas de Voges Proskauer y de citrato sódico de Simmons. El recuento de *E. coli* (NMP/g) se informa dependiendo de la cantidad de tubos que dieron positivos tanto en caldo EC como para IMVIC, basándose en la Tabla 27 (ICMSF, 2000).

**Tabla 27:** Número más probable (NMP) para *E. coli*; tres tubos por cada dilución (ICMSF, 2000).

Número de tubos positivos en cada dilución			NMP/g
Dilución 10 <sup>-1</sup>	Dilución 10 <sup>-2</sup>	Dilución 10 <sup>-3</sup>	
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
3	0	0	23
3	0	1	40
3	1	0	40
3	1	1	70
3	2	0	90
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	200
3	3	1	500
3	3	2	1100

### 2.2.5 Recuento de anaerobios sulfito reductores (formas vegetativas y esporuladas conjuntamente) (APHA, 1992)

1. Se fundieron los tubos con 10 ml de agar sulfito polimixina sulfadiazina (SPS) en agua hirviendo y se mantuvieron en hervor durante 10 min. Se enfriaron rápidamente a 45° C en baño termostático.
2. Se sembró 1 ml de la dilución 10<sup>-1</sup> introduciendo la pipeta de vidrio estéril hasta el fondo del tubo y comenzando a dispersar el inóculo desde el fondo hacia la superficie. Se mezcló por rotación suave entre las palmas de las manos. Se enfrió rápidamente en agua fría hasta solidificar el agar. Se agregó un tapón de agar SPS y se enfrió nuevamente. Se realizó por duplicado.
3. Se realizó el mismo procedimiento con la dilución 10<sup>-2</sup> por duplicado.
4. Se incubaron los tubos a 35° C durante 48 hs.

5. Se contaron las colonias negras presentes, se realizó un promedio de los dos tubos y se multiplicaron por el promedio de dilución.
6. El recuento de anaerobios sulfito reductores se expresó como UFC/g. En caso de no obtenerse colonias negras en ninguna de las diluciones, se expresó el resultado como menor que 10 UFC/g.

### **2.2.6 Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa + (ICMSF, 2000)**

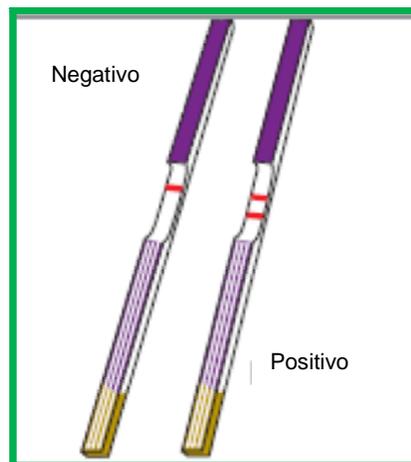
1. A partir de las diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ , se sembró 0,1 ml en la superficie de cada una de dos placas con agar Baird-Parker (BP), previamente secadas. Se extendió el inóculo con espátula de Drigalsky.
2. Se mantuvieron las placas a temperatura ambiente durante 15 min. Luego se invirtieron las mismas y se incubaron a 35° C durante 48 hs.
3. Se marcaron todas las colonias típicas y atípicas presentes, contando por separado los diferentes tipos morfológicos observados.
4. Se sembraron 5 colonias típicas y atípicas de diferente tipo morfológico en caldo infusión cerebro corazón (BHI) para realizarles la prueba coagulasa. Se incubaron a 37°C durante 24 hs.
5. Se realizó la prueba de coagulasa a las colonias sembradas en BHI. Para ello se transfirieron 0,1 ml de los cultivos BHI a tubos conteniendo 0,3 ml de plasma de conejo y se incubaron a 35-37°C.
6. Se observaron los tubos a las 4 hs. de incubación, con el fin de detectar la presencia de coágulo; en aquellos donde no se observaron los mismos, se mantuvieron los tubos a temperatura ambiente durante 24 hs. La aparición de un coágulo bien diferenciado es indicativa de la actividad coagulasa.
7. Si las 5 colonias fueran confirmadas como coagulasa +, se multiplica el número de colonias contadas en ambas placas por la inversa de la dilución elegida.

En el caso que sólo algunos de los tipos morfológicos contados fueran coagulasa +, multiplicar el número de colonias contadas en ambas placas con esa morfología, por la inversa de la dilución elegida.

El recuento de *S. aureus* coagulasa + fue expresada en UFC/g. En caso de no obtenerse colonias de *S. aureus* coagulasa positivo, expresar el resultado como menor que 100 UFC/g.

### 2.2.7 Métodos de screening rápido para patógenos

Para el screening de los microorganismos patógenos que exige el CAA para embutidos secos se utilizaron los kits Rapidchek (Romer Labs) con certificación AOAC. Estos kits son pruebas de inmunoensayo que utiliza un formato de tiras tipo “sándwich” de doble anticuerpo. Un anticuerpo para cada microorganismo es rociado e inmovilizado en la superficie de una membrana, constituyendo así la línea de prueba. Un segundo reactivo de anticuerpo que también reconoce al microorganismo que se esté estudiando (*Salmonella*, *Listeria* o *E. coli*) y que se etiqueta con oro coloidal, es contenido dentro de un bloque de reactivo encima de la línea de prueba en la membrana. A medida que la muestra difunde por capilaridad desde el bloque filtrante hacia el bloque de oro-anticuerpo, el reactivo de oro- anticuerpo se liga específicamente al microorganismo en cuestión y se mueve con el líquido de la muestra hasta la membrana. La muestra pasa a través de la línea de prueba, donde el anticuerpo inmovilizado captura el complejo microorganismo-anticuerpo- oro, causando así la formación de un “sándwich” de anticuerpo- microorganismo y la aparición de color rojo en la línea de prueba (Figura 50).



**Figura 50:** Test negativo (una línea roja), test positivo (dos líneas rojas), indicando la presencia del microorganismo en cuestión.

Las aparición de al menos una línea roja (la del control), indica que el kit está funcionando adecuadamente y que la muestra es negativa para el microorganismo analizado. La aparición de una línea roja por debajo de la línea de control indica que la muestra es positiva para el microorganismo analizado. Si transcurrido el tiempo de incubación no aparece ninguna línea roja, el test queda invalidado y se debe repetir.

### **2.2.7.1 Screening de Salmonella en 25 g por medio de Rapidchek**

1. Se pesaron 25 g de salame (sin tripa) en una bolsa estéril para stomacher.
2. Se agregaron 225 ml de agua de peptona buffereada (APB) y se homogeneizó durante 1 minuto en stomacher.
3. Se incubó a 35°C durante 24 hs.
4. Luego de la incubación se agitó el medio y se tomó una alícuota de 0,5 ml y se pasó a un tubo con 10 ml de caldo tetracionato (TT). El medio de enriquecimiento se guardó en heladera a 5°C.
5. Se incubó a 42° C durante 24 hs. el tubo de TT.
6. Luego de la incubación se transfirieron 400 µl de muestra a un tubo de hemólisis vacío y se guardó el tubo de TT en heladera a 5°C.
7. Se colocó una tira reactiva dentro del tubo de hemólisis con las flechas apuntando hacia abajo, procurando que la tira haga contacto con la muestra.
8. Se dejó reaccionar 10 min.
9. Luego se observaron los resultados y se sacaron conclusiones de acuerdo a lo siguiente:
  - Al menos una línea (la del control) tiene que aparecer. Una línea roja en esta posición indica que el kit está funcionando adecuadamente.
  - Si transcurridos los 10 min. sólo se observa una línea (control), entonces la muestra es negativa para *Salmonella spp.*
  - La aparición de una línea roja por debajo de la línea de control indica que la muestra es positiva para *Salmonella spp.* y se debe continuar con la confirmación por USDA/FSIS (2008).

- Si transcurridos los 10 min. no aparece una línea roja el test queda invalidado y se debe repetir.

### **2.2.7.2 Confirmación de *Salmonella* spp. por USDA/FSIS (2008)**

La confirmación de aquellas muestras que dieron positivas se hizo mediante la norma USDA/FSIS (2008).

1. A partir del enriquecimiento en APB se tomó 0,1 ml en un tubo con 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis (RV).
2. Se incubó a 42° C durante 24 hs.
3. A partir de cada tubo de TT y RV, se inoculó con ansa ojal en placas de agar lisina hierro doble modificado (DMLIA) y agar verde brillante sulfa (BGSA).
4. Se incubaron a 35°C durante 24 hs.
5. Se observaron los resultados. Las características de las colonias típicas en cada medio son las siguientes:
  - *BGSA*: colonias rosas y opacas con apariencia lisa y borde completo rodeadas de un color rojo en el medio; en placas con mucho desarrollo se seleccionan colonias con apariencia tostada cuando se observa contra un fondo verde.
  - *DMLIA*: colonias púrpura con o sin centro negro; *Salmonella* típicamente decarboxila la lisina y no fermenta ni la lactosa ni la sacarosa, por lo tanto el color del medio revierte a púrpura.
  - Se seleccionaron tres colonias bien aisladas de cada placa. Se tomó material de la superficie y el centro de la colonia solamente, evitando tocar el agar ya que los medios selectivos suprimen el crecimiento de muchos microorganismos que pueden permanecer viables.

#### **2.2.7.2.1 Screening bioquímico para *Salmonella***

1. Cada colonia sospechosa de ser *Salmonella*, fue sembrada en una placa de agar tripteína soja (TSA), un tubo de Agar hierro tres azúcares

- (TSI) y uno de Agar lisina hierro (LIA) por estría y punción consecutivamente en una sola operación.
2. Se incubaron todos los tubos a 35°C durante 24 h.s.
  3. Además, cada colonia sospechosa fue sembrada en un tubo de caldo MR-VP. Se incubaron a 35°C durante 48 hs.
  4. Se observaron los resultados de los tubos de TSI y LIA: color, ennegrecimiento y tipo de desarrollo; los aislados se siguieron analizando o fueron descartados de acuerdo al criterio de la Tabla 28.

**Tabla 28:** Crecimiento típico de cepas de *Salmonella* en agar TSI y agar LIA, y pruebas bioquímicas a realizar.

Agar TSI			Agar LIA		Pruebas a realizar
Pico de flauta	Fondo	H <sub>2</sub> S	Fondo	H <sub>2</sub> S	
Rojo	Amarillo	+	Púrpura	+	Pruebas bioquímicas y serológica
Rojo	Amarillo	-	Púrpura	-	Pruebas bioquímicas y serológica
Rojo	Amarillo	-	Amarillo	-	Pruebas bioquímicas y serológica (1)
Rojo	Amarillo	+	Amarillo	+/-	Pruebas bioquímicas y serológica
Amarillo	Amarillo	-	Amarillo/púrpura	-	Se descarta
Amarillo	Amarillo	+	Púrpura	+	Pruebas bioquímicas y serológica (2)
s/cambio	s/cambio	.....	.....	....	Se descarta
.....	.....	.....	Pico de flauta pardo	.....	Se descarta
Desarrollo invasivo	.....	.....	.....	.....	Se descarta

<sup>1</sup>*Salmonella typhisuis*. <sup>2</sup>*Salmonella enterica* subsp. *arizonae* o *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*.  
..... significa que es indistinto el resultado obtenido

5. Con los aislados no descartados se prosiguió sembrándolos en agar urea a partir del cultivo desarrollado en TSI y se recurrió al caldo MR-VP para realizar el ensayo de Voges-Proskauer. Un resultado positivo proveniente de cualquiera de los dos ensayos es motivo de descarte de dicha colonia. Por el contrario, un resultado negativo en ambas pruebas implica continuar con la identificación bioquímica y serológica.

### **2.2.7.2.2 Ensayo de Voges Proskauer**

Se realizó el ensayo de Voges-Proskauer tal como fue descrito en el inciso 2.2.4.3. El desarrollo de un color rojo es considerado una reacción positiva. *Salmonella* es Voges Proskauer negativa.

### **2.2.7.2.3 Ensayo de urea**

1. Se inoculó el pico de flauta del medio urea.
2. Se incubó a 35°C durante 48 hs.
3. Se observaron los resultados. Los microorganismos ureasa positivos producen un color rojo/fucsia debido a la alcalinización del medio. *Salmonella* es ureasa negativa.

### **2.2.7.2.4 Identificación bioquímica**

Para la identificación bioquímica se utilizó el kit API 20E (Biomerieux). Se tomó material proveniente del TSA. Para la siembra, incubación, lectura e interpretación de resultados se siguieron las instrucciones del fabricante, como se describe a continuación.

1. A partir de una colonia bien aislada del microorganismo, se realizó una suspensión en 5 ml de agua estéril.
2. Con la suspensión de bacterias se llenaron los tubos de todos los pocillos, pero no la cúpula (cada pocillo tiene un tubo y una cúpula, parte aerobia).
3. Se llenó la cúpula de los pocillos CIT, VP y GEL con la suspensión de bacterias.
4. Se cubrió con vaselina las cúpulas de los pocillos ADH, LDC, ODC, URE y H<sub>2</sub>S para obtener anaerobiosis.
5. Se puso la tira en su propia cámara húmeda de incubación.
6. Se incubó a 37°C durante 24 hs.
7. Se deben revelar las siguientes técnicas:

- TDA: Se añade una gota de FeCl<sub>3</sub> 10 %.
- VP: Se añade una gota del reactivo 1 (KOH al 40 %) y una gota del reactivo 2 (etanol).
- IND: Se añade una gota de reactivo de Kovacs.
- Oxidasa: Añadir una gota del reactivo (tetrafenilendiamina) recién preparado.

La lectura de los resultados se lleva a cabo por comparación de los colores de cada pocillo con los de las tablas de lectura, y anotando el resultado como positivo o negativo (Tabla 29).

**Tabla 29:** Reacción/ enzima positiva y negativa para cada prueba del kit API 20E para identificación bioquímica de *Salmonella*.

Prueba	Reacción/ Enzimas	Negativo	Positivo
ONPG	Beta-galactosidasa	Sin color	Amarillo
ADH	Arginina deshidrolasa	Amarillo	Rojo o naranja
LDC	Lisina descarboxilasa	Amarillo	Rojo o naranja
ODC	Ornitina descarboxilasa	Amarillo	Rojo o naranja
CIT	utilización del citrato	Verde	Azul oscuro o turquesa
H <sub>2</sub> S	Producción de H <sub>2</sub> S	Sin precipitado negro	Precipitado negro
URE	Uresasa	Amarillo	Rojo o naranja
TDA	Triptófano desaminasa	Amarillo	Marrón-rojo
IND	Producción de indol	Amarillo	Color rosa o anillo rosa-rojo
VP	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)	Sin color	Rosa-rojo
GEL	Gelatinasa	Sin difusión	Difusión de pigmento
GLU	Fermentación/ oxidación de glucosa	Azul o verde	Amarillo
MAN	Fermentación/ oxidación de manitol	Azul o verde	Amarillo
INO	Fermentación/ oxidación de inositol	Azul o verde	Amarillo
SOR	Fermentación/ oxidación de sorbitol	Azul o verde	Amarillo
RHA	Fermentación/ oxidación de ramnosa	Azul o verde	Amarillo
SAC	Fermentación/ oxidación de sacarosa	Azul o verde	Amarillo
MEL	Fermentación/ oxidación de melobiosa	Azul o verde	Amarillo
AMY	Fermentación/ oxidación de amigdalina	Azul o verde	Amarillo
ARA	Fermentación/ oxidación de arabinosa	Azul o verde	Amarillo
OX	Citocromo oxidasa	No se produce cambio de color	Se produce cambio de color

Del conjunto de reacciones y resultados se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres: en total tenemos 7 grupos de tres tubos o tripletes (el test número 21 corresponde al test de la oxidasa). Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le dará el valor 0, 1, 2 ó 4, de acuerdo a los siguientes criterios:

- Si la reacción es negativa se pone 0.
- Si la reacción es positiva se pone: 1 si es el primer pocillo de un triplete, 2 si es el segundo, 4 si es el tercero.

Se suman los valores de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras. Con este código se busca en la tabla de identificación la especie de que se trata, para realizar esta operación hay programas informáticos. En la Figura 51 se muestra como ejemplo una prueba positiva para *Salmonella*.

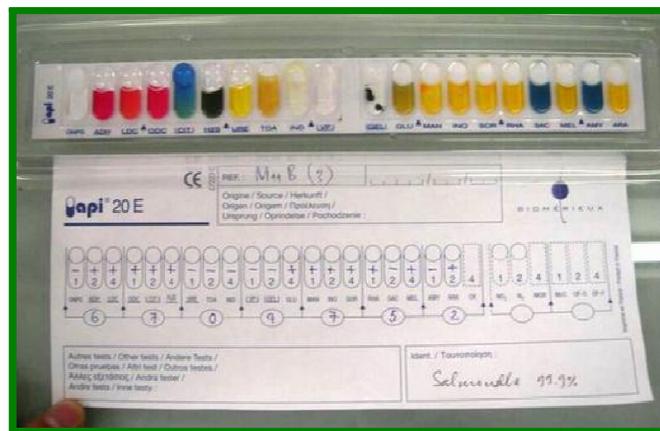


Figura 51: Ejemplo de API 20E positivo para *Salmonella*.

### 2.2.7.2.5 Serología somática

1. Se utilizaron los antisueros OSA, OSB y Vi (capsular).
2. Se marcaron círculos con marcador indeleble sobre una placa de Petri de vidrio.
3. Se colocó en un círculo una gota de solución fisiológica 0,85%.

4. Se tomó material crecido en la placa de TSA y se homogenizó en la gota; se movió la placa con movimientos de vaivén y se observó sobre una lámpara si se produce auto-aglutinación dentro de 1 min.
5. En los casos donde no hubo auto aglutinación, se repitió el mismo procedimiento con los antisueros OSA y OSB. En los casos donde no aglutinaron los antisueros OSA y OSB, se repitió con el antisuero Vi, ya que puede tratarse de una cepa con envoltura capsular.
  - Si Vi da negativo, se considera negativa la serología.
  - Si en Vi da positivo, se prosiguió haciendo una solución del material desarrollado en TSA en solución fisiológica 0,85%. Se colocó esta solución en un baño de agua hirviendo durante 30 - 60 min. y una vez frío se ensayó nuevamente con los sueros OSA y OSB.

Los resultados fueron clasificados de la siguiente manera:

- Positivo: aglutinación fuerte que aparece en no más de 1 min. con el suero OSA o OSB y/o Vi, sin aglutinación en solución salina.
- Negativo: sin aglutinación con ningún suero somático. Si la cepa es identificada bioquímicamente como *Salmonella* y la aglutinación flagelar es positiva, se debe tener en cuenta que puede tratarse de una cepa que aglutine otros sueros distintos a los utilizados (no frecuente en alimentos).

#### **2.2.7.2.6 Interpretación de resultados**

Se considera a la muestra como positiva para *Salmonella* cuando:

1. El desarrollo es típico en agar TSI y LIA y fue identificada bioquímica y serológicamente como tal. Se expresa: Detectable *Salmonella* spp.
2. El desarrollo es típico en agar TSI y LIA y fue identificada bioquímicamente pero no serológicamente. Se expresa: Detectable *Salmonella* spp. (no OSA-OSB-HS1-HSA-HSB-HSC).

Se considera a la muestra como negativa para *Salmonella* cuando:

1. El desarrollo no es típico en agar TSI y LIA. Se expresa: Ausencia de *Salmonella* spp en 25 g.
2. Ningún aislado es identificado bioquímica ni serológicamente. Se expresa: Ausencia de *Salmonella* spp en 25 g.

### **2.2.7.3 Screening de *Listeria* spp. por Rapidchek**

1. Se pesaron 25 g de salame en una bolsa estéril para stomacher.
2. Se agregaron 225 ml de caldo UVM y se homogeneizaron durante 1 min.
3. Se incubó a 30°C durante 24 hs.
4. Se agitó el medio y se pasaron 0,1 ml a un tubo con 10 ml de caldo Fraser previamente suplementado con citrato férrico de amonio al 5% estéril. El medio de enriquecimiento se guardó en heladera a 5°C.
5. Se incubó a 35° C durante 48 hs.
6. De aquellos tubos que a las 48 hs. presentaron ennegrecimiento, debido a la hidrólisis de la esculina, se tomó una alícuota y se trasvasó a un tubo, para someterla a un tratamiento térmico de 100°C durante 10 min. Los tubos de caldo Fraser que a los 48 hs no se ennegrecieron se consideran negativos para *Listeria* spp. Los tubos de caldo Fraser ennegrecidos se guardaron en heladera a 5°C.
7. Luego de enfriarse la muestra se transfirieron 400 µl a un tubo de hemólisis vacío.
8. Se colocó una tira reactiva dentro del tubo con las flechas apuntando hacia abajo, procurando que la tira haga contacto con la muestra.
9. Se dejó reaccionar durante 10 min.
10. Luego se observaron los resultados y se sacaron conclusiones de acuerdo a lo siguiente:
  - Al menos una línea (la del control) tiene que aparecer. Una línea roja en esta posición indica que el kit está funcionando adecuadamente.

- Si transcurridos los 10 min. solo se observa una línea (control), entonces la muestra será negativa para *Listeria spp.*
- La aparición de una línea roja por debajo de la línea de control indica que la muestra es positiva para *Listeria spp.* y se debe continuar con la confirmación de *Listeria monocytogenes* por USDA/FSIS (2008).
- Si transcurridos los 10 min. no aparece una línea roja el test queda invalidado y deberá repetirse.

#### **2.2.7.4 Confirmación de *Listeria monocytogenes* por USDA/FSIS (2008)**

La confirmación de aquellas muestras que dieron positivas se hizo mediante la norma USDA/FSIS (2008).

1. Se tomó una ansada del caldo UVM enriquecido y una del tubo de Fraser ennegrecido y se estriaron en placas de agar Oxford modificado (MOX) de manera de obtener colonias aisladas.
2. Se incubaron las placas a 35°C durante 26 hs.
3. Se observaron los resultados: colonias sospechosas de *Listeria spp* son pequeñas de aproximadamente 1 mm de diámetro, rodeadas de una zona de ennegrecimiento del medio debido a la hidrólisis de la esculina.
4. Se tomaron todas aquellas colonias sospechosas provenientes de los dos medios y se sembraron en agar sangre de caballo (HL) de manera de obtener colonias aisladas. Si no se observan colonias sospechosas en el MOX (tanto proveniente del UVM como del Fraser) luego de 48 hs. de incubación, la muestra es considerada negativa para *Listeria spp.*
5. Se incubaron las placas de agar HL a 35°C durante 22 hs.
6. Se examinaron las placas para verificar presencia de colonias translúcidas con una pequeña zona de  $\beta$ -hemólisis:
  - Si se observa al menos una colonia  $\beta$ -hemolítica bien aislada se procede con la confirmación.

- Si se observan colonias  $\beta$ -hemolíticas pero no se encuentran bien aisladas se reaíslan en una nueva placa de agar HL.
- Si no se observan colonias con  $\beta$ -hemólisis tanto de la marcha del Fraser como del MOX, la muestra se considera como negativa para *Listeria monocytogenes*.

Una vez leídas las placas de HL son mantenidas en refrigeración hasta completar el ensayo.

#### **2.2.7.4.1 Confirmación preliminar**

1. A partir de una colonia bien aislada en HL se siembra en agar TSA y caldo BHI (para observar la movilidad al microscopio).
2. El agar TSA fue incubado a 35°C durante 22 hs.; y el caldo BHI fue incubado a 25°C durante 18 hs. (en caso de no observarse turbidez se incubó hasta 48 hs.).
3. Se siembra al menos una colonia sospechosa; en caso de no detectarse la presencia de *L. monocytogenes* en ella se seguirá la confirmación en al menos 2 colonias más.

#### **2.2.7.4.2 Prueba de catalasa**

Se tomó una porción del cultivo en TSA y se colocó sobre una gota de agua oxigenada ubicada sobre el centro de una placa de Petri de vidrio grande. La presencia de burbujas indica una reacción positiva. *Listeria* spp. es catalasa positiva.

#### **2.2.7.4.3 Movilidad**

Esta prueba se realizó mediante una observación directa al microscopio del caldo BHI de la siguiente manera: se colocó una pequeña gota del cultivo sobre un cubreobjetos y éste se colocó invertido sobre un portaobjetos con muesca; para que el cubreobjetos quede fijo se colocó vaselina sólida en las 4 esquinas del cubre; se observó al microscopio con el objetivo de inmersión

(100 X); *Listeria* spp. son bacilos cortos y se mueven en forma de tumbos/rotatoria.

- Si la morfología de las células y la movilidad no son características de *Listeria* spp., y las cepas parecen puras, se reporta la muestra como negativa de *L. monocytogenes*.
- Si se observa una población mixta se reaísla sembrando una ansada del caldo BHI sobre una placa de HL y se procede como en el inciso 2.2.11.4.1.
- Si la morfología de las células es típica, la movilidad es evidente, son catalasa positivos y las cepas parecen puras, se continúa con las pruebas bioquímicas.

#### 2.2.7.4.4 Pruebas bioquímicas

Si la morfología de las células es típica, la movilidad es evidente, son catalasa positiva y las cepas parecen puras, se deben realizar las pruebas bioquímicas para confirmar. Estas pruebas fueron realizadas utilizando el kit MICRO-ID® *Listeria* (Figura 52).



**Figura 52:** Micropocillos de Microgen *Listeria* luego de la incubación.

Para la siembra del kit e interpretación de resultados se siguieron las instrucciones del fabricante, como se detalla a continuación:

1. Se seleccionó una colonia individual bien aislada de un cultivo de 24 hs y se mezcló con un vial del medio de suspensión para *Listeria* (2,5 ml).

2. Se mezcló hasta obtener una suspensión homogénea.
3. Se sacó una tira de micropocillos de su envase individual, se puso en el marco y se le sacó el precinto.
4. Con una pipeta Pasteur estéril, se transfirieron 4 gotas (aproximadamente 100µl) de la suspensión bacteriana a cada pocillo de la tira.
5. Se añadió 1 gota del reactivo hemolisina que provee el kit al pocillo 12.
6. Se volvió a sellar la tira y se incubó a 37°C durante 24 hs.
7. Después de la incubación se eliminó el sello y se anotaron los resultados en la hoja de resultados proporcionada por el proveedor.

Los resultados de cada reacción se observan según el color de cada pocillo como se indica en la Tabla 30.

**Tabla 30:** Reacciones positivas y negativas del test Microgen para *Listeria*.

Número de pocillo	Nombre de la reacción	Reacción	Positiva	Negativo
1	Esculina	Hidrólisis de esculina	Negro	Amarillo-paja
2	Manitol	Fermentación de azúcares específicos	Amarillo	Púrpura
3	Xilosa			
4	Arabitol			
5	Ribosa			
6	Rhamnosa			
7	Trethalosa			
8	Tagatosa			
9	Glucosa-1-Fosfato			
10	Metil-D-Glucosa			
11	Metil-D-Manosa			
12	Hemolisina	Hemólisis de glóbulos rojos de oveja	Marrón-paja, color homogéneo. No hay sedimento de glóbulos rojos.	Sedimento de glóbulos rojos. Color rojo-marrón.

En cuanto a la reacción de la hemolisina (pocillo 12) se analiza de la siguiente forma: se examina el fondo del pocillo para la presencia de una capa diferenciada o un sedimento de glóbulos rojos. En caso positivo, se interpreta como test negativo. La ausencia de una capa diferenciada o del sedimento de glóbulos rojos se interpreta como resultado positivo (Figura 53).

Por otro lado, se examina el inóculo en el pocillo. La presencia de una solución clara encima de una capa diferenciada de glóbulos rojos en el fondo del pocillo debería ser interpretada como test negativo. La presencia de una solución homogénea de color marrón-paja con ausencia del sedimento de glóbulos rojos se debe interpretar como test positivo (Figura 53).

Cuando los test son difíciles de leer, se sugiere poner el pocillo bajo una fuente de luz.

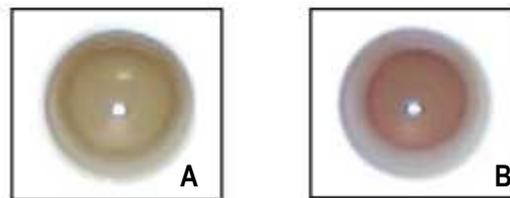


Figura 53: Test de hemólisis positivo (A) y negativo (B).

Los test, en la hoja de resultados, se organizan en tripletes (sets de 3 reacciones), a cada test se le asigna un valor numérico (1, 2 o 4). La suma de las reacciones positivas para cada triplete da un dígito del perfil numérico (código octal) que se utiliza para determinar la identidad del la *Listeria* spp. a identificar. El código octal se introduce en el Software Microgen Identification, que generará un informe de los 5 organismos más probables basándose en una base de dato seleccionada. En la Figura 54 se muestra una hoja de resultados para una muestra positiva para *Listeria monocytogenes*.

MICROGEN LISTERIA - ID REPORT FORM															
Lab. No. 2894		Specimen Type: GREEN SALAD													
Date: 28 <sup>th</sup> JANUARY 2002		MICROGEN BIOLOGICALS													
Reaction	Oxidase	Catalase	Late Aggl.	Esculin	Mannitol	Xylose	Arabinol	Fucose	Rhamnose	Trehalose	Tigatose	Gluc-1-Phos	M-D-Gluc	M-D-Man	Haemolysis
Result	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+
Reaction Index	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum of Positive Reactions	4		5		4		7								
Profile No: 4547	Final Identification: <i>Listeria monocytogenes</i>														

Figura 54: Ejemplo de una hoja de resultados de una muestra positiva para *Listeria monocytogenes*.

Para completar los resultados del kit se realizó la prueba de CAMP, la cual fue terciarizada al Laboratorio de Análisis.

#### **2.2.7.5 Screening para *E. coli* O157 por Rapidchek**

1. Se pesaron 65 g de salame en una bolsa estéril para stomacher.
2. Se agregaron 585 ml de caldo Rapidchek para *E. coli* y se homogeneizó durante 1 min.
3. Se incubó a 42°C durante 10 hs.
4. Se transfirieron 1 ml de muestra a un tubo de hemólisis vacío.
5. Se colocó una tira reactiva dentro del tubo con las flechas apuntando hacia abajo, procurando que la tira haga contacto con la muestra.
6. Se dejó reaccionar durante 10 min.
7. Se observaron los resultados y se sacaron conclusiones de acuerdo a lo siguiente:
  - Al menos una línea (la del control) tiene que aparecer. Una línea roja en esta posición indica que el kit está funcionando adecuadamente.
  - Si transcurridos los 10 min. solo se observa una línea (control), entonces la muestra será negativa para *E. coli* O157.
  - La aparición de una línea roja por debajo de la línea de control indica que la muestra es positiva para *E. coli* O157 y debe continuarse con su identificación.
  - Si transcurridos los 10 min. no aparece una línea roja el test queda invalidado y deberá repetirse.

#### **2.2.7.6 Confirmación de *E. coli* O157:H7/NM por USDA/FSIS (2008)**

La confirmación de aquellas muestras que dieron presuntivas positivas se terciarizaron al Laboratorio de Análisis. La norma utilizada fue USDA/FSIS (2008).

### **2.3 Análisis de la influencia del tiempo de maduración y el uso de cultivos iniciadores en la calidad microbiológica de los salames**

En noviembre de 2011 se realizó un ensayo para evaluar la influencia del tiempo de maduración y el uso de cultivos iniciadores (bacterias lácticas) en la calidad microbiológica de los salames de Colonia Caroya. Para ello, en 5 establecimientos elaboradores se prepararon 25 Kg de la fórmula base de cada uno de ellos, y 25 Kg de la fórmula base más el agregado de 7 g de fermento Bactoferm F-SC-111 de Chr. Hansen (*Staphylococcus carnosus* MIII y *Lactobacillus curvatus* HJ5) y 7,5 g de azúcar. La elaboración de los salames estuvo a cargo de cada establecimiento elaborador con la ayuda de profesionales del INTI carnes.

Se realizó un análisis microbiológico según los criterios establecidos en el CAA a los 14, 21 y 28 días de elaboración para los salames con y sin fermentos.

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1 Análisis microbiológico de los salames de Colonia Caroya**

Al analizar las muestras, observamos que los días de goteo de los salames analizados en el primer muestreo, están entre los 2 y los 7 días, siendo en promedio aproximadamente 4 días. En el caso del tiempo de maduración, variaron entre los 5 y 35 días, siendo en promedio de 21 días aproximadamente. En cuanto al uso de tripa natural o sintética, aproximadamente el 80% de los elaboradores utilizaban tripa natural (Tabla 31). Por último, se indagó sobre el uso de cultivos iniciadores y ninguno de los elaboradores declaró utilizarlos.

El recuento de *Staphylococcus* coagulasa positivo no se pudo realizar debido a que los criterios establecidos en el 2011 por la CONAL se encontraban entre 10 y 100 UFC/g, y según la metodología propuesta no se lograban visualizar las colonias correctamente, ya que la flora acompañante crecía en alta cantidad dificultando ver las colonias negras con doble halo de hidrólisis, típicas de este microorganismo en el medio Baird Parker (Figura 55).

**Tabla 31:** Resultado de la encuesta a cada elaborador realizada en el primer muestreo (julio-septiembre 2011), contemplando días de goteo y de maduración del salame, y el uso de tripa natural (N) o sintética (S).

Establecimiento	A	B	C	D	E	F	G	H
Días de goteo	3	7	6	4	4	5	2	2
Días de maduración	10	23	25	20	5	15	23	26
Tipo de tripa	N	N	N	2 N y 1 S	N	N	N	S

Establecimiento	I	J	K	L	M	N	O	P
Días de goteo	2	7	5	5	5	4	4	4
Días de maduración	26	22	35	7	27	20	28	20
Tipo de tripa	N	N	N	N	N	N	N	S



**Figura 55:** Placa de medio Baird Parker con alto crecimiento de flora acompañante.

De los 16 establecimientos elaboradores de salames de Colonia Caroya analizados en el primer muestreo realizado en 2011 se encontró que el 56% de ellos no cumplieron con los criterios microbiológicos que define el CAA (Tabla 32).

Cabe destacar que en todos los casos se analizaron 3 salames por lote por establecimiento, cuando en realidad el CAA exige 5 muestras, debido a esto en el caso de microorganismos indicadores se utilizó el mínimo valor en cada caso establecido (m) para determinar cumplimiento del criterio de dicho lote.

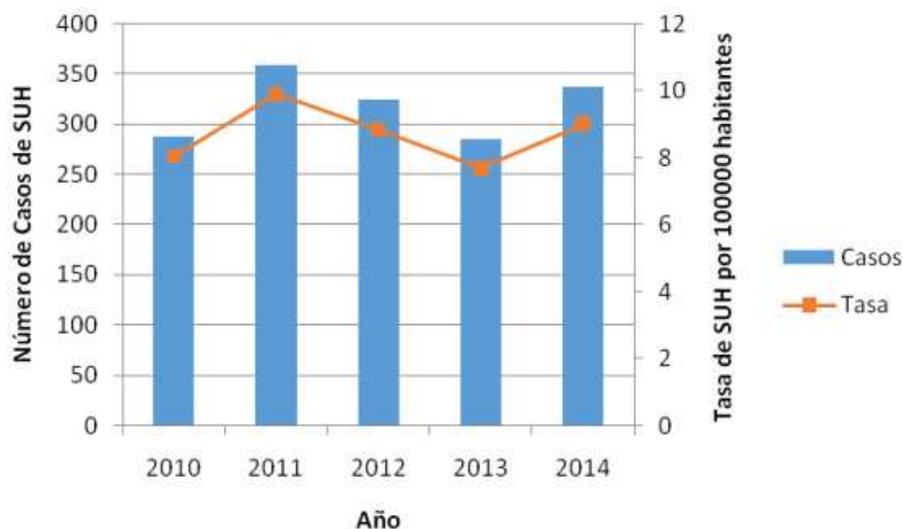
**Tabla 32:** Resultados microbiológicos de los salames provenientes del primer muestreo (julio-septiembre 2011) de cada elaborador (n=3).

Parámetro/ Establecimiento	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
<i>E. coli</i> O157:H7/NM	X															
<i>Salmonella</i> spp.	X			X												
<i>Listeria monocytogenes</i>			X	X												
Recuento de <i>E. coli</i>	X						X						X			
Recuento de anaerobios sulfito reductores	X						X			X	X		X		X	X

Color rojo indica riesgo grave, color naranja riesgo moderado, color amarillo debe controlarse las medidas higiénicas sanitarias y color verde indica que están dentro de especificaciones. X: indica un valor superior al límite establecido en el CAA.

En Argentina, el síndrome urémico hemolítico (SUH), enfermedad transmitida por *E. coli* O157:H7/NM, es de notificación obligatoria desde el año 2000 al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Ministerio de Salud de la Nación), por lo cual se puede acceder a estadísticas oficiales de los casos de esta enfermedad en nuestro país. En el Boletín Integrado de Vigilancia N° 251 Marzo 2015 se informa que en el año 2014 hubo 392 casos de SUH, afectando en un 86% a niños menores de 5 años. En la Figura 56 se observa que los casos de SUH en niños menores de 5 años se mantienen desde 2010 hasta 2014 alrededor de los 300 por año, con el mayor número en 2011 (358) y el menor en 2013 (285). Estos valores constituyen uno de los más altos del mundo para dicha enfermedad (Rivas *et al.*, 2010).

En los casos de enfermedades transmitidas a partir de *Salmonella* sp. y a partir de *Listeria monocytogenes*, no se encuentran registros oficiales de Argentina, ya que estas enfermedades no son de declaración obligatoria en nuestro país.



**Figura 56:** Casos y tasas de SUH en menores de 5 años en Argentina entre 2010 y 2014.

En el caso de nuestros resultados, en los salames de Colonia Caroya se encontraron todos los microorganismos patógenos analizados, estando implicados 3 establecimientos elaboradores (Tabla 32, color rojo).

Los microorganismos patógenos encontrados en los salames caroyenses implican un riesgo sanitario muy elevado, y han sido detectados en embudidos de diferentes partes del mundo (Moore, 2004; Thevenot *et al.*, 2005; De Cesare *et al.*, 2007; Sartz *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2011).

En cuanto a la inactivación de *E. coli* O157:H7/NM en productos cárnicos secos y fermentados, Lindqvist and Lindblad (2009) observaron que a 8°C de almacenamiento requiere de 21 días mínimo para reducir en un orden logarítmico la concentración, mientras que a 20°C este tiempo se reduce a 10 días aproximadamente.

Thévenot *et al.* (2005) trabajaron con 13 plantas productoras de salames de Francia, encontrando que el 33% de la carne cruda analizada se encontraba contaminada con *L. monocytogenes*, pero este nivel ascendía al 72% aproximadamente cuando la carne era picada. Este aumento se debía a que los equipos (picadora, embudidora), mesadas, etc, también mostraron altos niveles de contaminación con esta bacteria, aún después de haber realizado las tareas de limpieza y desinfección habituales de la empresa. Esto podría deberse a una mala limpieza y desinfección, teniendo en cuenta que esta

bacteria puede formar biofilms (Autio *et al.*, 1999) y además que una vez formados estos, son muy difíciles de remover (Aase *et al.*, 2000). Sin embargo, al analizar los salames después de la maduración (entre 21 y 30 días), sólo en el 10% se detectó esta bacteria. Si bien se observó una gran disminución entre la carne cruda y el producto final, no hay que olvidarse que esta bacteria es muy peligrosa, por lo cual no debería encontrarse en ningún producto. Estos mismos resultados fueron encontrados en salames elaborados en Grecia (Samelis *et al.*, 1998) y en España (Encinas *et al.*, 1999). La disminución de la contaminación en el producto final está relacionada con el descenso de pH que sufre el salame durante la fermentación por las bacterias lácticas (las cuales son adicionadas en estos casos como fermentos), el descenso de  $a_w$  y las altas concentraciones de sal.

Mataragas *et al.* (2015) cuantificaron la persistencia de *L. monocytogenes* y *Salmonella entérica* en salames inoculados intencionalmente con concentraciones de  $10^4$ - $10^5$  UFC/g. Los resultados mostraron que *L. monocytogenes* sobrevivió mejor que *S. enterica* durante la producción de los salames. *Salmonella* es una bacteria gram negativa, la cual es mas susceptible a la fermentación y la maduración comparada con bacterias gram positivas (Ockerman and Basu, 2007). La inactivación de *Listeria* fue más rápida en los salames de corto tiempo de maduración (20 días), mientras que en el caso de *Salmonella*, la mayor inactivación se alcanza en los salames de largo tiempo de maduración (40 días). Estos resultados podrían deberse a que *Listeria* es inactivada por los bajos niveles de pH que mostraron en este estudio los salames de corto tiempo de maduración, sumado a las temperaturas más altas que se utilizan en las primeras horas; sin embargo en el caso de *Salmonella*, se ve más afectada esta bacteria por la reducción de la  $a_w$  que por los cambios de pH.

En cuanto al resto de los parámetros microbiológicos evaluados en los salames caroyenses, en 6 establecimientos (Tabla 32, color naranja y amarillo) se encontraron microorganismos que indican malas prácticas higiénico sanitarias, y/o el mal uso de la sal nitro (*E. coli* y/o anaerobios sulfitos reductores). Los 7 establecimientos restantes cumplieron con los criterios microbiológicos evaluados (Tabla 32, color verde).

La importancia de analizar el recuento de anaerobios sulfitos reductores, radica en que son microorganismos que indican la posible presencia de especies de *Clostridium*. La peligrosidad de encontrar por ejemplo *Clostridium botulinum* radica en la posible producción de la toxina botulínica. El botulismo es una enfermedad de declaración obligatoria en Argentina. En el año 2014 hubo 11 casos notificados, confirmándose 6 de ellos (Boletín Integrado de Vigilancia N°252, Abril 2015).

*E. coli* también es un microorganismo indicador, y su presencia indica que hubo una contaminación fecal en el producto.

No se observó correlación entre los días de maduración y secado de los salames (Tabla 32) y los resultados microbiológicos obtenidos (Tabla 33). Tampoco estos resultados se pudieron correlacionar con el uso de tripa natural o sintética.

Una vez obtenidos los resultados de este primer análisis microbiológico se realizó un taller con los elaboradores de la Colonia en el Centro Integrador Comunitario (Figura 57).



**Figura 57:** Taller con los elaboradores de salames de la Colonia en el Centro Integrador Comunitario (CIC).

En el mismo se mostraron los resultados en forma integral y en forma confidencial a cada elaborador, y a su vez se realizó un taller de capacitación sobre la importancia de las buenas prácticas de manufactura durante todo el proceso, entre lo que se destacó la limpieza y desinfección de las maquinarias utilizadas para la elaboración de los salames (picadora, mezcladora, embudidora) para evitar una contaminación cruzada, las condiciones higiénico

sanitarias de las personas implicadas en la elaboración y el uso de temperaturas adecuadas durante todo el proceso. También se capacitó sobre el correcto uso de la sal nitro, entre otros temas relacionados a la formulación. Hay que tener en cuenta que este fue un primer diagnóstico para ellos ya que la mayoría de los elaboradores muy pocas veces habían realizado análisis microbiológicos a sus productos, como así tampoco habían sido capacitados en buenas prácticas de manufactura.

Un mes y medio después de realizado el taller, se volvió a tomar muestras de salames de aquellos establecimientos que habían tenido un riesgo grave o moderado asociado a sus salames (Tabla 32, color rojo y naranja). Los resultados mostraron una importante mejora, ya que no se encontraron microorganismos patógenos en ninguno de los elaboradores analizados (Tabla 33).

**Tabla 33:** Resultados de los análisis microbiológicos de los salames de cada elaborador (n=3) que había tenido un riesgo grave o moderado en el primer muestreo.

Parámetro/ Establecimiento	A	C	D	G	M
<i>E. coli</i> O157:H7/NM					
<i>Salmonella</i> spp.					
<i>Listeria monocytogenes</i>					
Recuento de <i>E. coli</i>					
Recuento de anaerobios sulfito reductores	X			X	

Color amarillo indica que se deben controlarse las medidas higiénicas sanitarias y color verde indica que están dentro de especificaciones. X: indica un valor superior al límite establecido en el CAA.

En 3 establecimientos todos los parámetros dieron dentro de los criterios establecidos por el CAA (considerando un n=3). Sólo en 2 establecimientos se encontraron microorganismos indicadores como anaerobios sulfitos reductores fuera de especificación, lo cual podría indicar que estos establecimientos no habían utilizado la proporción de sal nitro recomendada o los embutidos no habían llegado al pH y  $a_w$  recomendados actualmente (5,2 y menor a 0,91, respectivamente). Cabe aclarar, que al momento que se realizó este análisis no se habían fijado valores de pH y  $a_w$

recomendados, esto fueron incorporados después en el protocolo de IG del salame típico de Colonia Caroya, los cuales salieron de análisis y experiencias realizadas.

Nuevamente tuvimos el inconveniente con el recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivo que no se pudo cuantificar debido a que la flora acompañante crecía en alta cantidad dificultando la visualización de las colonias típicas de este microorganismo.

En cuanto al segundo muestreo, realizado en 2012, al observar los días de secado de los salames, vimos que variaron entre 2 y 6 días, siendo en promedio de 3,5 días. Los tiempos de maduración en este caso estuvieron entre 15 y 26, promediando 21 días. Estos valores son muy similares a los informados para el primer muestreo. En cuanto al tipo de tripa utilizado, más del 80% de los elaboradores utilizaron tripa natural (Tabla 34). Y por último, el 100% de los elaboradores declararon no utilizar bacterias lácticas en sus productos.

**Tabla 34:** Resultado de la encuesta realizada a cada elaborador en el segundo muestreo (junio 2012), contemplando días de goteo y días de maduración del salame, y el uso de tripa natural (N) o sintética (S).

Establecimiento	A	C	E	F	G	H	I	N	O	P	Q	R
Días de goteo	3	6	4	5	2	2	2	4	7	4	2	2
Días de maduración	26	21	24	15	23	26	26	15	15	18	22	22
Tipo de tripa	N	N	N	2 N y 1 S	N	S	N	N	N	N	N	N

De los 12 establecimientos analizados en este segundo muestreo, el 58% se encontraron dentro de las especificaciones microbiológicas que establece el CAA (considerando n=3), y el 42% restante no cumplieron con los criterios establecidos en el CAA para el recuento de *E. coli* y anaerobios sulfitos reductores (Tabla 35). Podemos observar respecto al primer muestreo microbiológico que aquellos establecimientos que tenían un riesgo sanitario grave, por la presencia de microorganismos patógenos (A y C), en este segundo muestreo se encontraron dentro de las especificaciones. Por otro lado, los establecimientos F, H e I siguen manteniendo los valores dentro de los límites del CAA. Los establecimientos O y P siguen teniendo problemas de inocuidad. Los establecimientos E y N pasaron de estar dentro de las

especificaciones a tener problemas de inocuidad y el establecimiento G si bien mejoró sigue estando fuera de las especificaciones.

Cuando se realizó este muestreo ya estaban establecidos los límites para chacinados en el CAA, por lo cual se pudo cuantificar correctamente el recuento *Staphylococcus coagulasa* positivo.

No se encontró, al igual que en el muestreo anterior, ninguna correlación entre los días de maduración de cada salame (Tabla 34) con los resultados microbiológicos obtenidos (Tabla 35), como así tampoco se vio que estos tuvieran relación con el tipo de tripa utilizada (natural o sintética).

**Tabla 35:** Resultados de los análisis microbiológicos de los salames del segundo muestreo (junio 2012) de cada elaborador (n=3).

Parámetro/ Establecimiento	A	C	E	F	G	H	I	N	O	P	Q	R
<i>E. coli</i> O157:H7/NM												
<i>Salmonella</i> spp.												
<i>Listeria monocytogenes</i>												
Recuento de <i>E. coli</i>			X									
Recuento de <i>Staphylococcus coagulasa</i> +												
Recuento de anaerobios sulfito reductores					X			X	X	X		

Color amarillo indica que se deben controlarse las medidas higiénicas sanitarias y color verde indica que están dentro de especificaciones.

X: indica un valor superior al límite establecido en el CAA.

Estos resultados indican la importancia de seguir trabajando en la capacitación continúa de los elaboradores, mostrándoles la importancia de aplicar las buenas prácticas de manufactura para lograr un producto inocuo.

Luego de realizar un nuevo taller con los elaboradores, se realizó un tercer muestreo en el año 2013, los resultados muestran que todos los establecimientos analizados están dentro de las especificaciones que exige el CAA (con un n=3) (Tabla 36). Si bien se incorporaron 3 establecimientos que antes no se habían muestreados, el resto ya habían sido analizados, por lo cual se ve una gran mejoría en estos casos.

Si bien después de haber realizado los talleres con los elaboradores se observó una mejoría importante en cuanto a la calidad microbiológica de los salames, creemos que es fundamental continuar con la capacitación a los elaboradores y con muestreos microbiológicos frecuentes, ya que el salame es un producto que al formularse con carne cruda y no sufrir ningún tratamiento térmico es muy susceptible a cualquier contaminación.

**Tabla 36:** Resultados de los análisis microbiológicos de los salames del tercer muestreo (septiembre 2013) de cada sitio elaborador (n=3).

Parámetro/ Establecimiento	A	F	I	N	O	P	Q	S	T	U
<i>E. coli</i> O157:H7/NM										
<i>Salmonella</i> spp.										
<i>Listeria monocytogenes</i>										
Recuento de <i>E. coli</i>										
Recuento de <i>Staphylococcus coagulasa</i> +										
Recuento de anaerobios sulfito reductores										

Color verde indica que están dentro de especificaciones.

### 3.2 Análisis de la influencia del tiempo de maduración y el uso de cultivos iniciadores en la calidad microbiológica de los salames

De los 5 establecimientos que participaron de este estudio, en 2 de ellos se encontró a los 14 días de maduración que los salames sin fermento tenían una carga de 9 NMP/g de *E. coli*, la cual supera a la especificada en el CAA (<3 NMP/g). Pero al analizar los salames con la utilización de fermento y azúcar a los 14 días de maduración, se observó que en los productos de los 5 establecimientos analizados, todos los parámetros estaban dentro de las especificaciones. Por ello, podemos decir que el agregado de fermentos disminuye el tiempo en el cual los embutidos elaborados en Colonia Caroya llegan a una buena calidad microbiológica, en comparación con un salame control que no utiliza bacterias lácticas adicionadas. Estos resultados concuerdan con los observados por Ciuciu Simion *et al.* (2014), quienes

evaluaron el efecto de la adición de bacterias lácticas sobre el recuento de *Enterobacterias* en salames.

Baka *et al.* (2011) estudiaron el efecto de la adición de fermentos lácticos autóctonos seleccionados, sobre la calidad de salames fermentados elaborados en Grecia, comparados con salames formulados sin la adición de fermentos. Los resultados mostraron que las bacterias ácido lácticas (BAL) dominan la microflora durante toda la fermentación y maduración, llegando a su máxima concentración aproximadamente en el día 16 de maduración, siendo menor esta concentración en aquellos salames donde no fueron inoculados starters, los cuales llegan a su máximo de BAL cerca del día 25 de maduración. La dominancia de estas bacterias tienen un efecto sobre la higiene del producto inhibiendo patógenos y otras bacterias indeseables, debido a la acidificación que provocan en la matriz o bien por la producción de antimicrobianos (Villani *et al.*, 2007).

Como la decisión de los elaboradores de Colonia Caroya en conjunto fue no utilizar bacterias iniciadoras en sus productos, tal como venían haciéndolo desde siempre, en base a los resultados microbiológicos obtenidos podemos decir que 21 días es el tiempo de maduración suficiente para obtener una carga microbiana dentro de los límites establecidos por el CAA.

Si bien los elaboradores de salames de Colonia Caroya prefieren no utilizar fermentos comerciales, quizás por el hecho de pensar que sus productos perderían tipicidad, en muchas partes del mundo se utilizan fermentos lácticos elaborados a partir de bacterias autóctonas provenientes de la carne cruda de cada región. Esta flora indígena está adaptada a las condiciones de fermentación habituales de estos productos, controlan el proceso de maduración e inhiben microorganismos espontáneos. Esto da seguridad y estandarización a los salames artesanales, sin perder tipicidad. Estos starters autóctonos pueden contribuir a la producción de productos fermentados regionales típicos, con propiedades específicas. Ellos contribuyen en el flavour, color y textura, dando estabilidad y seguridad a los productos (Leroy *et al.*, 2006).

En aquellos productos que son elaborados sin la adición de fermentos, la fermentación se da por las cepas de bacterias lácticas que trae originalmente la carne cruda. Considerando que las cepas que traerán las materias primas no

siempre serán las mismas, esto generará una determinada población de microorganismos y por ende eso llevará a que no siempre se comporten de igual manera (Baka *et al.*, 2011).

Frece *et al.* (2014) compararon propiedades sensoriales y calidad microbiológica de salames de Croacia elaborados con fermentos comerciales y de salames elaborados con fermentos autóctonos. En cuanto a la calidad microbiológica de los salames, no se vieron diferencias entre el uso de uno u otro starter. En todas las muestras analizadas no se detectaron a los 30 días de maduración *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* y *Enterobacterias*. Si bien no hubo diferencias significativas, todos los salames elaborados con starters autóctonos mostraron altas calificaciones en cuanto a los atributos sensoriales en comparación con los salames elaborados a partir de cultivos comerciales.

## **CAPÍTULO V**

### **INCIDENCIA DE OCRATOXINA A EN LOS SALAMES ELABORADOS EN COLONIA CAROYA**

#### **1. OBJETIVO ESPECÍFICO**

El objetivo de este capítulo fue analizar la incidencia de ocratoxina A (OTA) en salames elaborados en Colonia Caroya. Para ello, además de analizar el producto final, se analizaron las materias primas utilizadas para su elaboración.

#### **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **2.1 Determinación de ocratoxina A en salames y materias primas**

###### **2.1.1 Muestreo**

En este estudio, se trabajó con 8 establecimientos elaboradores de salames de Colonia Caroya (A, C, F, I, N, O, P y Q), todos ellos de elaboración artesanal. Las muestras que se obtuvieron fueron en primera instancia las materias primas mayoritarias utilizadas en la elaboración de dichos productos (carne de vaca, carne de cerdo, grasa de cerdo, vino blanco y pimienta), y luego de aproximadamente 30 días, los salames elaborados con los lotes de materias primas muestreadas.

Se realizaron dos muestreos (Tabla 37), el primero se llevó a cabo entre los meses de noviembre y diciembre de 2012, y el segundo entre febrero y marzo de 2013.

Durante los muestreos se le pidió a cada elaborador que completara una planilla donde se registraron datos sobre los proveedores de las materias primas, para luego poder realizar un análisis más completo de los resultados obtenidos. La Tabla 38 muestra la procedencia de cada una de las materias primas utilizadas en la elaboración de salames caroyenses por cada elaborador.

**Tabla 37:** Detalle de los muestreos.

Establecimiento	1º Muestreo	2º Muestreo
A	A1	A2
C	C1	C2
F	F1	F2
I	I1	I2
N	N1	N2
O	O1	nm
P	P1	nm
Q	Q1	nm

nm: no muestreado.

**Tabla 38:** Proveedores de cada una de las materias primas utilizadas en la producción de salames.

Establecimiento /proveedor	Carne Vacuna	Carne Porcina	Grasa	Vino Blanco	Pimienta Blanca Molidas
A	ne	Frigorífico Santa María	Frigorífico Santa María	Vinoteca de José, Seco	Guzmán
C	Propio	Frigorífico Tirolesa	Frigorífico Tirolesa	Nanini, Torrontés	El Danés
F	Frigorífico Tirolesa	Frigorífico Santa María	Frigorífico Santa María	Nanini, Seco	Bavosi
I	Frigorífico Estancias del Sur	Frigorífico Santa María	Frigorífico Santa María	Nanini, Seco	Oscar Dulce
N	Frigorífico Estancias del Sur	Frigorífico Santa María	Frigorífico Santa María	Nanini, Seco	Oscar Dulce
O	Frigorífico Estancias del Sur	Frigorífico Santa María	Frigorífico Santa María	ne	Oscar Dulce
P	Frigorífico Estancias del Sur	Frigorífico Santa María	Frigorífico Santa María	Nanini, Seco	Carneloti
Q	Frigorífico Estancias del Sur	ne	ne	Nanini, Seco	Oscar Dulce

ne: no especificado.

También fueron adquiridos comercialmente diferentes salames de tipo “artesanal” en distintos puntos de venta del país, y pimientas y vinos blancos, de distintas marcas comerciales, en supermercados (Tablas 39, 40 y 41).

**Tabla 39:** Salames comerciales, no caroyenses, de tipo artesanal analizados.

	<b>Denominación</b>	<b>Procedencia</b>
<b>SA1</b>	Salame, picado grueso	Merlo, San Luis
<b>SA2</b>	Salame criollo, tipo campo	Chascomús, Buenos Aires
<b>SA3</b>	Salame “tandilero”, picado grueso	Tandil, Buenos Aires
<b>SA4</b>	Salame, picado grueso	Mataderos, C.A.B.A
<b>SA5</b>	Salame tipo crespón	Santa Lucia, Buenos Aires

**Tabla 40:** Pimientas comerciales analizadas.

	<b>Denominación</b>	<b>Marca comercial</b>
<b>PI1</b>	Pimienta blanca molida	Dos Anclas
<b>PI2</b>	Pimienta blanca molida	La Parmesana
<b>PI3</b>	Pimienta blanca molida	Ciudad del Lago
<b>PI4</b>	Pimienta blanca molida	Alicante
<b>PI5</b>	Pimienta blanca molida	Kokito

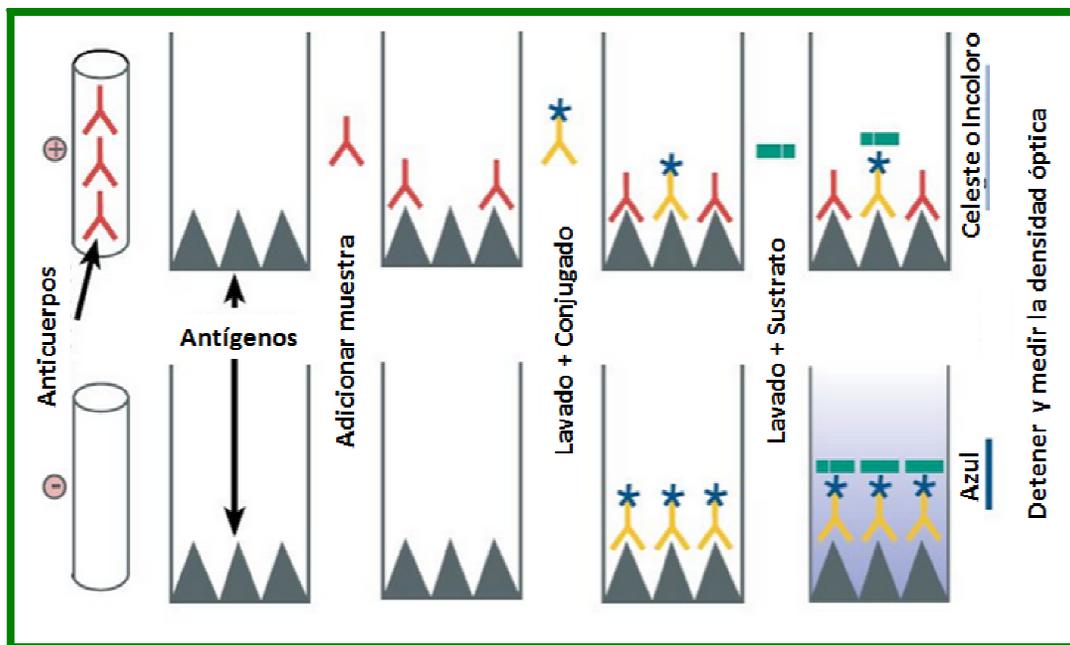
**Tabla 41:** Vinos blancos comerciales analizados.

	<b>Denominación y/o variedad</b>	<b>Marca comercial</b>
<b>VI1</b>	Sauvignon Blanc	Trapiche
<b>VI2</b>	Vino blanco clásico	Norton
<b>VI3</b>	Chardonnay	Finca Natalina
<b>VI4</b>	Vino Blanco	López
<b>VI5</b>	Chardonnay	Elementos

### 2.1.2 Análisis de ocratoxina A en carne (vacuna y porcina)

Para determinar la incidencia de OTA en las distintas carnes se utilizó la técnica de inmunoensayo empleando el kit comercial Ridascreen OTA 30/15 siguiendo el procedimiento descrito por el proveedor del kit. La base del ensayo es la reacción antígeno-anticuerpo. Los pocillos que se utilizan están recubiertos con anticuerpos específicos para OTA. Los 6 estándares de OTA (0 - 1800 ppt), las muestras y la enzima conjugada son adicionados. La OTA libre y el conjugado OTA- enzima compiten por los sitios de unión de los anticuerpos, tratándose por lo tanto de un inmunoensayo enzimático

competitivo (Figura 58). Con un paso de lavado se remueven los conjugados no unidos. Luego se adiciona sustrato/ cromógeno a los pocillos. El conjugado enzimático unido convierte al cromógeno en un producto azul. La adición de la solución stop cambia el color azul por amarillo. La medición se hace fotométricamente a 450 nm mediante un lector Elisa (R-Biopharm). La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de OTA en la muestra.



**Figura 58:** Principio del ensayo ELISA competitivo positivo y negativo.

Fuente: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/ELISA-types/competitive-elisa>

### 2.1.2.1 Preparación y extracción de las muestras

Se cortaron aproximadamente 10 g de carne y se procesaron utilizando un homogeneizador minipimer (Braun). Cuando se obtuvo una pasta homogénea, se tomó una porción de la misma de 1 g y se la colocó en un tubo Falcon de 15 ml. Luego, se realizó el procedimiento de extracción descrito por el proveedor del kit, el cual se describe a continuación:

1. Se adicionaron 0,5 ml de  $H_3PO_4$  1 M a cada tubo y se mezcló en vórtex durante aproximadamente 1 minuto.

2. Se adicionaron 3 ml de acetato de etilo y se mezcló en vórtex durante 30 segundos.
3. Se centrifugaron (Thermo Cientific) las muestras durante 1 min. a 2000 g.
4. Se transfirió el sobrenadante de cada muestra, dentro de un nuevo tubo Falcon.
5. Se adicionaron 3 ml de acetato de etilo al residuo sólido, y se mezcló en vórtex durante 30 segundos.
6. Se centrifugaron las muestras durante 1 minuto a 2000 g.
7. Se transfirió el sobrenadante de cada muestra al tubo que contenía la primera porción de acetato de etilo, retirada en el paso N° 4.
8. Se adicionaron 3 ml de  $\text{NaHCO}_3$  0,65 M a la mezcla de sobrenadantes obtenida previamente, y se mezcló en vórtex por 15 segundos.
9. Se continuó mezclando por inversión los tubos durante 15 min.
10. Se centrifugaron las muestras durante 5 min. a 2000 g.
11. Se transfirió 1 ml de la fase acuosa inferior a un tubo de vidrio de 12 ml.
12. Se sumergieron los tubos de vidrio, resultantes de cada uno de los ensayos correspondientes a las diferentes muestras, en un baño de agua a  $100^\circ\text{C}$  por 3 min.
13. Se dejaron enfriar las muestras, y se agitaron suavemente. Se adicionaron 4 ml de agua destilada a cada una.
14. Se diluyó (1:1) cada muestra con  $\text{NaHCO}_3$  0,13 M.
15. 50  $\mu\text{l}$  de cada extracto resultante se utilizaron para el inmunoensayo.

### **2.1.2.2 Inmunoensayo**

1. Se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de las soluciones patrones y 50  $\mu\text{l}$  de cada muestra en los pocillos.
2. Se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de la solución de enzima conjugada. Se mezclaron las muestras, deslizando la gradilla suavemente en forma de cruz sobre la mesada y se incubó durante 30 min. en oscuridad.
3. Se descartó el líquido de los pocillos y se adicionaron 250  $\mu\text{l}$  de solución de lavado. Se descartó el contenido de los pocillos y se golpeó

suavemente 3 veces la gradilla invertida sobre un papel absorbente. Se repitió este procedimiento de lavado 2 veces más.

4. Se adicionaron 100 µl de la solución cromógeno en cada pocillo, se mezclaron las muestras, deslizando la gradilla suavemente en forma de cruz sobre la mesada y se incubó durante 15 min. en oscuridad.
5. Se adicionaron 100 µl de la solución stop, se mezclaron las muestras, deslizando la gradilla suavemente en forma de cruz e inmediatamente se midió la absorbancia a 450 nm en un lector ELISA.

Para calcular las concentraciones de OTA de cada muestra se utilizó el Software Rida Soft Win entregado por el proveedor, utilizando un factor de dilución de 30. El rango de cuantificación del kit es de 1500-54000 ppt.

### **2.1.3 Análisis de ocratoxina A en grasa porcina**

Para determinar la incidencia natural de OTA en el tejido adiposo empleado en la elaboración de los salames muestreados, también se utilizó el inmunoensayo para ocratoxina A Ridascreen OTA 30/15. La preparación y extracción de las muestras, al igual que el inmunoensayo se realizaron como se describe en los incisos 2.1.2.1 y 2.1.2.2.

Dado que el mencionado kit no fue diseñado específicamente para aplicarse sobre grasa animal, se decidió confirmar los valores obtenidos enviando 2 muestras de grasa a un laboratorio externo, donde se realizó una extracción de la toxina de acuerdo con el método AOAC, *Official Methods of Analysis* (1995) 991.44, y luego se cuantificó mediante HPLC-FLD. El extracto obtenido se analizó con un equipo HPLC (Merck-Hitachi), empleando una columna C18 (150 mm x 4,6 mm) y con tamaño de partículas de 5 µm. La fase móvil utilizada fue agua: acetonitrilo: ácido acético (99+99+2). El detector FLD (Hitachi L-2485) empleado fue programado con excitación a 333 nm y emisión a 460 nm. La concentración de OTA fue calculada por estándar externo. El límite de detección de la técnica es de 1 ppb.

### **2.1.4 Análisis de ocratoxina A en pimienta blanca molida y vino blanco**

Para determinar la incidencia de OTA en vino y pimienta blanca molida se utilizó el enzimoimmuno análisis directamente competitivo (ELISA) AgraQuant<sup>®</sup> Ocratoxina 2/40, por estar validado para dichas matrices siguiendo las notas de aplicación provistas por el proveedor. Este ensayo se basa en el mismo principio explicado en el inciso 2.1.2.

#### **2.1.4.1 Preparación y extracción de las muestras: pimienta blanca molida**

Se tomó una porción representativa de la muestra y fue molida en un molinillo de mesada, hasta que el 75% de la misma pasó a través de un tamiz de IRAM 1501/76 N° 20 (abertura de poro de 850 µm).

Se tomaron 10 g de la muestra molida, se colocaron dentro de un frasco estéril de 100 ml y se agregaron 50 ml de solución de metanol/agua 70/30 (v/v) a la muestra.

1. Se agitó el frasco por inversión durante 30 min.
2. Se dejó decantar la porción sólida, y se filtró el sobrenadante mediante un papel de filtro Whatman N° 1.
3. Se recolectó el filtrado y se lo diluyó con metanol/agua 70/30 (v/v) en una relación de 1:3.
4. Se midió el pH comprobando que estuviera en el rango de 6 a 8, en caso contrario se ajustó con NaOH 1 M.

#### **2.1.4.2 Preparación y extracción de las muestras: vino blanco**

1. Se colocaron 3 ml de muestra en un tubo de ensayo.
2. Se agregaron 5,7 ml de metanol al 100%, y se mezcló en vórtex por 30 segundos.
3. Se ajustó el valor de pH en un rango de 6,5 – 7,5 utilizando NaOH 1 M.

#### **2.1.4.3 Inmunoensayo**

1. Se agregaron 200 µl del conjugado en cada pocillo de dilución (borde verde) a utilizar.
2. Se agregaron 100 µl de las soluciones patrones y 100 µl de cada muestra en los pocillos, que contenían el conjugado.
3. Utilizando una pipeta multicanal de 8 vías, se mezclaron los pocillos pipeteando y liberando la mezcla de cada uno, 3 veces.
4. Se transfirieron 100 µl de cada pocillo de dilución a su respectivo pocillo recubierto con anticuerpo.
5. Se incubó la gradilla 10 min. a temperatura ambiente.
6. Se volcó el contenido de todos los pocillos en un contenedor para residuos.
7. Se realizó el lavado de los pocillos llenándolos con agua destilada y volcando su contenido en el contenedor para residuos. Este procedimiento se repitió 5 veces.
8. Finalizado el quinto lavado, se golpeó suavemente la gradilla sobre papel absorbente a fin de eliminar la mayor cantidad de agua posible.
9. Se agregaron 100 µl de muestra a cada pocillo, y se incubó la gradilla por 5 min. a temperatura ambiente.
10. Se agregaron 100 µl de la solución stop a cada pocillo y se mezcló la gradilla deslizándola suavemente en forma de cruz sobre la mesada.
11. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector ELISA.

Para calcular las concentraciones de OTA de cada muestra se utilizó la hoja de cálculo Romer® Log/Logit entregada por el proveedor, y se utilizó el factor de corrección correspondiente a cada muestra (0,58 para vino blanco y 3 para pimienta). El rango de cuantificación del kit es entre 2 y 40 ppb para vino blanco y para pimienta.

### **2.1.5 Análisis de ocratoxina A en salames**

Se evaluó la incidencia natural de OTA en los 13 salames de Colonia Caroya y en los 5 salames comprados, los cuales fueron conservados a -20° C en el Laboratorio de Micología de Alimentos de la UNQ. Para este ensayo se utilizó el kit comercial Ridascreen OTA 30/15.

La muestra se obtuvo cortando 5 rodajas de salame (sin tripa), las cuales fueron procesadas utilizando un homogeneizador. Se decidió trabajar con la parte interna del producto, es decir sin la tripa, debido a que es la parte comestible del mismo. Cuando se logró una pasta homogénea, se tomó una porción de la misma de 1 g y se la colocó en un tubo Falcon de 15 ml. Luego, se realizó el procedimiento de extracción de las muestras descrito en el inciso 2.1.2.1 y posteriormente se cuantificó la OTA mediante el inmunoensayo descrito en el inciso 2.1.2.2.

## **2.2 Cuantificación del porcentaje de *A. ochraceus* sobre el total de hongos filamentosos de los salames**

Se realizó el recuento total de hongos filamentosos superficiales de los salames caroyenses y los salames comerciales en DG18, y además se identificaron a nivel de especie los aislamientos pertenecientes al género *Aspergillus*, siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo I.

### **2.2.1 Conservación de los aislamientos**

Cada una de las cepas aisladas de *Aspergillus ochraceus* fueron conservadas en agar agua al 0,2%, como fue descrito en el Capítulo I, inciso 2.1.2.3.

## **3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **3.1 Análisis de ocratoxina A en salames y materias primas**

La Tabla 42 muestra la concentración de OTA encontrada en las materias primas y el producto terminado, así como también el porcentaje de *A. ochraceus* en DG18 determinado sobre el total de hongos filamentosos superficiales de cada salame.

En primer lugar es necesario observar, que en todos los salames caroyenses analizados no se encontraron niveles de OTA cuantificables por la técnica utilizada (< 1500 ppt), así como tampoco se encontraron en las carnes vacunas, carnes de cerdo y grasas de cerdo analizadas. En el caso particular

de la grasa, se logró confirmar los valores del kit comercial Ridascreen OTA 30/15 sobre esta matriz mediante la cuantificación de la micotoxina por HPLC-FLD, dando valores por debajo del límite de detección de la técnica (< 1000 ppt).

**Tabla 42:** Concentración de OTA (ppt o ppb) en la materias primas utilizadas para la elaboración de salames caroyenses y en el producto final. Iguales colores marcan aquellas materias primas adquiridas del mismo proveedor. Porcentaje de *A. ochraceus* sobre el recuento total (DG18).

Muestra	Ocratoxina en:						% <i>A. ochraceus</i>
	Salame (ppt)	Carne Vacuna (ppt)	Carne Porcina (ppt)	Grasa (ppt)	Vino Blanco (ppb)	Pimienta Blanca Molida (ppb)	DG18
A1	<1500	<1500	<1500	<1500	<2,00	<2,00	< 2,50
A2	<1500	<1500	<1500	<1500	<2,00	<2,00	13,40
C1	<1500	<1500	<1500	<1500	4,77	<2,00	< 0,34
F1	<1500	<1500	nd	<1500	3,31	<2,00	nd
F2	Nd	<1500	<1500	<1500	3,35	3,12	< 0,06
I1	<1500	<1500	<1500	<1500	<2,00	<2,00	< 0,77
I2	<1500	<1500	<1500	<1500	10,08	<2,00	36,92
N1	<1500	<1500	<1500	<1500	<2,00	<2,00	42,11
N2	Nd	<1500	<1500	<1500	5,60	<2,00	0,25
P1	<1500	<1500	<1500	<1500	<2,00	3,36	< 0,37
P2	<1500	<1500	<1500	<1500	<2,00	3,63	36,84
Q1	<1500	<1500	<1500	<1500	<2,00	<2,00	33,33
O1	<1500	<1500	<1500	<1500	4,49	<2,00	< 1,11

nd: no determinado.

En los salames de diferentes marcas comerciales (Tabla 43) sí se encontraron niveles de OTA cuantificables (en 4 muestras de 5) superiores aunque cercanos al valor recomendado por la Unión Europea (UE) (1000 ppt) (Mistero de Ila Sanità, 1999).

Cabe aclarar que el límite de detección de la técnica utilizada no permite asegurar que las muestras analizadas estén por debajo del límite establecido por la UE, sin embargo hay que considerar que en nuestro país no existe aún legislación respecto a esta micotoxina en ningún producto.

Nuestros resultados concuerdan con los de otros trabajos donde la contaminación de OTA en salames estuvo dentro de los límites establecidos para estos productos por la UE (< 1000 ppt). Dall'Asta *et al.* (2010) encontraron

620 ppt de OTA en 1 salame italiano de 8 analizados. En el caso de Bertuzzi *et al.* (2013) hallaron en promedio 540 ppt de OTA en 6 salames italianos.

**Tabla 43:** Concentración de OTA en salames adquiridos en el mercado local.

Muestra	Ocratoxina (ppt)
SA1	1852
SA2	1903
SA3	1772
SA4	1673
SA5	<1500

Diversos estudios realizados en cerdos que habían sido alimentados con piensos contaminados con OTA intencionalmente, han determinado que la acumulación de OTA en el organismo de los animales sigue el siguiente orden: sangre > hígado > riñón > músculo > grasa (Lusky *et al.*, 1993; Gareis and Scheuer, 2000; Malagutti *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2006; Bertuzzi *et al.*, 2013; Perši *et al.*, 2014). Por lo cual, considerando que los ingredientes mayoritarios utilizados típicamente en la elaboración de salames son la carne (músculo) y la grasa, que son justamente aquellas partes que poseen la menor predisposición a acumular esta micotoxina, no se esperaría entonces que las mismas fueran fuente de contaminación de ocratoxina A en los salames.

Magnoli *et al.* (2005) cuantificaron los niveles de OTA de alimentos destinados a la alimentación animal, entre los que se encontraban los alimentos para cerdos, pertenecientes a establecimientos elaboradores ubicados en Córdoba, provincia a la cual pertenece Colonia Caroya. En dicho trabajo se encontró que el 15% de un total de 80 muestras de alimentos utilizado para criar cerdos contenía valores de OTA en un rango de 15 a 25 ppb. Por otro lado, Bertuzzi *et al.* (2013) criaron cerdos alimentados con piensos contaminados con OTA en un rango creciente de concentraciones, detectando que un nivel de contaminación de 50 µg de OTA por Kg de alimento, daba concentraciones de la micotoxina del orden de 1 ppb (límite establecido por la UE) en el músculo de los cerdos y en productos madurados elaborados a partir de esta carne. Por lo cual, considerando que estos piensos

estaban contaminados intencionalmente y daban concentraciones en los músculos y la grasa cerca del límite establecido para estos productos en Europa, podemos decir que los ingredientes cárnicos usados en los salames elaborados en Colonia Caroya representan un bajo riesgo de contaminación por esta micotoxina.

Otros trabajos en esta misma línea, donde se alimentaron cerdos con piensos contaminados con OTA también mostraron valores que haría suponer que en salames, la contaminación significativa y directa por acumulación de OTA en músculo y grasa es poco probable. Rossi *et al.* (2006) alimentaron cerdos con concentraciones de OTA en el alimento de 200 ppb y encontraron apenas promedios de 1,9 ppb en músculos y 1,1 ppb en tejido adiposo.

En el caso del vino, los principales responsables de la presencia de OTA son los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus carbonarius*. Estos hongos están presentes mayoritariamente en la micoflora típica de la uva durante su crecimiento y su cosecha (Battilani *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2002).

Si bien la UE ha establecido en 2005 el límite máximo de OTA permitido en vino que corresponde a 2 µg/L (2 ppb) (UE Com. Reg. 2005) en nuestro país no existen aún límites para esta micotoxina en estos productos.

Se puede observar que el 46% de los vinos muestreados que se utilizaron en la elaboración de los salames caroyenses contienen OTA en niveles que exceden el límite establecido por la Unión Europea (3,31 – 10,08 ppb). Por otro lado, el 80% de los vinos comerciales analizados (Tabla 44) también contienen niveles de OTA mayores a los establecidos por la UE (2,76 – 10,32 ppb).

**Tabla 44:** Concentración de OTA (ppb) en vinos blancos adquiridos en el mercado local.

Muestra	Ocratoxina (ppb)
V11	10,32
V12	2,76
V13	6,67
V14	<2
V15	6,18

En cuanto a los vinos utilizados en la elaboración de los salames de Colonia Caroya, es necesario remarcar que 6, de los 8 establecimientos elaboradores muestreados, reciben el vino blanco del mismo proveedor, sin embargo los valores de OTA hallados fueron muy variados (<2- 10,08 ppb) (Tabla 42). Esto puede explicarse teniendo en cuenta que los proveedores suelen contar con distintos lotes del mismo producto, lo cual indicaría que puede existir diversidad en los resultados del contenido de OTA en este caso.

Dado que la producción de OTA en matrices como los vinos se ve afectada por la región geográfica (Mateo *et al.*, 2007), comparando nuestros resultados con estudios realizados en vinos blancos de Argentina y Brasil (Rosa *et al.*, 2004) y de Chile (Vega *et al.* 2012), se puede determinar que tanto el porcentaje de muestras que superaron el límite establecido por la UE para OTA en vinos (55,6%), como así también la concentración máxima de la toxina que se encontró (10 ppb) son mayores a la bibliografía mencionada. Rosa *et al.* (2004) informó la presencia de esta micotoxina en el 13,3% de muestras analizadas de vinos blancos de origen brasileño y argentino, con una concentración promedio de 0,028 ppb. Mientras que Vega *et al.* (2012), determinó que tan solo en el 1,7% de los vinos analizados en la región central de Chile había OTA, y el valor máximo reportado fue de 0,14 ppb.

Si bien las concentraciones de OTA encontradas en los vinos caroyenses son elevadas comparadas con otros estudios y exceden en muchos casos el límite establecido por la UE, teniendo en cuenta que la cantidad de vino que se utiliza para la elaboración de los salame es muy pequeña (aproximadamente 1%, sobre el total de los ingredientes), esto no incide en la cantidad de OTA que se pueda encontrar en el producto final, como se observa en la Tabla 43. Sin embargo, deberían hacerse estudios futuros en esta línea, considerando que el vino es una de las bebidas alcohólicas con mayor consumo en nuestro país.

Respecto a los valores obtenidos para las pimientos utilizadas en la elaboración de los salames de Colonia Caroya, el 77% de las muestras se encuentran por debajo del límite de cuantificación de la técnica (< 2 ppb) (Tabla 42). Mientras que todas las muestras de diferentes marcas comerciales arrojan valores cuantificables por la técnica (Tabla 45).

**Tabla 45:** Concentración de OTA (ppb) en muestras de pimienta blanca molida, adquiridas en el mercado local.

Muestra	Ocratoxina (ppb)
PI1	27,58
PI2	4,56
PI3	4,11
PI4	6,14
PI5	4,74

Si bien en la Argentina no hay legislación que establezca los valores de OTA máximos en pimienta, se puede tomar como parámetro el límite establecido para especias, por la Unión Europea (Comission Regulation N° 105/2010) y por Brasil, que es de 30 ppb (Codex Alimentarius, 2015). En la Tabla 42 se observa que todas las pimientos caroyenses se encuentran dentro de la reglamentación y alejadas de dicho límite. En cuanto a las pimientos compradas (Tabla 45), se observan valores superiores a los obtenidos de las muestras provenientes de la colonia, pero todas por debajo del límite permitido en la Unión Europea.

Según lo informado por Ozbey and Kabak (2012), al analizar 23 muestras de pimienta negra en polvo adquirida en Turquía, solo 4 de ellas estaban contaminadas con OTA, y el promedio de micotoxina obtenido fue de 1,82 ppb.

Jalili *et al.* (2010) han analizado muestras de pimienta blanca en Malasia (local e importada de Australia y Singapur) y han encontrado que el 21% de 60 muestras totales presentó OTA en un rango desde 0,18 hasta 3,4 ppb. Sin embargo, Waśkiewicz *et al.* (2013) han encontrado OTA en un 86% de muestras analizadas de pimienta blanca de Vietnam, obteniendo un valor promedio de OTA de 29,4 ppb.

Como se puede observar, los valores de OTA en pimienta que han sido informados son variados, y nuevamente se debe tener en cuenta que la región geográfica es un factor diferencial en cuanto a la producción de micotoxinas por los hongos.

Tal como se mencionó en el caso de los vinos, la cantidad de pimienta que se emplea en la elaboración del salame es baja, representado un 0,45%

del producto final, por lo que a pesar de que la pimienta pueda contener niveles de OTA detectables por la técnica utilizada en este trabajo, no incide de manera significativa en la cantidad de OTA encontrada en el salame.

### **3.2 Implicancia de *A. ochraceus* sobre el total de hongos filamentosos superficiales**

Todo lo expuesto anteriormente, se relaciona con la contaminación de productos de manera directa, es decir por la utilización de materias primas que contengan OTA en su elaboración, sin embargo, en el caso de los salames o de productos cárnicos curados y/o fermentados, además hay que considerar y analizar las especies fúngicas que pueden desarrollarse en su superficie, ya que la contaminación con OTA puede ser indirecta. Es decir, que ciertos microorganismos que crezcan en su superficie pueden producir la toxina. Como vimos en el Capítulo I, la única especie encontrada en la superficie de los salames caroyenses que es potencialmente toxicogénica es *Aspergillus ochraceus*. De esta manera, como se mostró en la Tabla 42, se cuantificó en los salames analizados en este capítulo el porcentaje de este hongo sobre el total de hongos filamentosos de la superficie de estos productos, encontrándose en 5 salames entre un 13- 42% de esta especie, y en los 7 salames restantes representó menos del 3% de la totalidad del emplume. No se encontró correlación entre el porcentaje de *A. ochraceus* superficial y la ocratoxina A detectada en el salame (Tabla 42).

Es importante resaltar que en el caso de aquellos salames que contienen en su micoflora superficial algún hongo potencialmente toxicogénico, habría que evaluar o determinar no solo si el hongo puede expresar su habilidad para producir esta micotoxina en ciertas condiciones y sobre esa matriz específica, sino también si la micotoxina puede difundir hacia el alimento o simplemente quedar acumulada en el micelio, que en este último caso sería menos riesgoso si pensamos que al consumir este tipo de embutidos previamente quitamos la tripa emplumada. Esto será abordado en el próximo capítulo.

---

## CAPÍTULO VI

### EVALUACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO QUE IMPLICA EL DESARROLLO DE *ASPERGILLUS OCHRACEUS* SOBRE LA SUPERFICIE DE LOS SALAMES

#### 1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este capítulo fue evaluar el riesgo toxicológico que implica el desarrollo de *A. ochraceus* sobre la superficie de los salames. Para ello, se utilizaron cepas de *A. ochraceus* aisladas de salames de Colonia Caroya, y se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la portación del gen *otanpsPN* involucrado en la biosíntesis de ocratoxina A.
- Determinar la capacidad toxicogénica para la producción ocratoxina A in vitro usando como sustrato CYA.
- Desarrollar sustratos de simulación con los componentes mayoritarios utilizados en la elaboración de salames para analizar la producción y difusión de ocratoxina A utilizando una cepa productora de la misma.

#### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

##### 2.1 Evaluación de la portación del gen *otanpsPN* involucrado en la biosíntesis de ocratoxina A en las cepas de *A. ochraceus* aisladas de salames

###### 2.1.1 Reactivación de los aislamientos y obtención de cultivos monospóricos

Se trabajó con 31 aislamientos de *Aspergillus ochraceus*, los cuales habían sido obtenidos de salames elaborados en Colonia Caroya y se encontraban guardados en el cepario del Laboratorio de Micología de Alimentos de la UNQ. Además se trabajó con 2 cepas de *A. ochraceus* (CECT 2092 y CECT 2093) obtenidas de la Colección de Cultivos Españoles (CECT),

las cuales habían sido informadas por Luque *et al.* (2013) como productoras de ocratoxina A. También se incluyó un control negativo en este ensayo, utilizando una cepa de *P. nalgiovense*, especie no productora de ocratoxina A (Pitt and Hocking, 2009).

Para 20/31 aislamientos de *A. ochraceus* y la cepa control de *P. nalgiovense* utilizados en este ensayo, se trabajó con el ADN ya extraído en el Capítulo I (inciso 2.1.2.4.3) y conservado a -20°C. Los 11 aislamientos restantes de *A. ochraceus* se reactivaron desde los crioviales del cepario en MEA durante 7 días a 25°C para luego realizar el cultivo monospórico utilizando la metodología descrita en el Capítulo I inciso 2.1.2.4.1.

### **2.1.2 Extracción de ADN**

El ADN de las 11 cepas de *A. ochraceus* y de las dos cepas controles (CECT 2092 y CECT 2093) utilizadas en este ensayo, fue extraído de los aislamientos monospóricos siguiendo la metodología que utiliza Cetil-trimetilbromuro de amonio (CTAB) descrito por Stenglein and Balatti (2006), como se explicó anteriormente (Capítulo I inciso 2.1.2.4.3).

### **2.1.3 Integridad del ADN extraído**

Para confirmar la correcta extracción del ADN de los hongos, se disolvieron 0,8 g de agarosa, 7 µl de bromuro de etidio en 110 ml de buffer TAE 1X, y se colocó en los soportes con el peine adecuado. Una vez solidificado, se llevó el gel con cuidado a la cuba, la cual contenía el solvente de corrida (TAE 1X) y se sacó el peine.

Sobre un parafilm se colocaron 12 µl del loading buffer por cada muestra a analizar. Luego, se tomaron 3 µl de cada muestra y se mezclaron cuidadosamente con el colorante y se sembraron los 15 µl en las diferentes calles del gel. Se puso en funcionamiento la cuba electroforética a 80 volts. Una vez terminada la corrida (30-40 min.) se visualizó bajo luz UV.

### 2.1.4 Cuantificación del ADN extraído

Los ADN obtenidos fueron cuantificados utilizando el equipo de absorbancia molecular Nanodrop ND 1000 (Wilmington, Delaware USA). Para realizar el análisis se colocó 1 µl de cada muestra en el equipo y se cuantificó los ng/µl de ADN que posee la muestra. Entre una muestra y la siguiente, para limpiar, se colocó 1 µl de agua destilada estéril y se extrajo con un papel absorbente. Además de la cuantificación de las muestras, se consideraron la relación entre los valores de absorbancia a 260/280 y 260/230 para evaluar la pureza del ADN obtenido. Se utilizó como blanco buffer TE 1X.

### 2.1.5 Amplificación de un fragmento del gen *otanpsPN*

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un Mastercycler gradient (Eppendorf) en primera instancia utilizando los pares de cebadores F10T y R10T recientemente propuestos por Luque *et al.* (2013), y en segunda instancia utilizando los pares de cebadores *otanps\_for* y *otanps\_rev* descritos por Bogs *et al.* (2006), para la identificación de hongos productores de ocratoxina A (Tabla 47). Los mismos, según estos autores, generan una única banda de 459 pb.

**Tabla 47:** Secuencias de primers utilizados en este estudio para la identificación de *A. ochraceus* productores de OTA.

Primer	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Número de acceso GenBank	Producto de PCR esperado (bp)
F10T*	GCCCAACGACAACCGCT	4748	459
R10T*	GCCATCTCCAAACTCAAGCGTG	5207	459
<i>otanps_for</i> **	AGTCTTCGCTGGGTGCTTCC	AY534879	750
<i>otanps_rev</i> **	CAGCACTTTTCCCTCCATCTATCC	AY534879	750

\*Secuencia publicada por Luque *et al.* (2013)

\*\* Secuencia publicada por Bogs *et al.* (2006)

Cada reacción de PCR fue llevada a cabo en 25 µl de mezcla conteniendo: 2 µl de ADN genómico (aproximadamente entre 40 y 60 ng), 2,5 µl de buffer de reacción 10X, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, 1 µl de dNTPs (10mM), 1 µl

del forward y 1 µl reverse primers (10 µM cada uno), 0,25 µl Taq DNA polimerasa 50 U (Invitrogen) y 16,25 µl de agua destilada estéril. Las amplificaciones fueron llevadas a cabo usando el siguiente protocolo para el caso de los cebadores F10T y R10T: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min; 33 ciclos de 95°C por 30 s, 57°C por 40 s, 72°C por 45 s; y una extensión final a 72°C por 1 min. Y para el caso de los cebadores ontanps se siguió el siguiente protocolo: un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min; 33 ciclos de 95°C por 30 s, 60°C por 40 s, 72°C por 60 s; y una extensión final a 72°C por 2 min.

### **2.1.6 Integridad y pureza de los productos de PCR**

Se preparó el gel como se explica en el inciso 2.1.2.4.8 del Capítulo I. Luego, se colocó en un parafilm 12 µl de loading buffer por cada muestra y se mezcló con 3 µl de cada muestra. Se sembró cada calle con las diferentes muestras y una de ellas con un marcador de pesos moleculares conocidos (Ladder 50pb precisión, PB-L Productos Biológicos). Se puso en funcionamiento la cuba electroforética a 80 volts durante aproximadamente 40 min. Una vez terminada la corrida se visualizó bajo luz UV.

### **2.1.7 Secuenciación de los productos de PCR**

La secuenciación del ADN, 5´- 3´ y 3´- 5´ se llevó a cabo por Macrogen Inc. (República de Corea). Se enviaron a secuenciar el 50% de los productos de PCR obtenidos.

La identificación de las secuencias se obtuvo realizando una comparación con las secuencias de la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) 'network server' utilizando el algoritmo BLASTX (Altschul *et al.* 1990). El alineamiento de las secuencias y su comparación se realizó con CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994).

## **2.2 Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas de *A. ochraceus* en CYA**

### **2.2.1 Reactivación de aislamientos conservados**

Se reactivación todas las cepas de *A. ochraceus* aisladas previamente de los salames caroyenses, como se describió en el inciso 2.1.1.

### **2.2.2 Evaluación de la capacidad de producción de OTA in vitro en CYA**

Se prepararon suspensiones de esporos de cada aislamiento fúngico, raspando parte del micelio desarrollado en MEA con un ansa ojal, y dispersándolo en 10 ml de agua destilada estéril que contenía tween 80. Se mezcló cada suspensión enérgicamente utilizando vórtex, para lograr una correcta homogenización de la dispersión.

Mediante cámara de Neubauer se realizó el recuento de esporas. El mismo fue corregido diluyendo con agua estéril o agregando mas porciones del micelio, hasta obtener un recuento en el orden de  $10^6$  esporas/ml. Posteriormente, se tomó una alícuota de 0,5 ml y se sembró la misma en una placa de CYA, dispersando el inóculo con una espátula de Drigalsky. Este procedimiento se realizó por cuadruplicado. Las placas sembradas se incubaron a 25° C durante 15 días.

Una vez transcurrido el período de incubación, se realizó la extracción de la toxina mediante el procedimiento reportado por Núñez *et al.* (2007) según se describe a continuación. Se trasvasó a una bolsa de stomacher estéril el medio de cultivo con el micelio (de las 4 placas) adicionándole 200 ml de cloroformo. Posteriormente se homogenizó durante 2 min. en stomacher. La mezcla obtenida se filtró con kitasato, a través de un colchón de sulfato de sodio anhidro (de 1 cm de espesor aproximadamente) colocado sobre un papel de filtro Whatman N° 1. El filtrado se recogió en una ampolla de decantación, se separó la fase clorofórmica inferior secándola en rotavapor (Heildolph) a 60°C y 90 rpm hasta reducir su volumen a aproximadamente 5 ml. El extracto fue trasvasado a un vaso de precipitado y filtrado utilizando un filtro de nylon de 0,2  $\mu$ m de poro. Dicho filtrado fue colocado en un tubo Falcon de 15 ml, y bajo

corriente de aire se continuó evaporando hasta sequedad. Una vez obtenido el extracto seco, se resuspendió el mismo en 1 ml de cloroformo.

La detección de la toxina se realizó por cromatografía en capa delgada (TLC) según el método descrito por Samson (2000). En placas de silica-gel Merck G-60 de 0,25 mm de espesor, se sembraron 15  $\mu$ l de cada extracto y 5  $\mu$ l de una solución patrón de OTA de  $10^5$  ppb. El solvente de corrida que se utilizó fue una mezcla de tolueno – etil acetato – ácido fórmico 90%, en una relación 5:4:1 (v/v/v).

Una vez finalizada la corrida, las placas se expusieron a vapores de amoníaco por 13 min., y luego se determinó la presencia/ausencia de OTA bajo luz UV, tomando como positivo la aparición de manchas azules a igual R<sub>f</sub> (relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el solvente desde el inicio de la placa) que la mancha de la sustancia patrón. El límite de detección de la técnica se encuentra en el orden de  $10^{-7}$  g.

### **2.2.3 Confirmación de la identidad de OTA en los extractos fúngicos**

La confirmación de OTA de aquellos extractos que dieron positivo según la técnica de TLC se confirmaron utilizando espectrometría de masa. Para ello se utilizó un equipo ESI- MS (Electrospray Ionization Mass Spectrometer) Thermo Finnigan LCQ Ion Max (Thermo Finnigan MAT, San Jose, CA, USA) equipado con una fuente de ionización por electrospray. La velocidad de inyección fue de 5  $\mu$ l/min. Para la espectrometría de masa se fijaron los siguientes parámetros: para la ionización electrospray neumáticamente asistida, la tensión del capilar fue de 3,5 kV y la temperatura de la entrada del capilar fue de 250°C. El nitrógeno o sirvió tanto como vaina (25 psi) y gas auxiliar (10 unidades). La exploración de los espectros fue en el rango de m/z 200 a 450 (duración: 1,0 s). Los espectros de iones producidos fueron hechos utilizando helio como gas de colisión en el modo positivo. La selección de los experimentos de control de reacción se realizaron con la molécula protonada  $[M + H]^+ m / z 404$ .

## 2.3 Determinación de la capacidad toxicogénica para la producción de OTA de una cepa de *A. ochraceus* en medios de simulación

### 2.3.1 Desarrollo de medios de simulación similares al salame

Se desarrollaron 4 medios de cultivo (A, B, C y D) que contenían en proporciones similares los componentes principales presentes en la matriz del salame (carne, grasa y sal). Para ello se tuvo en cuenta la composición promedio de los salames elaborados en Colonia Caroya, tal como se mostró en la Introducción (Tabla 2).

#### Medio A:

Se utilizó pasta de chorizo fresco a partir del producto obtenido de un supermercado, a la cual se le adicionó agua (en igual proporción que la pasta) y se procesó con un homogeneizador minipimer a modo de obtenerse una mezcla más uniforme y de consistencia suave y elástica. Luego, se colocó una porción de esta pasta en la base de una placa de Petri de vidrio, mientras que la tapa de la misma se colocó invertida, sobre la pasta, de manera de moldearla, y obtener plana y lisa la superficie de la preparación (Figura 59). Las placas fueron envueltas en papel de aluminio y autoclavadas a 121°C durante 15 min. Una vez retiradas del autoclave, se sacaron en esterilidad las tapas invertidas y se colocaron como tapa de cada placa de Petri.



**Figura 59:** Procesado de la pasta del medio A, colocación en placa y compactado de la misma mediante la inversión de la tapa de la placa sobre la pasta (de igual manera se procedió con la pasta del medio B).

### Medio B:

Para preparar 100 gramos de mezcla se colocaron 75 g de carne picada magra, 22 g de grasa de cerdo y 3 g de NaCl, lo que corresponde a la proporción presente en el salame. Se agregaron 100 ml de agua a la pasta y se procesó con un homogeneizador minipimer, para lograr una preparación homogénea y elástica. Se dispuso la mezcla en las placas de Petri de vidrio, de igual manera que el prototipo A y también fueron autoclavadas.

En los medios A y B, el agregado de agua, además de darle plasticidad a las pastas, permitía lograr una elevada hidratación teniendo en cuenta que las matrices debían ser adecuadas para el correcto crecimiento del hongo y que durante el autoclavado y la incubación se produciría una marcada deshidratación del sustrato.

### Medio C:

Se colocaron rodajas de salame, a tiempo inicial (frescos) (Medio C) y a tiempo final de maduración (sin tripa) (Medio C'), en placas de Petri de vidrio. Las placas con las rodajas fueron envueltas en papel de aluminio y esterilizadas en autoclave (Figura 60).

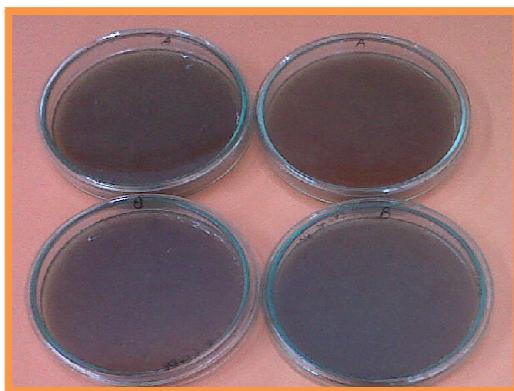


**Figura 60:** Rodajas de salame a tiempo final de maduración, antes y después del autoclavado (Medio C).

### Medio D:

Se formuló un medio sintético según lo indicado por Núñez *et al.* (2007) con algunas modificaciones, el cual simulaba una matriz del tipo cárnica. La diferencia fundamental con lo reportado por Núñez *et al.* (2007) fue la utilización de aceite de oliva en lugar de trioleína, teniendo en cuenta que dicho aceite tiene aproximadamente un 80 % de trioleína en su composición.

Se obtuvieron aproximadamente 125 ml de medio D mezclando 25 g de extracto de carne, 25 g de aceite de oliva, 2,5 g de NaCl y 0,01 g de NaNO<sub>3</sub>, 2 g de agar y 100 ml de agua. Estos componentes lograron formar una emulsión estable mediante el uso de Ultraturrax (IKA, indicar rotor) por 2 min a potencia 14. Posteriormente, se autoclavó el medio y se dispersó en placas de Petri, como muestra la Figura 61.



**Figura 61:** Placas de medio sintético (Medio D).

### 2.3.2 Reactivación de una cepa de *A. ochraceus* productora de OTA

Se reactivó la cepa SCCen44 de *A. ochraceus* aislada previamente de un salame caroyense, la cual había sido guardada en el cepario del Laboratorio de Micología de la UNQ. Dicha cepa había sido confirmada por TLC como productora de OTA y mediante espectrometría de masa.

Para la reactivación de esta cepa, se tomó una ansada desde el criovial del cepario y se sembró en MEA. La placa fue incubada durante 7 días a 25°C.

### 2.3.3 Crecimiento de la cepa productora de OTA en los medios de simulación diseñados

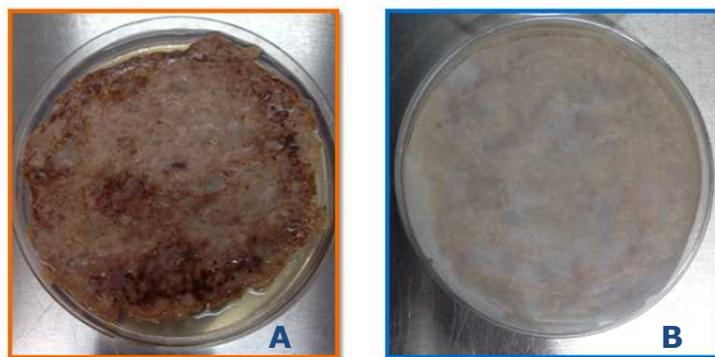
Una vez reactivada la cepa de *A. ochraceus* productora de OTA, se realizó una suspensión en agua destilada estéril del orden de 10<sup>6</sup> esporas/ml (contada mediante cámara de Neubauer) y se sembraron 0,5 ml en cada medio diseñado (A, B, C y D). El inóculo se dispersó con espátula de Drigalsky. Todas las placas se incubaron por 15 días a 25°C.

Esta etapa fue determinante para poder comprobar que *A. ochraceus* creciera correctamente sobre los medios diseñados.

#### 2.3.4 Acondicionamiento de los medios de simulación diseñados mediante la incorporación de membranas

Con el objetivo de asemejar aún más los medios desarrollados a los salames, se realizó el acondicionamiento de los mismos colocando una membrana que separara al micelio de la matriz, pero que permitiera la difusión correcta de los nutrientes requeridos por el hongo para crecer. Este procedimiento se realizó sólo con aquellos medios que habían presentado desarrollo fúngico en el punto anterior.

En el caso de los medios preparados con pasta chorizo, y mezcla de carne, grasa y sal (medios A y B respectivamente), una vez retirados del autoclave, los discos de carne perfectamente cohesionados quedaban de un tamaño menor al de la placa, debido al calentamiento sufrido, por lo cual los espacios que quedaban entre el borde de la placa y el comienzo de los discos fueron rellenados cuidadosamente con una solución de agar al 2% (previamente esterilizada), hasta igualar el nivel con la superficie de las preparaciones cárnicas (Figura 62).



**Figura 62:** Medio B luego del autoclavado (A). Medio B con membrana (B).

Una vez obtenida una superficie continua y lisa, se procedió a colocar sobre el medio una membrana. Estas membranas se obtuvieron recortando circunferencias de papel de filtro Whatman N° 1, de diámetro 9 cm (igual al de las placas), los cuales se sumergieron en agua, dentro de frascos de vidrio a

rosca, y se autoclavaron. Las membranas estériles fueron tomadas con pinzas flameadas y colocadas en esterilidad sobre las superficies de los discos de medios y adheridas a los mismos mediante la utilización de una espátula de Drigaslky estéril.

En el caso del medio sintético preparado según Núñez *et al.* (2007) (Medio D), también se colocaron membranas de papel estériles sobre la superficie del mismo, una vez que el medio fue autoclavado y plaqueado.

Finalmente, utilizando la misma mezcla de carne, grasa y sal, que se empleó para la realización del Medio B, se realizaron pequeños sobres o paquetes, de 5 cm x 5 cm de lado, utilizando tripa sintética, con dobleces en los extremos, los cuales fueron rellenos con aproximadamente 15 g de la mezcla. Los dobleces fueron reforzados con grampas de metal. Los sobres obtenidos (Medio E) se colocaron dentro de placas de Petri de vidrio para su posterior esterilización dentro del autoclave (Figura 63).



**Figura 63:** Medio E luego del autoclavado.

### **2.3.5 Crecimiento de la cepa de *A. ochraceus* productora de OTA sobre los medios/sustratos acondicionados**

Una vez acondicionados y autoclavados todos los medios, se sembraron 0,5 ml de una suspensión de esporas de *Aspergillus ochraceus* SCCen44 ( $10^6$  esporas/ ml) en la superficie de los sobres y en la superficie de los mismos. Además se incorporaron placas de CYA con membrana de papel. Se realizaron por cuadruplicado. Todas las placas fueron incubadas por 15 días a 25°C.

### 2.3.6 Análisis de la difusión de ocratoxina A en medio CYA y en medio E

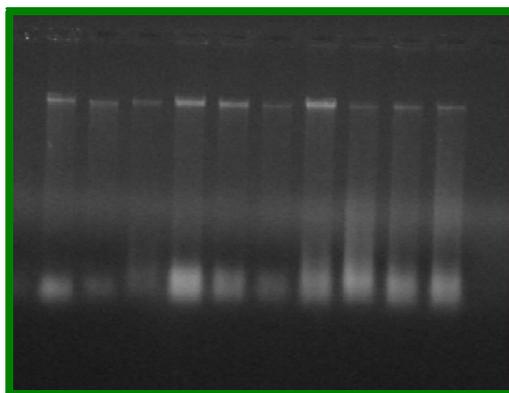
En los casos del medio E y el medio CYA inoculados e incubados del inciso anterior, se tomaron las 4 placas de cada medio (por separado), se separaron las membranas y el micelio del resto del medio, y se cuantificó la micotoxina en ambos sectores. Es decir que se determinó la cantidad de OTA retenida principalmente por el micelio y la cantidad que logró difundir al medio. Esto se realizó mediante la técnica de HPLC-FLD descrita en el inciso 2.1.3 del Capítulo V.

Además se cuantificó la OTA en las materias primas utilizadas en la elaboración del medio E, es decir en la grasa, la carne y la tripa, mediante metodología ELISA descrita en el Capítulo V.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Evaluación de la portación del gen *otanpsPN* involucrado en la biosíntesis de ocratoxina A en las cepas de *A. ochraceus* aisladas de salames

En todos los casos se obtuvo un ADN integro y puro, lo cual se evidenció en el gel de agarosa (Figura 64) y en los valores de absorbancia tanto a 260/280, como a 260/230, los cuales dieron cercanos a 1,8-2 en todos los casos.



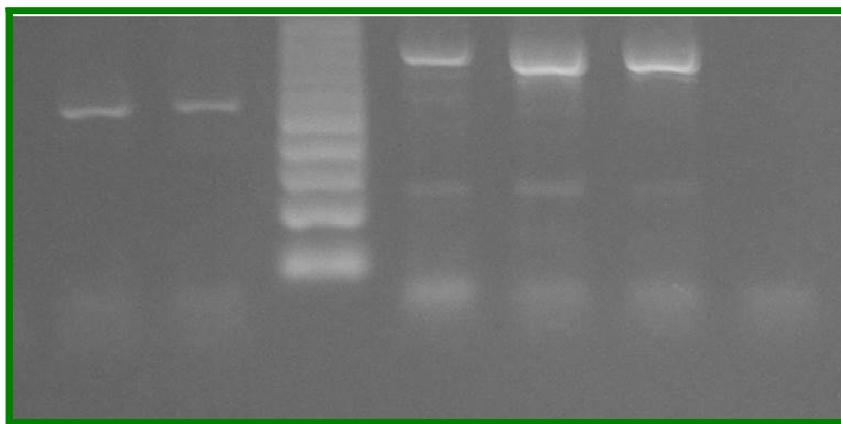
**Figura 64:** Gel de agarosa del ADN extraído de las cepas de *A. ochraceus*.

En relación al estudio de hongos productores de OTA por metodologías moleculares son pocos los grupos de investigación que trabajan en esta línea. Los trabajos más actuales pertenecen a un grupo de investigación de la Universidad de Extremadura España, entre los que se encuentra el trabajo de Luque *et al.* (2013), el cual es uno de los trabajos más recientes en esta temática. Estos autores analizaron diferentes pares de cebadores descritos en trabajos anteriores, entre los que se encontraban los cebadores AoLC35-12L/AoLC35-12R descritos por Dao *et al.* (2005) y los cebadores otanps\_for/otanps\_rev y otapks\_for/otapks\_rev descritos por Bogs *et al.* (2006), con el objetivo de desarrollar un nuevo par de cebadores que fueran capaces de descubrir la producción de OTA independientemente de la especie fúngica implicada.

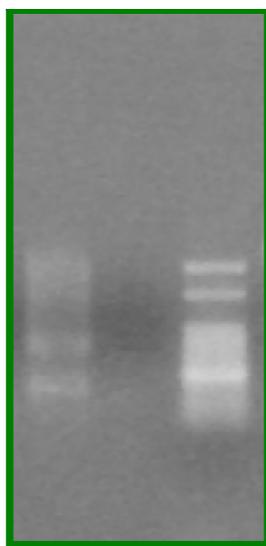
Luque *et al.* (2013), trabajaron con 11 cepas productoras de OTA, entre las que se encontraban: 6 cepas de *Aspergillus*, de las cuales 1 era *A. ochraceus* y 5 cepas de diferentes especies de *Penicillium*, utilizando los 3 pares de cebadores mencionados. Los resultados mostraron que los pares de cebadores AoLC35-12L/AoLC35-12R amplificaron un fragmento de 520 pb tal como se esperaba en sólo 4/11 cepas productoras de OTA (*P. viridicatum* CECT 2320, *P. verrucosum* FHSC-3, *A. tubingensis* CECT 20545 y *P. nordicum* CBS 101769). En cuanto a los pares de cebadores otapks\_for/otapks\_rev, 2/11 cepas (*A. tubingensis* CECT 20545 y *P. nordicum* CBS 101769) dieron el amplicón esperado a 500 pb. Cabe aclarar al respecto que la ruta de biosíntesis de OTA no ha sido completamente descubierta aún (Färber and Geisen, 2004; Dao *et al.*, 2005; Luque *et al.*, 2013).

En el caso de los pares de cebadores otanps\_for/otanps\_rev 6/11 cepas amplificaron el fragmento esperado de 750 pb, encontrándose un 99% de similitud con la secuencia del gen *otanps*PN de una cepa de *Penicillium nordicum* productora de la toxina (AY557343). A partir de esta secuencia Luque *et. al* diseñaron 3 nuevos pares de cebadores. Una vez encontrado el par de cebadores que mejor funcionaba (F10T/R10T) lo utilizaron para analizar 75 cepas de diferentes hongos, de las cuales sabían que en condiciones in vitro 27 habían logrado producir la toxina. Los resultados mostraron que 27 cepas amplificaban dicho fragmento. Entre estas cepas, 3 pertenecían a la especie *A. ochraceus* (CBS 589.68, CECT 2092 y CECT 2093).

Basados en estos resultados, nosotros en el presente trabajo utilizamos los cebadores F10T y R10T observando que en las 31 cepas de *A. ochraceus* aisladas previamente de los salames de Colonia Caroya se obtuvo una única banda cercana a los 900 pb, incluyendo la cepa SCCen44 confirmada como productora de OTA. En el caso de las 2 cepas patrones de *A. ochraceus* obtenidas de la Colección de Cultivos Españoles, dieron una única banda de amplificación cercana a los 459 pb, tal como se esperaba (Figura 65). Y por último, en el caso de la cepa de *P. nalgiovensis* incluida como control negativo, mostró varias bandas de amplificación (Figura 66).



**Figura 65:** Gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos para las 2 cepas CECT de *A. ochraceus* (calle 1 y 2) y para 3 cepas aisladas de salames (calles 4, 5 y 6). Calle 3: marcador de peso molecular y calle 7 control de solvente.



**Figura 66:** Gel de agarosa de producto de PCR obtenido de la cepa de *P. nalgiovensis* (calle 1), control de solventes (calle 2) y marcador de peso molecular (calle 3).

Dado el inesperado resultado, y a fin de verificar que no hubiera fallas en la metodología se realizó este mismo ensayo con el grupo de investigación BIOLAB de la Universidad Nacional del Centro a cargo del Dr. Stenglein Sebastián y se mandaron cepas al grupo de investigación de la Universidad de Extremadura a cargo de la Dra. María Jesús Andrade Luque *et al.* (2013), quienes fueron los creadores de los cebadores utilizados. En ambos casos obtuvieron los mismos resultados que nosotros, todas las cepas de *A. ochraceus* caroyenses amplificaban un fragmento cercano a los 900 pb.

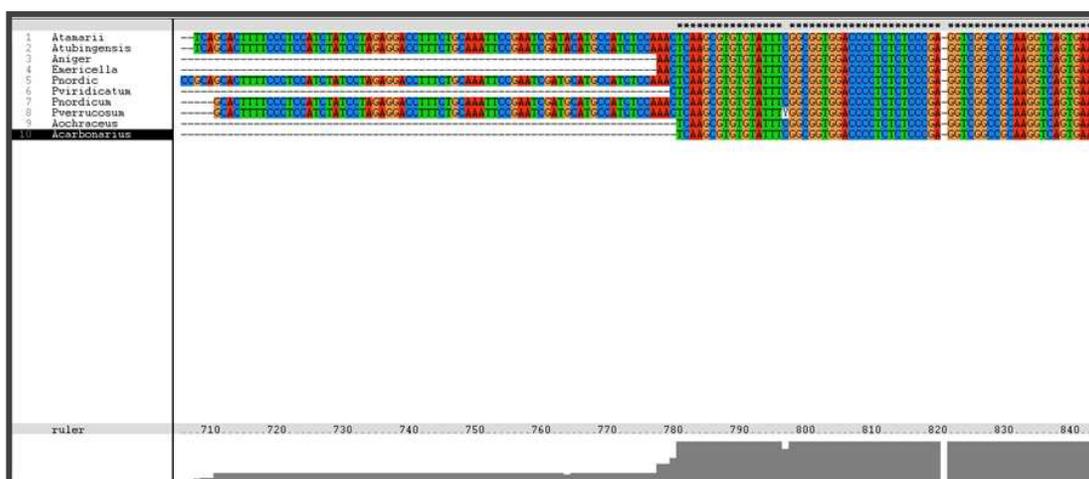
Estos resultados demuestran que los cebadores utilizados no son específicos, dando productos de PCR de distinto peso molecular al informado por Luque *et al.* (2013). Asimismo esta inespecificidad queda demostrada en el caso particular de la cepa de *P. nalgiovense* que se analiza como control negativo, ya que la misma no es productora de OTA y sin embargo muestra varias bandas de amplificación.

Sin embargo, es necesario resaltar que en las cepas de *A. ochraceus* de la CECT, a pesar de haber obtenido un amplicón del tamaño esperado, coincidente con el informado en el trabajo de Luque *et al.* (2013), al secuenciar sólo se obtuvo una coincidencia con 24 nucleótidos del gen no ribosomal peptidil sintetasa tanto de una cepa de *Aspergillus ochraceus* (JN097804) como de una cepa de un *Penicillium nordicum* (AY557343).

Al realizar un alineamiento de secuencias del gen peptidil sintetasa no ribosomal para la biosíntesis de ocratoxina A de diez cepas fúngicas diferentes obtenidas del GenBank, utilizando el software CLUSTAL X, se observó un porcentaje de alineamiento mayor al 99%, lo cual demuestra que estas secuencias son conservadas (Figura 67), y que la utilización de los cebadores descritos es apropiada. Este resultado lleva a pensar que existe la posibilidad que los hongos analizados en este trabajo poseen alguna característica diferencial respecto del resto. Entre ellas, una hipótesis podría ser que las cepas analizadas, provenientes de los salames caroyenses, poseen uno o varios intrones dentro del gen analizado (*otanpsPN*). Cuando se realizó el alineamiento de las secuencias obtenidas con la base de datos del GenBank en ningún caso se obtuvo homología con el gen buscado.

Cuando utilizamos los pares de cebadores *otanps\_for/otanps\_rev*, no logramos amplificar ninguna banda, ni siquiera el fragmento deseado de 750

pb, ni siquiera para las cepas controles de *A. ochraceus*. Estos resultados concuerdan con los encontrados por Bogs *et al.* (2006), quienes utilizando estos cebadores sólo consiguen amplificar el fragmento esperado en dos especies de *Penicillium* productoras de OTA, pero no logran amplificar el fragmento esperado cuando utilizan una cepa de *A. ochraceus* (BFE635).

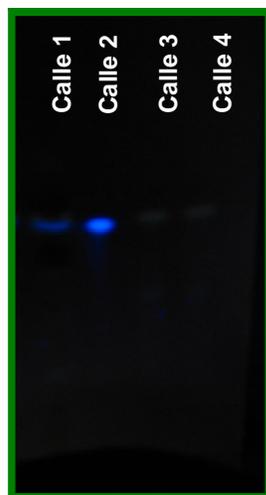


**Figura 67:** Alineamiento de secuencias de diferentes cepas fúngicas que poseen el gen peptidil sintetasa no ribosomal para la biosíntesis de ocratoxina A. 1. *A. tamaritii* (CBS 109.63), 2. *A. tubingensis* (CECT 20545), 3. *A. niger* (CECT 20157), 4. *Emericella nidulans* (CBS465.65), 5. *P. nordicum* (AY557343), 6. *P. viridicatum* (CECT 2320), 7. *P. nordicum* (CBS 110769), 8. *P. verrucosum* (CBS 323.92), 9. *A. ochraceus* (CBS 589.68), 10. *A. carbonarius* (CECT 20384)-CLUSTAL X.

Futuros trabajos en esta línea deberían enfocarse a optimizar una metodología que permita detectar el riesgo de la posible producción de OTA, independientemente del cultivo. Esto sería realmente interesante para la detección temprana del riesgo.

### 3.2 Determinación de la capacidad toxicogénica de las cepas de *A. ochraceus* en CYA

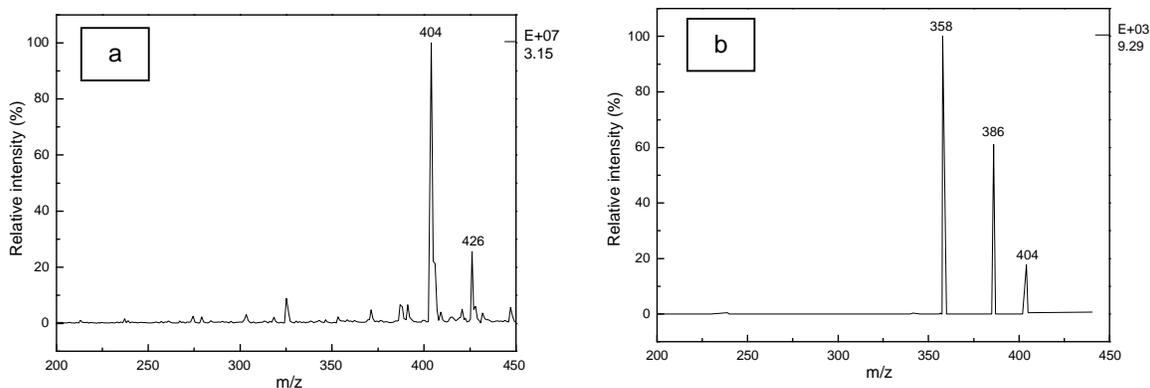
Respecto a la capacidad toxicogénica de los 31 aislamientos de *Aspergillus ochraceus* analizados, sólo un aislamiento, el SCCen44, produjo cantidad de OTA detectable por la técnica utilizada (Figura 68).



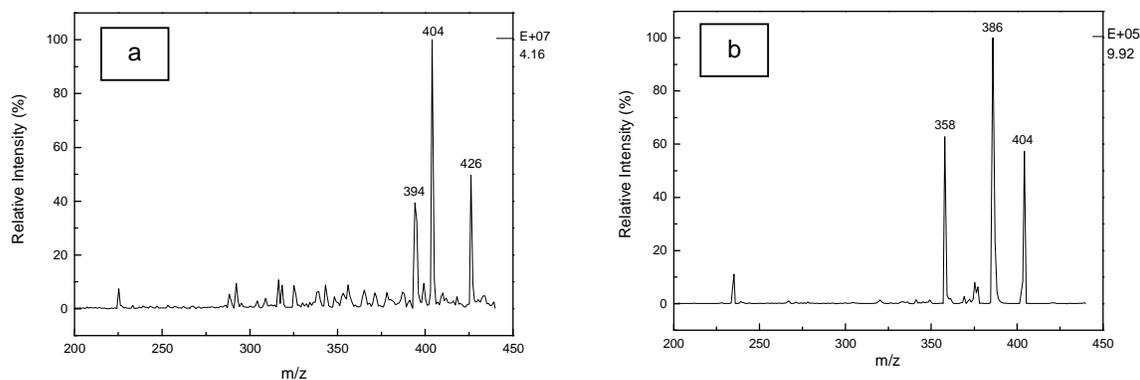
**Figura 68:** Placa de TLC luego de la corrida. Calle 1: extracto de una cepa de *A. ochraceus* productora de OTA, calle 2: patrón de OTA, calle 3 y 4: extractos de cepas de *A. ochraceus* no productoras de OTA.

El extracto obtenido fue confirmado por espectrometría de masa. En la Figura 69, se observa el cromatograma del patrón de OTA, con los picos característicos a  $m/z$  de 404 perteneciente a la molécula  $[\text{OTA}+\text{H}]^+$ , acompañado por  $[\text{OTA}+\text{Na}]^+$  a  $m/z$  de 426, lo cual concuerda con el trabajo Becker *et al.* (1998). Al romper la molécula de  $m/z$  404 mediante electrospray, se obtuvieron los iones a  $m/z$  de 358 perteneciente a la molécula  $[\text{OTA}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}]^+$ , a  $m/z$  de 386 perteneciente a la molécula  $[\text{OTA}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  y a  $m/z$  de 404 la molécula original.

La Figura 70 muestra el espectro del extracto positivo, el cual pertenece a la cepa de *A. ochraceus* SCCen44, donde la molécula  $[\text{OTA}+\text{H}]^+$  fue observada a  $m/z$  404 acompañada por  $[\text{OTA}+\text{Na}]^+$  a  $m/z$  de 426. Al romper la molécula de  $m/z$  404 mediante electrospray, se obtuvieron los mismos iones que con la muestra patrón de ocratoxina.



**Figura 69:** a) Espectro de masa electrospray positivo de OTA A. b) Espectro del ión producto de OTA A obtenido luego CID del precursor ion m/z 404 [M+H]<sup>+</sup>.



**Figura 70:** a) Espectro de masa electrospray positivo del extracto de la cepa de *A. ochraceus* SCCen44. b) Espectro del ión producto del extracto de la cepa de *A. ochraceus* SCCen44 obtenido luego CID del precursor ion m/z 404 [M+H]<sup>+</sup>.

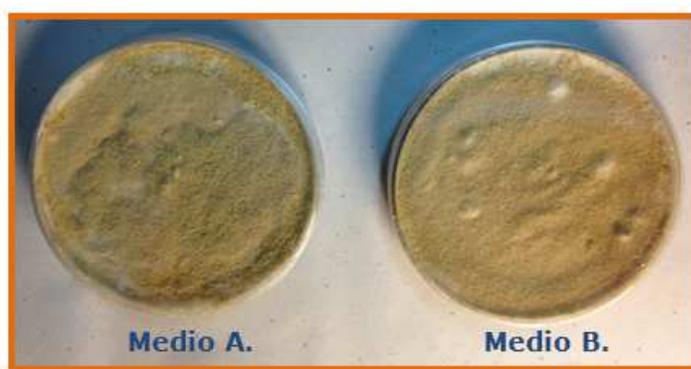
### 3.3 Determinación de la capacidad toxicogénica para la producción de OTA de una cepa de *A. ochraceus* en medios de simulación

#### 3.3.1 Crecimiento de la cepa productora de OTA en los medios de simulación diseñados con y sin acondicionamiento

El diseño de los medios se hizo con el objetivo de obtener un sustrato similar al salame para determinar si un hongo productor de OTA puede expresar su toxicogenicidad sobre esa matriz. En el caso de los medios acondicionados, la implementación de una barrera física entre el micelio y el

medio se diseñó con el fin de imitar las características de los salames y poder evaluar la difusión de la toxina desde el micelio al seno del medio.

En el caso de los medios A y B; en un primer momento se realizaron sin el agregado de agua, lo que ocasionó la obtención de masas rígidas y poco cohesionadas. Es por esto que finalmente se decidió agregar agua (en igual cantidad que el total de los ingredientes sólidos) y homogeneizar todos los ingredientes de manera mecánica. Tanto en los medios A y B sin membranas como en aquellos acondicionados, se observó un desarrollo satisfactorio del hongo (Figura 71).



**Figura 71:** Medios A y B acondicionados, con crecimiento de *A. ochraceus* en la superficie de las membranas, luego de 15 días de incubación a 25°C.

En lo que respecta a las rodajas de salame (Medio C), el hongo logró desarrollarse de manera correcta en las rodajas provenientes de productos a tiempo inicial (Figura 72), es decir en productos con elevada humedad y por ende con elevada actividad de agua; mientras que en las rodajas evaluadas de salames ya secos y madurados el hongo no logró crecer. Es necesario tener en cuenta que en un salame a tiempo final, la actividad de agua ha sufrido una disminución importante en la etapa de la maduración y secado. La actividad acuosa de un salame de Colonia Caroya a tiempo final, tal como se mostró en el Capítulo I, es de aproximadamente 0,92 en salames elaborados en invierno y 0,86 en salames elaborados en verano, es decir que es en promedio aproximadamente 0,89. Al medir la  $a_w$  de una rodaja de salame luego del proceso de autoclavado se observó que la misma se mantiene constante. Es por esto que se puede inferir que la  $a_w$  de las rodajas de salames es lo suficientemente baja (aproximadamente 0,89) como para impedir la

germinación y el desarrollo del hongo. Sin embargo, hay que destacar que la presencia de *A. ochraceus* en los salames de verano, los cuales tenían a tiempo final de maduración aproximadamente 0,86 de  $a_w$ , se debe a que durante los primeros 5 días de maduración, que es cuando el hongo comienza a germinar y crecer en el producto, la  $a_w$  del salame es muy superior a este valor.



**Figura 72:** Rodajas de salame a tiempo inicial y final de maduración, inoculadas con *A. ochraceus* e incubadas 15 días a 25°C.

Según lo informado por Ramos *et al.* (1998), al inocular *A. ochraceus* en granos de cebada, el rango de  $a_w$  en que el hongo logró desarrollarse fue desde 0,81 a 0,96; y Pardo *et al.* (2004) informaron que los valores mínimos de  $a_w$  para que crezca el hongo se encuentran entre 0,85 - 0,90 sobre el mismo cereal. Sin embargo, Torres *et al.* (2003) han observado que *A. ochraceus* no es capaz de germinar en granos de maíz a  $a_w$  menores a 0,92.

El medio D acondicionado y el medio E (Figura 73) presentaron un correcto desarrollo del hongo sobre sus respectivas membranas. En el caso del medio E, la utilización de tripa sintética como membrana logró una aproximación más real del sistema al producto de interés.



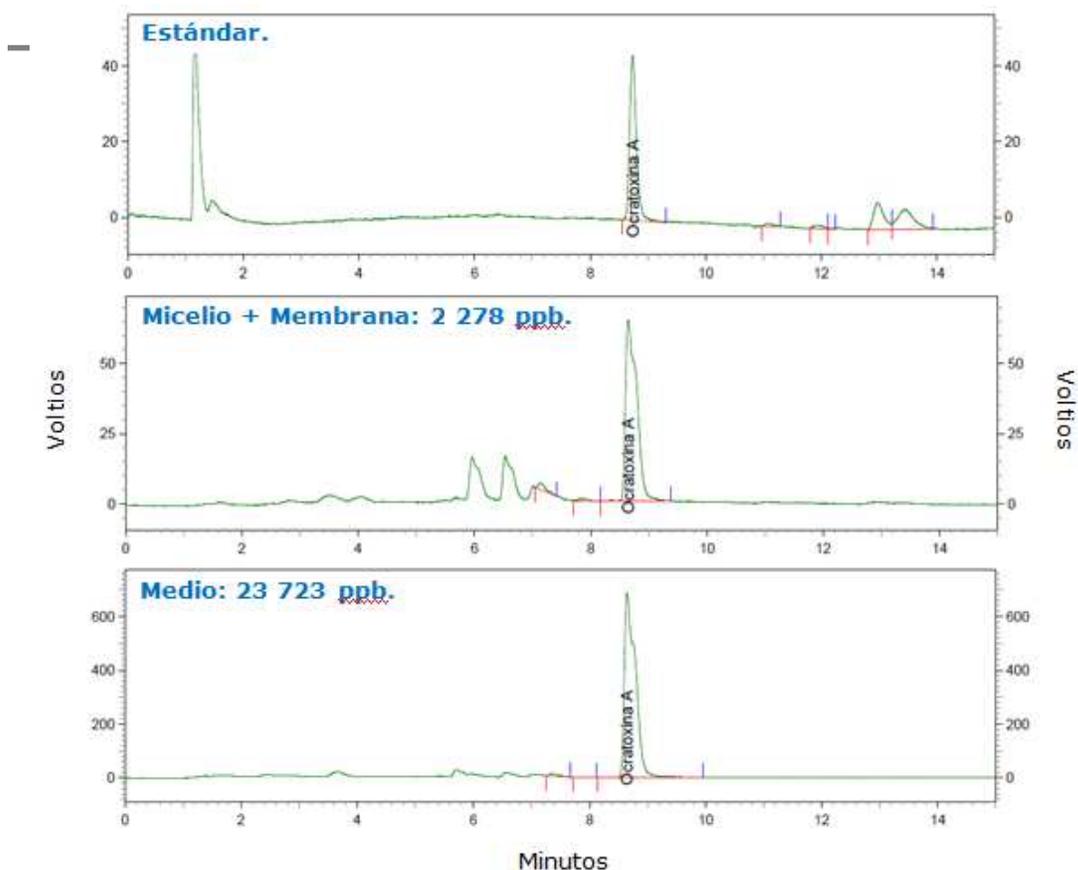
**Figura 73:** Medio E recubierto por el micelio de *A. ochraceus*, luego de la incubación por 15 días a 25°C.

### 3.3.2 Análisis de la difusión de ocratoxina A en medio CYA y en medio E

Para determinar la difusión de ocratoxina A en medio CYA con membrana de papel, luego del crecimiento del hongo, se cuantificó la misma por HPLC-FLD, evaluando por un lado la cantidad de toxina que quedó retenida en el micelio, es decir sobre la membrana, y por otro lado la cantidad de toxina que difundió al medio de cultivo.

Los resultados mostraron que en el micelio había 2278 ppb de OTA y en el medio de cultivo (CYA que se encontraba debajo de la membrana), 23723 ppb de OTA (Figura 74).

Estos resultados muestran una gran difusión de la toxina, migrando desde el micelio hasta el sustrato. Esto demuestra que el 90% de la toxina logró difundir al medio de cultivo, mientras que el restante 10% quedó retenido por el micelio del hongo. Además, no se observó desarrollo del hongo por debajo de la membrana, lo que demuestra que se trata únicamente de difusión de la toxina.



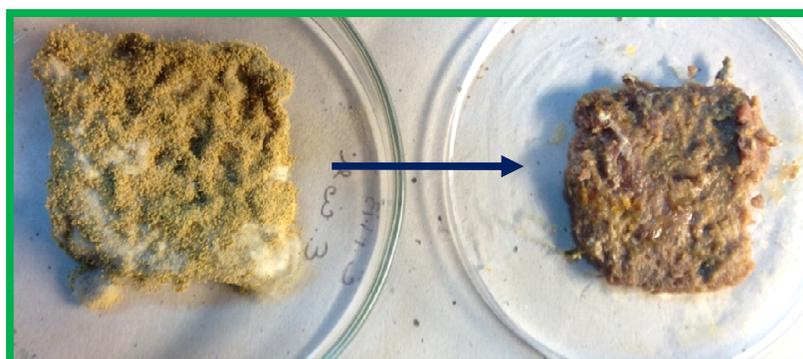
**Figura 74:** Cromatogramas del estándar de OTA, el micelio+membrana y del medio de cultivo.

En cuanto a la cuantificación de OTA en los medios símil salame diseñados (Figura 75), se decidió utilizar en este ensayo el medio E, por ser el más representativo del producto en motivo de estudio.

Al cuantificar la OTA que se encontraba en las materias primas utilizadas en la elaboración del medio E, es decir grasa, carne y tripa, las mismas dieron por debajo del límite de detección de la técnica utilizada (<1500ppt). Esto fue analizado para asegurarnos que la OTA que finalmente se encuentre en el medio E es producto del hongo inoculado intencionalmente y no proveniente de las materias primas utilizadas.

Se determinó que en el relleno del paquete había 324,29 ppb de OTA, mientras que en el micelio junto con la tripa había 320,83 ppb. En este ensayo la difusión de la toxina fue notoriamente menor que en el caso del medio CYA, ya que 50% quedó retenida en el micelio y el restante 50% logró llegar hasta la matriz cárnica. Esto podría explicarse considerando que los dos sistemas analizados contenían diferente tipo de membranas (papel y tripa sintética), las cuales seguramente permiten una difusión diferente de la toxina. También hay que destacar la diferencia cuantitativa entre los valores totales de OTA hallados

en el medio de cultivo y en la matriz cárnica, siendo esta última mucho menor, lo que evidencia la influencia del medio en la expresión de la toxina.



**Figura 75:** Medio E antes y después de quitada la tripa del medio.

En primer lugar resulta importante destacar la difusividad de esta toxina. Este resultado no concuerda con lo informado por Iacumin *et al.* (2009), quienes encontraron OTA en la tripa de embutidos secos en un rango entre 3 y 18 ppb (de un total de 160 muestras) y no detectaron valores de la toxina por encima de 0,1 ppb en el interior de los productos. En cambio, en el trabajo de El-Shayeb *et al.* (1992) se informó que al inocular cepas de *A. ochraceus* productoras de OTA en un medio líquido (YES) en condiciones de incubación similares a las utilizadas en nuestro trabajo (30 °C durante 15 días), la mayor parte de la toxina producida se encontraba en el medio de cultivo.

Los resultados anteriores, contrastan con lo informado por Mabrouk and El-Shayeb (1981) para otra micotoxina, la aflatoxina. En todas las pruebas realizadas utilizando dos medios líquidos, se cuantificaron mayores niveles de micotoxina en el micelio que en el medio filtrado. Los medios utilizados fueron YES y un medio rico en componentes solubles propios del arroz y del maíz.

En el trabajo de Pose *et al.* (2007) se analizó la difusión de la toxina roquefortina C desde el micelio del hongo hacia dos medios líquidos, el medio YES y un medio diseñado a partir de leche. Los resultados mostraron que las 16 cepas de *P. roqueforti* analizadas tenían una alta retención de la toxina en el micelio, mientras que la toxina liberada al medio líquido era aproximadamente un 60% menor a esta.

Sin embargo, para poder realizar una discusión sobre los resultados obtenidos, es necesario tener en cuenta que en este trabajo la difusión de la

toxina se analiza sobre un medio sólido, donde la migración de una molécula es ciertamente diferente que en el caso de un medio líquido.

Escher *et al.* (1973) han inoculado la superficie de jamones curados con una cepa de *A. ochraceus* productora de OTA, y han determinado luego de 21 días de incubación a 25°C, que el 66,7% de la toxina producida había penetrado hasta 1 cm desde la superficie, mientras que el 33,3% restante había quedado retenido en el micelio superficial. Sin embargo en este caso, el micelio también había penetrado en la carne hasta la misma distancia en donde se logró cuantificar la toxina, lo que demostró que su difusión estaba directamente relacionada con la penetración del micelio. Pero es importante tener en cuenta que en este caso no se utilizó ningún tipo de separación (membrana) entre el hongo y la matriz cárnica.

En nuestro estudio, lo que se pudo establecer es que la cepa utilizada no sólo logra producir OTA sobre una matriz similar al salame en las condiciones ensayadas, sino que además, al crecer sobre una tripa sintética (utilizada para la elaboración de salames), esta no impide la difusión de la toxina. Es por esto que aunque el alimento se encuentre físicamente separado del micelio del hongo, puede ciertamente contener la toxina. Aunque ni la membrana, ni el mismo micelio sean ingeridos, el interior del producto sí es consumido, y esto constituiría un riesgo para la salud. Sin embargo, como se vió en el Capítulo V, en ninguno de los salames de Colonia Caroya analizados se encontró OTA en cantidades detectables por la técnica utilizada, aún en aquel donde fue aislada la cepa control productora. La no detección de la toxina en el producto podría deberse a múltiples factores. Entre ellos, que las condiciones de humedad relativa y temperatura durante la etapa de goteo y maduración del salame (distintas a las ensayadas en este trabajo de investigación), como así también la competencia de esta especie en una microbiota superficial conformada predominantemente por otras especies fúngicas, no favorecen la expresión de OTA.

Esto conduce a futuros estudios que contemplen evaluar el impacto de diferentes factores ambientales similares a los que se somete un salame durante su elaboración y la posible difusión de la toxina en estas condiciones.

Por todo esto, es sumamente importante conocer la micobiota superficial de los salames y poder establecer las especies fúngicas que se encuentran presentes en cada caso.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo sobre el estudio de la microbiota superficial de los salames elaborados en Colonia Caroya (Córdoba) muestran que la temperatura de la sala de maduración y secado, juega un rol importante en la biodiversidad de la microbiota superficial de estos salames.

Encontramos una alta predominancia de *P. nalgiovense* sin la utilización de cultivos comerciales iniciadores de emplume, constituyéndose en uno de los elementos importantes que explican el vínculo entre la tipicidad del producto y los factores locales, requisito fundamental para la obtención del sello de IG que alcanzaron estos salames típicos en 2014 (Resolución N° 37/2014, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación) (Figura 76). La obtención de este sello permite preservar la identidad del salame típico de Colonia Caroya, además de disminuir la usurpación de marca que sufrían estos productores, garantizando la inocuidad de los mismos, y comunicando a los consumidores las características particulares del mismo y del territorio que lo origina.



**Figura 76:** Logo de Indicación Geográfica para el salame típico de Colonia Caroya (Córdoba).

Cuando las temperaturas ambientes aumentan y disminuye la actividad de agua de los productos, muchos de los salames de la Colonia se ven colonizados por *Aspergillus ochraceus*.

Resulta muy importante evitar la contaminación superficial de los salames con esta especie, ya que no solo confiere un aspecto visual

desagradable amarillento dorado, el cual no favorece a la tipicidad del producto, sino que además genera un riesgo de encontrar ocratoxina A en el interior del producto, debido a la posible difusión de la toxina a través de la tripa, la cual fue comprobada en este trabajo.

Si bien, en la industria existen prácticas como el cepillado o el lavado superficial de los salames madurados, que tratan de eliminar visualmente la micoflora superficial de estos productos, estos procedimientos no serían efectivos para disminuir la contaminación con ocratoxina que pudiera haber sufrido anteriormente el producto. En Colonia Caroya la presencia de *A. ochraceus* en los productos ha disminuido notablemente mediante el control de la temperatura en los sótanos de maduración, no obstante resulta sumamente importante concientizar a los elaboradores sobre el potencial riesgo que implica la aparición de este hongo.

Asimismo, resulta importante destacar que la presencia de una especie toxicogénica sobre el producto no asegura la presencia de la toxina, ya que para que un hongo exprese su toxicogenicidad sobre un sustrato deben existir y coincidir una serie de condiciones fisiológicas, ecológicas y ambientales. En este trabajo no se ha encontrado salames caroyenses con contaminación con ocratoxina A, aún cuando superficialmente se encontraba *A. ochraceus* en alta concentración.

Al estudiar la influencia de la temperatura y la actividad de agua de cepas de *P. nalgiovense* y *A. ochraceus* aislados de salames caroyenses, se vio que afectaba el crecimiento de ambos al disminuir la actividad de agua y la temperatura. Se observó que no hubo una inhibición de uno u otro hongo al crecer juntos. Sin embargo a 15°C y a 0,86 y 0,90 de  $a_w$  predomina visualmente *P. nalgiovense*, viendo sólo la germinación de *A. ochraceus*. Este es un dato importante considerando que la temperatura de 15°C es la que se utiliza en la maduración de los salames, por lo cual la correcta aplicación de frío en los sótanos de maduración, sirve para minimizar la aparición de *A. ochraceus*.

La biodiversidad de especies fúngicas halladas tanto en el aire del sótano de los establecimientos elaboradores de salames de Colonia Caroya, como en la superficie de los productos es baja, predominando casi exclusivamente en ambos casos *P. nalgiovense*.

Es de destacar que la predominancia de las especies fúngicas encontradas en el aire de los sótanos de los establecimientos elaboradores de salames de la colonia, es coincidente con las predominancias encontradas en los productos. Sin embargo, en la inoculación intencional de un sótano de maduración que se llevo a cabo en este trabajo, ésta consideración no ha tenido éxito.

Las capacitaciones en buenas prácticas de elaboración realizadas con los elaboradores de salames de Colonia Caroya, tuvieron una implicancia positiva en la calidad higiénico sanitaria de los productos embutidos, encontrándose una mejoría sustancial en los criterios microbiológicos evaluados.

Se demostró que 21 días de maduración para aquellos salames caroyenses, que no utilizan bacterias lácticas en su formulación, es un tiempo adecuado para asegurar la inocuidad microbiológica.

La obtención del sello de calidad para estos productos, se fundó entre otras herramientas, de los resultados obtenidos en este trabajo. Investigaciones aplicadas que resultan en respuestas al sector productivo, enriquecen al vínculo y favorecen la transferencia tecnológica.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

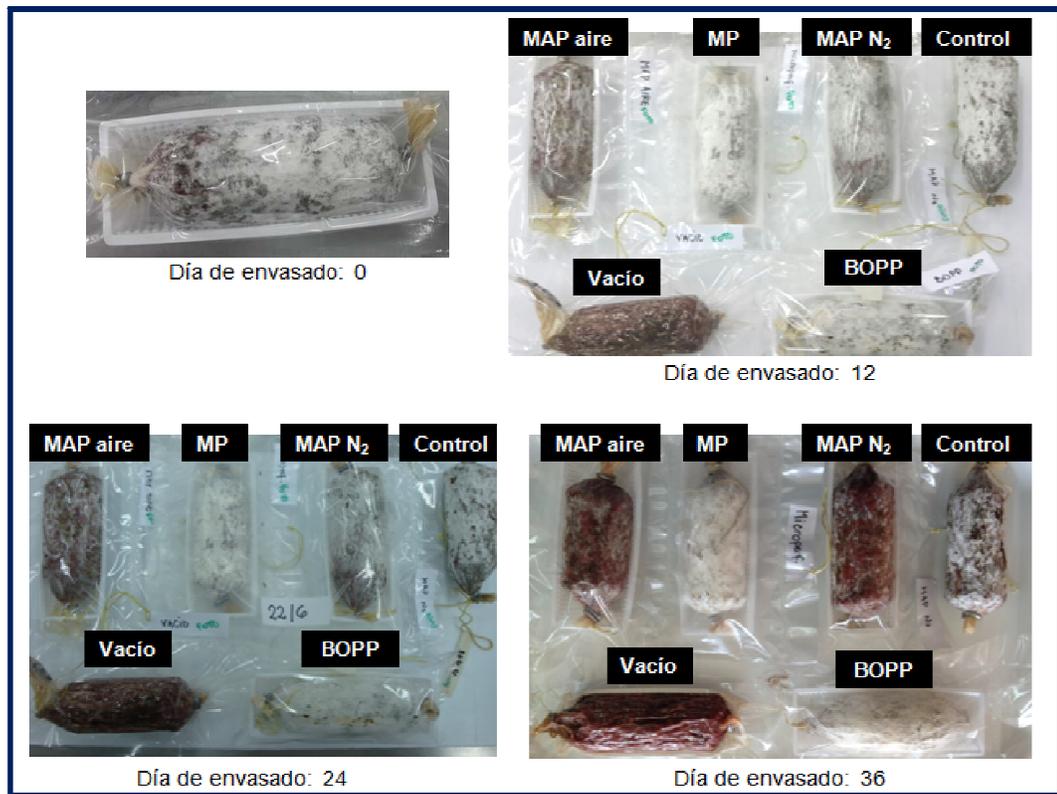
Este año comenzamos a trabajar en la búsqueda de un sistema de envasado que permita conservar el emplume superficial de embutidos secos. Como pudimos ver en este trabajo doctoral, el emplume superficial es un factor de calidad muchas veces en estos productos, por ello surgió la idea de encontrar un sistema de envasado que permita conservar el emplume y de esta manera los salames puedan comercializarse a diferentes regiones del país con mayor facilidad, sin perder tipicidad, y aumentando, de ser posible, la vida útil de los mismos.

Realizamos un primer ensayo en donde se analizaron 5 condiciones diferentes de envasado. Una vez que los salames alcanzaron una merma apropiada se envasaron y se dejaron a temperatura ambiente. Además, se mantuvieron embutidos sin envasar, considerados como muestras control.

Se pudo observar que la utilización de vacío y atmósferas modificadas (con 100% de  $N_2$  y con aire) no son compatibles con el objetivo de preservar el emplume superficial de estos productos debido a la restricción de oxígeno que se genera inicialmente o en menos de 12 días de envasados, como así tampoco de aumentar la vida útil de los mismos, ya que en un corto tiempo se presentan características organolépticas indeseables, evaluadas a través de un panel sensorial entrenado y mediante análisis de perfil de textura (TPA). En cuanto a los tratamientos BOPP (film polipropileno bi-orientado) y MP (film microperforado), a los 26 días de envasado, tenían un emplume homogéneo pero con un crecimiento desmedido de los hongos, debido a que la actividad metabólica se vio favorecida por una  $a_w$  inalterable en el tiempo y una disponibilidad variable de oxígeno. Sin embargo, estos tratamientos a los 26 días de envasados mostraban un importante olor extraño, debido a una alta concentración de compuestos nitrogenados volátiles, evidenciado en los altos valores de nitrógeno básico volátil y pH. El crecimiento excesivo de los hongos superficiales, ocasionó una proteólisis aumentada en la periferia de los salames observándose una modificación de la textura.

En relación al control, la disminución drástica de la  $a_w$  genera que si bien el hongo se mantiene viable en el tiempo, no presente una elevada actividad metabólica (pH constante). Esta disminución de  $a_w$  y de humedad provoca que

el salame presente a los 26 días de envasado una masticabilidad y una dureza mucho mayor al resto de los productos envasados.



**Figura 77:** Fotos de los salames a los distintos tiempos de envasado.

También es importante resaltar que en todas las muestras analizadas y para todos los tiempos evaluados, se cumplieron los criterios microbiológicos establecidos en el CAA, artículo 302 del Capítulo VI, para embutidos secos.

Estos resultados son prometedores y conducen a realizar nuevos ensayos utilizando los sistemas que mejor se adaptaron a la matriz y propósito buscado (MP y BOPP), en donde el nuevo objetivo sea lograr enlentecer el desarrollo fúngico superficial para evitar la acumulación de subproductos de proteólisis. De esta manera, la utilización de bajas temperaturas surge como la primera alternativa a considerar.

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS EN RELACIÓN CON ESTE TRABAJO

### Publicaciones científicas internacionales

---

- Indigenous filamentous fungi on the surface of Argentinean dry fermented sausages produced in Colonia Caroya (Córdoba). (2013). Canel R. S., Wagner J. R., Stenglein S. A., and Ludemann V. *International Journal of Food Microbiology*. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.022. Vol. 164 (1), pp. 81-86. ISSN 0168-1605.
- Hongos filamentosos superficiales de embutidos secos fermentados como elemento de tipicidad territorial: Experiencia de un caso. (2015). Canel R., Wagner J., Champredonde M., Ludemann V. *Revista Cárnica Latinoamericana*. Ed. 193, pp 42-45.

### Informe Técnico

---

- Informe Técnico incorporado en la Solicitud de reconocimiento Indicación Geográfica para el salame típico de Colonia Caroya (Córdoba). Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. Marzo 2014. Resolución N°37/2014, pp. 74-80.

### Participaciones en congresos/ simposios

---

- Implicancia del desarrollo de *Aspergillus ochraceus* en la microbiota superficial de embutidos secos fermentados. Guerrissi S., Canel R., Wagner J. y Ludemann V. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas (CLICAP). Abril 2015. San Rafael, Mendoza.
- Estudio de la micoflora superficial en embutidos secos fermentados (salames) producidos en Colonia Caroya, Córdoba. Romina Soledad Canel, Jorge Wagner, Sebastián Stenglein y Vanesa Ludemann.

Jornadas de Doctorandos y estudiantes Avanzados de CyT. Junio 2013. Universidad Nacional de Quilmes.

- Capacidad toxicogénica de *Aspergillus ochraceus* e incidencia natural de ocratoxina a en salames. Recimil M., Canel R.S., y Ludemann V. XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos. Noviembre 2012. Buenos Aires.
- Investigación de la presencia de microorganismos patógenos en embutidos secos fermentados. Canel R., Moavro A., Pilatti L., Champredonde M. y Ludemann V. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas. Marzo 2012. San Rafael, Mendoza.
- Estudio comparativo de la micoflora de embutidos secos fermentados de diferentes regiones del país. Vila G., Canel R., Ludemann V. y Pose G. Congreso Latinoamericano de Ingeniería y Ciencias Aplicadas. Marzo 2012. San Rafael, Mendoza.
- Micoflora superficial de salames producidos en Colonia Caroya en época invernal y estival. Canel R., Vila G., Pilatti L., Champredonde M., Ludemann V. 26 Congresso Brasileiro Microbiología. Octubre 2011. Foz de Iguazú, Brasil. Publicado en Pág. 97 Libro de resúmenes. ISSN 1982-1301.
- Biodiversidad de hongos de emplume en embutidos secos fermentados producidos en Colonia Caroya (Córdoba). Canel R., Vila G., Pilatti L., Champredonde M., Ludemann V. Congreso Argentino de Micología. Junio 2011. Misiones, Argentina.

### **Experiencia en formación de recursos humanos**

---

#### **Dirección de tesis/ trabajos finales de carrera**

- Directora de Tesis de Grado. Ingeniería en Alimentos.

“Análisis del origen de contaminación por ocratoxina A en salames de elaboración artesanal”

Alumna: Sofia Guerrissi (Legajo: 18.010)

Resolución CD CyT N° 045/13

Abril 2013/ Diciembre 2014. Nota: 10 (diez)

Universidad Nacional de Quilmes

- Directora de Tesis de Grado. Ingeniería en Alimentos.  
“Estudio sobre la potencial toxicidad de *Aspergillus ochraceus* aislado de salames producidos en Colonia Caroya (Córdoba)”.  
Alumna: Mariángeles Recimil (Legajo: 10.259)  
Resolución CD CyT N° 190/11  
Diciembre 2011/ Septiembre 2012. Nota: 9 (nueve)  
Universidad Nacional de Quilmes

### Disertaciones en Congresos/ Cursos

---

- Disertación: “Identificación Geográfica para los Salames de Colonia Caroya” en el “Curso AUSAL de Ingeniería de Productos Cárnicos”, Universidad Nacional de Quilmes. Carrera de Ingeniería en Alimentos. 08 de Mayo de 2015.
- Disertación: “Identificación Geográfica para los Salames de Colonia Caroya” en el “Curso AUSAL de Ingeniería de Productos Cárnicos”, Universidad Nacional de Quilmes. Carrera de Ingeniería en Alimentos. 23 de Abril de 2014.
- Disertación: “Microflora superficial de embutidos secos fermentados como elemento de tipificación territorial: Experiencia de un caso” en la mesa redonda “Utilización de mohos en la industria” (Mx3) en el XIII Congreso Argentino de Micología. 24 al 27 de Agosto de 2014. Publicado en libro de resúmenes Lilloa volumen 51.

## REFERENCIAS

- Aase, B., Sundheim, G., Langsrud, S., & Rørvik, L. M. (2000). Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*, 62(1), 57-63.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Andersen, S. J. (1995). Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 58(4), 426-429.
- AOAC, Official Methods of Analysis (1995). Chapter 49: *Natural Toxins*, 991.44, 40 – 41.
- Arbillaga, L., Ezpeleta, O., & de Cerain, A. L. (2004). ¿ Es la Ocratoxina A una micotoxina mutagénica?. *Revista de Toxicología*, 21(1), 1-10.
- Asefa, D. T., Gjerde, R. O., Sidhu, M. S., Langsrud, S., Kure, C. F., Nesbakken, T., & Skaar, I. (2009). Moulds contaminants on Norwegian dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 128(3), 435-439.
- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjöberg, A. M., Aarnisalo, K., Björkroth, J. & Korkeala, H. (1999). Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), 150-155.
- Baka, A. M., Papavergou, E. J., Pragalaki, T., Bloukas, J. G., & Kotzekidou, P. (2011). Effect of selected autochthonous starter cultures on processing and quality characteristics of Greek fermented sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 44(1), 54-61.
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International journal of food microbiology*, 23(3), 277-294.

- Battilani, P., Pietri, A., Bertuzzi, T., Languasco, L., Giorni, P., & Kozakiewicz, Z. (2003). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in grapes grown in Italy. *Journal of Food Protection*®, 66(4), 633-636.
- Battilani, P., Pietri, A., Giorni, P., Formenti, S., Bertuzzi, T., Toscani, T. & Kozakiewicz, Z. (2007). *Penicillium* populations in dry-cured ham manufacturing plants. *Journal of Food Protection*®, 70(4), 975-980.
- Becker, M., Degelmann, P., Herderich, M., Schreier, P., & Humpf, H. U. (1998). Column liquid chromatography–electrospray ionisation–tandem mass spectrometry for the analysis of ochratoxin. *Journal of Chromatography A*, 818(2), 260-264.
- Bertuzzi, T., Gualla, A., Morlacchini, M., & Pietri, A. (2013). Direct and indirect contamination with ochratoxin A of ripened pork products. *Food Control*, 34(1), 79-83.
- Bogs, C., Battilani, P., & Geisen, R. (2006). Development of a molecular detection and differentiation system for ochratoxin A producing *Penicillium* species and its application to analyse the occurrence of *Penicillium nordicum* in cured meats. *International journal of food microbiology*, 107(1), 39-47.
- Boué, E. 2012. El sector del salame de Colonia Caroya: Perspectivas para el establecimiento de una Indicación Geográfica. *Tesis de Fin de Estudios, Master Food Identity*.
- Castellari, C., Quadrelli, A. M., & Laich, F. (2010). Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. *International journal of food microbiology*, 142(1), 149-155.
- Castro, L. C., Luchese, R. H., & Martins, J. F. P. (2000). Efeito do uso da cepa starter de *Penicillium nalgiovense* na qualidade de salames. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20(1), 40-46.
- Chirife, J., Fontán, C. F., & Benmergui, E. A. (1980). The prediction of water activity in aqueous solutions in connection with intermediate moisture foods IV.  $a_w$  prediction in aqueous non electrolyte solutions. *International Journal of Food Science & Technology*, 15(1), 59-70.
- Código Alimentario Argentino. [www.anmat.gov.ar](http://www.anmat.gov.ar)

- Comi, G., Orlic, S., Redzepovic, S., Urso, R., & Iacumin, L. (2004). Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *International journal of food microbiology*, 96(1), 29-34.
- Comi, G., & Iacumin, L. (2013). Ecology of moulds during the pre-ripening and ripening of San Daniele dry cured ham. *Food Research International*, 54(1), 1113-1119.
- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Bertuzzi, T., Moseriti, A., Pietri, A., Dossena, A., & Marchelli, R. (2010). Occurrence of ochratoxin A in raw ham muscle, salami and dry-cured ham from pigs fed with contaminated diet. *Food chemistry*, 120(4), 978-983.
- Dao, H. P., Mathieu, F., & Lebrihi, A. (2005). Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *International journal of food microbiology*, 104(1), 61-67.
- De Cesare, A., Mioni, R., & Manfreda, G. (2007). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in fresh and fermented Italian sausages and ribotyping of contaminating strains. *International journal of food microbiology*, 120(1), 124-130.
- Del Fiore, A., Reverberi, M., De Rossi, P., Tolaini, V., Fabbri, A. A., & Fanelli, C. (2010). Polymerase chain reaction-based assay for the early detection of aflatoxigenic fungi on maize kernels. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2(1), 22-27.
- El-Shayeb, N. M., Mabrouk, S. S., & Abd-El-Fattah, A. M. (1992). Production of ochratoxins by some Egyptian *Aspergillus* strains. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 147(1), 86-91.
- Encinas, J. P., Sanz, J. J., García-López, M. L., & Otero, A. (1999). Behaviour of *Listeria* spp. in naturally contaminated chorizo (Spanish fermented sausage). *International Journal of Food Microbiology*, 46(2), 167-171.
- Escher, F. E., Koehler, P. E., & Ayres, J. C. (1973). Production of ochratoxins A and B on country cured ham. *Applied microbiology*, 26(1), 27-30.
- Färber, P., & Geisen, R. (2004). Analysis of differentially-expressed ochratoxin A biosynthesis genes of *Penicillium nordicum*. *European Journal of Plant Pathology*, 110(5-6), 661-669.

- Fink-Gremmels, J., El-Banna, A., Leistner, L., (1988). Developing mould starter cultures for meat products. *Fleischwirtschaft* 68, 1292-1294.
- Frece, J., Cvrtila, J., Topić, I., Delaš, F., & Markov, K. (2014). *Lactococcus lactis* ssp. as Potential Functional Starter Culture. *Food Technology and Biotechnology*, 52(4), 489-494.
- Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Studies in mycology*, 49(1), C174.
- Galvalisi, U., Lupo, S., Piccini, J., & Bettucci, L. (2012). *Penicillium* species present in Uruguayan salami. *Rev Argent Microbiol*, 44, 36-42.
- Gareis, M., Märtlbauer, E., Bauer, J., & Gedek, B. (1988). [Determination of ochratoxin A in human milk]. *Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forschung*, 186(2), 114-117.
- Gareis, M., & Scheuer, R. (2000). Ochratoxin A in meat and meat products. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 51(4/5), 102-104.
- Glass, N. L., & Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323-1330.
- González, H. H. L., Resnik, S. L., Boca, R. T., & Marasas, W. F. O. (1995). Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia*, 130(1), 29-36.
- Grazia, L., Romano, P., Bagni, A., Roggiani, D., & Guglielmi, G. (1986). The role of moulds in the ripening process of salami. *Food Microbiology*, 3(1), 19-25.
- Houbraeken, J., Frisvad, J. C., Seifert, K. A., Overy, D. P., Tuthill, D. M., Valdez, J. G., & Samson, R. A. (2012). New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section *Chrysogena*. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 29, 78.
- Houbraeken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus: The Global Mycological Journal*, 2(1), 87.

- Huff, W. E., & Hamilton, P. B. (1979). Mycotoxins-their biosynthesis in fungi: Ochratoxins-metabolites of combined pathways. *Journal of Food Protection*, 42(10), 815-820.
- Hurst, W. J., & Martin, R. A. (1998). High-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A in artificially contaminated cocoa beans using automated sample clean-up. *Journal of Chromatography A*, 810(1), 89-94.
- Hwang, H. J., Vogel, R. F., & Hammes, W. P. (1993). Entwicklung von Schimmelpilzkulturen für die Rohwurstherstellung: Charakterisierung der Stämme und toxikologische Bewertung. *Fleischwirtschaft*, 73(1), 89-92.
- Iacumin, L., Chiesa, L., Boscolo, D., Manzano, M., Cantoni, C., Orlic, S., & Comi, G. (2009). Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. *Food Microbiology*, 26(1), 65-70.
- Iacumin, L., Manzano, M., & Comi, G. (2012). Prevention of *Aspergillus ochraceus* growth on and Ochratoxin a contamination of sausages using ozonated air. *Food microbiology*, 29(2), 229-232.
- ICMSF, M. D. L. A. (1996). Microorganismos de los Alimentos. Características de los patógenos microbianos. Editorial Acribia. Zaragoza (España).
- ICMSF, M. D. L. A. (2000). 1. Segunda edición. Técnicas de análisis microbiológico Vol. 1 Editorial Acribia. Zaragoza (España).
- Jalili, M., Jinap, S., & Radu, S. (2010). Natural occurrence of ochratoxin A contamination in commercial black and white pepper products. *Mycopathologia*, 170(4), 251-258.
- Kouadio, A. I., Lebrihi, A., Agbo, G. N., Mathieu, F., Pfohl-Leszkowiz, A., & Dosso, M. B. (2007). Influence of the interaction of temperature and water activity on the production of ochratoxin A and the growth of *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* on coffee-based culture medium. *Canadian journal of microbiology*, 53(7), 852.
- Kovacs, N. (1928). A simplified method for detecting indole formation by bacteria. *Z Immunitätsforsch*, 56: 311.
- Kuiper-Goodman, T. (1996). Risk assessment of ochratoxin A: an update. *Food Additives and Contaminants*, 13, 53.

- Leistner, L. (1990). Mould- fermented foods: Recent developments. *Food Biotechnology* 4, 433-441.
- Levine, M. (1916). On the significance of the Voges-Proskauer reaction. *Journal of bacteriology*, 1(2), 153.
- Leroy, F., Verluyten, J., & De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International journal of food microbiology*, 106(3), 270-285.
- Lindqvist, R., & Lindblad, M. (2009). Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages during maturation/storage. *International journal of food microbiology*, 129(1), 59-67.
- Ljutov, V. (1961). Technique of methyl red test. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, 51(4), 369-380.
- López-Díaz, T. M., Santos, J. A., García-López, M. L., & Otero, A. (2001). Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 68(1), 69-74.
- López Díaz, T. L., González, C. J., Moreno, B., & Otero, A. (2002). Effect of temperature, water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium olsonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. *Food microbiology*, 19(1), 1-7.
- Ludemann, V., Pose, G., Pollio, M. L., & Segura, J. (2004). Surface mycoflora of Argentinean dry fermented sausages and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *Journal of Food Technology*, 2(4), 288-292.
- Ludemann, V. (2008). Desarrollo de cultivos starters para el emplume de embutidos secos fermentados. Tesis Doctoral. *Universidad Nacional de Quilmes*.
- Ludemann, V., Greco, M., Rodríguez, M. P., Basílico, J. C., & Pardo, A. G. (2010). Conidial production by *Penicillium nalgiovense* for use as starter cultures in dry fermented sausages by solid state fermentation. *LWT-Food Science and Technology*, 43(2), 315-318.

- Luque, M. I., Córdoba, J. J., Rodríguez, A., Núñez, F., & Andrade, M. J. (2013). Development of a PCR protocol to detect ochratoxin A producing moulds in food products. *Food control*, 29(1), 270-278.
- Lusky, K., Tesch, D., & Gobel, R. (1993). Influence of the mycotoxin ochratoxin-A on animal health and formation of residues in pigs and different types of sausages derived from these animals. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene*, 44(6), 131-134.
- Mabrouk, S. S., & El-Shayeb, N. M. A. (1981). Effects of garlic on mycelial growth and aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel*.
- Magnoli, C., Hallak, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Chiacchiera, S. M., Palacio, G., & Dalcerro, A. (2005). Surveillance of toxigenic fungi and ochratoxin A in feedstuffs from Córdoba province, Argentina. *Veterinary research communications*, 29(5), 431-445.
- Malagutti, L., Zannotti, M., Scampini, A., & Sciaraffia, F. (2005). Effects of ochratoxin A on heavy pig production. *Animal Research*, 54(3), 179-184.
- Martin, B., Garriga, M., & Aymerich, T. (2011). Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* at small-scale Spanish factories producing traditional fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 74(5), 812-815.
- Mataragas, M., Bellio, A., Rovetto, F., Astegiano, S., Greci, C., Hertel, C., & Cocolin, L. (2015). Quantification of persistence of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* during manufacture of Italian fermented sausages. *Food Control*, 47, 552-559.
- Mateo, R., Medina, Á., Mateo, E. M., Mateo, F., & Jiménez, M. (2007). An overview of ochratoxin A in beer and wine. *International journal of food microbiology*, 119(1), 79-83.
- Matrella, R., Monaci, L., Milillo, M. A., Palmisano, F., & Tantillo, M. G. (2006). Ochratoxin A determination in paired kidneys and muscle samples from swines slaughtered in southern Italy. *Food control*, 17(2), 114-117.
- Mintzlaff, H. J., & Leistner, L. (1972). Untersuchungen zur selektion eines technologisch geeigneten und toxikologisch unbedenklichen Schimmelpilz-Stammes fur die Rohwurst-Herstellung. *Zbl. Vet. Med. B* 19, 291-300.

- Mižáková, A., Pipová, M., & Turek, P. (2002). The occurrence of moulds in fermented raw meat products. *Czech Journal of Food Science*, 20, 89-94.
- Monte, E., Villanueva, J. R., & Dominguez, A. (1986). Fungal profiles of Spanish country-cured hams. *International Journal of Food Microbiology*, 3(6), 355-359.
- Moore, J. E. (2004). Gastrointestinal outbreaks associated with fermented meats. *Meat science*, 67(4), 565-568.
- Muthukumarasamy, P., & Holley, R. A. (2006). Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate-microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 164 – 169.
- Núñez, F., Rodríguez, M. M., Bermúdez, M. E., Córdoba, J. J., & Asensio, M. A. (1996). Composition and toxigenic potential of the mould population on dry-cured Iberian ham. *International Journal of Food Microbiology*, 32(1), 185-197.
- Núñez, F., Westphal, C. D., Bermudez, E., & Asensio, M. A. (2007). Production of secondary metabolites by some terverticillate penicillia on carbohydrate-rich and meat substrates. *Journal of Food Protection®*, 70(12), 2829-2836.
- Ockerman, H. W., & Basu, L. (2007). Production and consumption of fermented meat products. *Handbook of fermented meat and poultry*, 9.
- Ozbey, F., & Kabak, B. (2012). Natural co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in spices. *Food Control*, 28(2), 354-361.
- Pacin, A. M., González, H. H. L., Etcheverry, M., Resnik, S. L., Vivas, L., & Espin, S. (2003). Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador. *Mycopathologia*, 156(2), 87-92.
- Palacios-Cabrera, H., Taniwaki, M. H., Hashimoto, J. M., & Menezes, H. C. D. (2005). Growth of *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius* and *A. niger* on culture media at different water activities and temperatures. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(1), 24-28.
- Papagianni, M., Ambrosiadis, I., & Filiouis, G. (2007). Mould growth on traditional Greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. *Meat science*, 76(4), 653-657.

- Pardo, E., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2004). Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 95(1), 79-88.
- Pascual Anderson, M. R. & Calderón Pascual, V. (2000). *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*, 2ª ed. Díaz de Santos, Madrid.
- Paterson, R. R. M. (2006). Identification and quantification of mycotoxigenic fungi by PCR. *Process Biochemistry*, 41(7), 1467-1474.
- Peintner, U., Geiger, J., & Pöder, R. (2000). The mycobiota of speck, a traditional tyrolean smoked and cured ham. *Journal of Food Protection*, 63(10), 1399-1403.
- Perši, N., Pleadin, J., Kovačević, D., Scortichini, G., & Milone, S. (2014). Ochratoxin A in raw materials and cooked meat products made from OTA-treated pigs. *Meat science*, 96(1), 203-210.
- Perrone, G., Samson, R. A., Frisvad, J. C., Susca, A., Gunde-Cimerman, N., Epifani, F., & Houbraeken, J. (2015). *Penicillium salamii*, a new species occurring during seasoning of dry-cured meat. *International journal of food microbiology*, 193, 91-98.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519). New York: Springer.
- Pose, G., Ludemann, V., Gomez, A., & Segura, J. (2007). Comparison of growth characteristics and roquefortin C production of *Penicillium roqueforti* from blue-veined cheese. *Mycotoxin research*, 23(3), 122-126.
- Ramos, A. J., Labernia, N., Marín, S., Sanchis, V., & Magan, N. (1998). Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1), 133-140.
- Rivas, M., Padola, N. L., Luchessi, P. M., Masana, M. (2010). Diarrheogenic *Escherichia coli* in Argentina. En: Torres AG, editor. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Oak Park IL, USA, Bentham Science Publishers Ltd, p. 142-61

- Rojas, F. J., Jodral, M., Gosalvez, F., & Pozo, R. (1991). Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish dry-cured ham. *International journal of food microbiology*, 13(4), 249-255.
- Rosa, C. D. R., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M. E., Rekson, A. D. O., Magnoli, C. E., & Dalcerro, A. M. (2002). Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Additives & Contaminants*, 19(4), 408-414.
- Rosa, C. A. R., Magnoli, C. E., Fraga, M. E., Dalcerro, A. M., & Santana, D. M. N. (2004). Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food additives and contaminants*, 21(4), 358-364.
- Ross, K. D. (1975). Estimation of water activity in intermediate moisture foods. *Food Technology*, 39, 26-34.
- Rossi, A., Sardi, L., Zaghini, A., & Rizzi, L. (2006). Diete contaminate da micotossine nel suino: effetti in vivo e al macello. *Suinicoltura*, 10, 131 – 134.
- Saleemi, M. K., Khan, M. Z., Khan, A., & Javed, I. (2010). Mycoflora of poultry feeds and mycotoxins producing potential of *Aspergillus* species. *Pakistan Journal of Botany*, 42(1), 427-434.
- Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M., & Pappa, A. (1998). Stability and safety of traditional Greek salami—a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology*, 44(1), 69-82.
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2000). *Introduction to food-and airborne fungi* (No. Ed. 6). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2004a). *Introduction to food-and airborne fungi* (No. Ed. 7). Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- Samson, R. A., Seifert, K. A., Kuijpers, A. F., Houbraken, J. A. M. P., & Frisvad, J. C. (2004b). Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial  $\beta$ -tubulin sequences. *Stud Mycol*, 49, 175-200.
- Sartz, L., De Jong, B., Hjertqvist, M., Plym-Forshell, L., Alsterlund, R., Löfdahl, S. & Karpman, D. (2008). An outbreak of *Escherichia coli* O157: H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented

sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiology and infection*, 136(03), 370-380.

- Schiavone, E. (2010). Indicaciones Geográficas y Denominaciones de Origen en la República Argentina. *Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*. FAO: Rome.
- Scott, J., Untereiner, W. A., Wong, B., Straus, N. A., & Malloch, D. (2004). Genotypic variation in *Penicillium chrysogenum* from indoor environments. *Mycologia*, 96(5), 1095-1105.
- Simion, A. M. C., Vizireanu, C., Alexe, P., Franco, I., & Carballo, J. (2014). Effect of the use of selected starter cultures on some quality, safety and sensorial properties of Dacia sausage, a traditional Romanian dry-sausage variety. *Food Control*, 35(1), 123-131.
- Simmons, J. S. (1926). A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *The Journal of Infectious Diseases*, 209-214.
- Sonjak, S., Ličen, M., Frisvad, J. C., & Gunde-Cimerman, N. (2011). The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. *Food microbiology*, 28(3), 373-376.
- Sørensen, L. M., Jacobsen, T., Nielsen, P. V., Frisvad, J. C., & Koch, A. G. (2008). Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *International journal of food microbiology*, 124(1), 58-64.
- Stenglein, S. A., & Balatti, P. A. (2006). Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in Argentina as revealed by pathogenic and molecular markers. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 68(4), 158-167.
- Sunesen, L. O., & Stahnke, L. H. (2003). Mould starter cultures for dry sausages—selection, application and effects. *Meat Science*, 65(3), 935-948.
- Tabuc, C., Bailly, J. D., Bailly, S., Querin, A., & Guerre, P. (2004). Toxigenic potential of fungal mycoflora isolated from dry cured meat products: preliminary study. *Revue de medecine veterinaire*, 155(5), 287-291.
- Thévenot, D., Delignette-Muller, M. L., Christieans, S., & Vernozy-Rozand, C. (2005). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International journal of food microbiology*, 102(1), 85-94.

- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Torres, M. R., Ramos, A. J., Soler, J., Sanchis, V., & Marín, S. (2003). SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. *International journal of food microbiology*, 81(3), 185-193.
- USDA/FSIS. Microbiology Laboratory Guidebook. "Isolation and Identification of *Salmonella* from Meat, Poultry, and Egg Products". Revision 02. 25/10/08. "Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples". Revision 06. Effective 2/19/08.
- Vandecastelaere, E., Arfini, F., Belletti, G., & Marescotti, A. (2010). *Uniendo personas, territorios y productos: guía para fomentar la calidad vinculada al origen y las indicaciones geográficas sostenibles*. FAO.
- Vega, M., Ríos, G., von Baer, D., Mardones, C., Tessini, C., Herlitz, E. & Ruiz, M. A. (2012). Ochratoxin A occurrence in wines produced in Chile. *Food Control*, 28(1), 147-150.
- Villani, F., Casaburi, A., Pennacchia, C., Filosa, L., Russo, F., & Ercolini, D. (2007). Microbial ecology of the soppressata of Vallo di Diano, a traditional dry fermented sausage from southern Italy, and in vitro and in situ selection of autochthonous starter cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), 5453-5463.
- Wang, X., Ma, P., Jiang, D., Peng, Q., & Yang, H. (2006). The natural microflora of Xuanwei ham and the no-mouldy ham production. *Journal of food engineering*, 77(1), 103-111.
- Waśkiewicz, A., Beszterda, M., Bocianowski, J., & Goliński, P. (2013). Natural occurrence of fumonisins and ochratoxin A in some herbs and spices commercialized in Poland analyzed by UPLC–MS/MS method. *Food microbiology*, 36(2), 426-431.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for

phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18, 315-322.

- Wicklow, D. T., & Rebar, C. (1988). Mold inoculum from cheek pouches of a granivorous desert rodent, *Dipodomys spectabilis*. *Mycologia*, 750-753.
- Wu, M. T., Ayres, J. C., & Koehler, P. E. (1974). Toxigenic aspergilli and penicillia isolated from aged, cured meats. *Applied microbiology*, 28(6), 1094-1096.

**ANEXO I: MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y REACTIVOS****Agar Czapek Extracto de Levadura (CYA)**

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g  
Czapek Concentrado, 10 ml  
Solución de Metales Traza, 1 ml  
Extracto der Levadura, 5 g  
Sacarosa, 30 g  
Agar, 15 g  
Agua destilada, 1000 ml

**Agar Dicloran Glicerol 18% (DG18)**

Glucosa, 10 g  
Peptona, 5 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g  
MgSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O, 0,5 g  
Glicerol , 220 g  
Diclorán, 1 ml  
Cloranfenicol, 100 mg  
Agar, 15 g  
Agua destilada, 1000 ml

**Agar Extracto de Malta (MEA)**

Extracto de Malta, 20 g  
Peptona, 1 g  
Glucosa, 20 g  
Agar, 20 g  
Agua destilada, 1000 ml  
pH: 5,6

**Agar Lisina Hierro Doble Modificado (DMLIA)**

Agar lisina hierro, 34 g  
Sales biliares N°3, 1,5 g  
Lactosa, 10 g  
Sucrosa, 10 g  
Tiosulfato de sódio, 6,76 g  
Citrato de amonio férrico, 0,3 g  
Agua destilada, 1000 ml  
Se calientan todos los ingredientes a 100°C durante 10 min., una vez enfriado a 50°C se agregan 0,015 g de una solución filtrada de Novobiocina.  
pH: 6,7

**Agar Neutro Sacarosa Creatina (CSN)**

CS concentrado, 10 ml  
Sacarosa, 10 g  
Creatina, 5 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g  
Púrpura de Bromocresol, 0,05 g  
Agar, 15 g  
Agua destilada, 1000 ml

**Agar Nitrato 25% Glicerol (GN25)**

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,75 g  
Czapek Concentrado, 7,5 ml  
Extracto de Levadura, 3,7 g  
Glicerol, 250 g  
Agar, 12 g  
Agua destilada, 750 ml  
pH: 7

**Agar Nutritivo (AN)**

Pluripeptona, 5 g  
Extracto de carne, 3 g  
Agar, 15 g  
Agua destilada, 1000 ml

**Agar Oxford Modificado (MOX)**

Agar, 39 g  
Esculina, 1 g  
Citrate de hierro y amonio, 0,5 g  
Cloruro de litio, 12 g  
Agua destilada, 1000 ml  
Una vez autoclavado se agrega asépticamente el contenido de 4 ml del Suplemente Selectivo para Oxford Modificado Agar, el cual contiene:  
Colistin, 0,005 g  
Ceftazidima, 0,01 g  
Agua destilada, 1000 ml  
pH: 7,2

**Agar Sangre de Caballo (HL)**

Infusión de músculo de corazón, 375 g  
Peptona, 10 g  
Cloruro de sodio, 5 g  
Agar, 15 g  
Agua destilada, 1000 ml  
Luego de autoclavado el medio enfriar a 45-50°C y agregar sangre de caballo desfibrinada al 5%.  
pH: 7,3

**Agar SPS**

Peptona de caseína, 15 g  
Extracto de levadura, 10 g  
Citrate férrico, 0,5 g  
Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 0,5 g  
Sulfato de polimixina B, 0,01 g  
Sulfadiazina sódica, 0,12 g  
Agar, 14 g  
Agua destilada, 1000 ml

**Agar Verde Brillante Sulfa (BGSA)**

Agar, 20 g

Cloruro de sodio, 1 g  
Extracto de levadura, 3 g  
Lactosa, 10 g  
Peptona especial, 10 g  
Rojo de fenol, 0,08 g  
Sacarosa, 10 g  
Sulfapiridina de sódio, 1 g  
Verde brillante, 0,0125 g  
Agua destilada, 1000 ml  
pH: 6,9

**Agua de Peptona**

Peptona de carne, 10 g  
Cloruro de sodio, 5 g  
Agua destilada, 1000 ml  
pH: 7,2

**Agua de Peptona Buffereada (APB)**

Peptona de carne, 10 g  
Cloruro de sodio, 5 g  
Fosfato disódico, 3,5 g  
Fosfato monopotásico, 1,5 g  
Agua destilada, 1000 ml  
pH: 7,2

**Azul de Bromofenol**

Azul de bromofenol (colorante), 0,25g  
Sacarosa, 40 g  
Agua destilada, 100 ml

**Baird Parker Agar (BP)**

Triptona, 10 g  
Extracto de carne, 5 g  
Extracto de levadura, 1 g  
Piruvato sódico, 10 g  
Glicina, 12 g  
Cloruro de litio, 5 g  
Agar, 20 g  
Agua destilada, 1000 ml

*Emulsión Yema de huevo-Telurito-Sulfametazina*

Emulsión yema de huevo, 50 ml  
Telurito potásico, 3 ml  
Sulfametazina, 25 ml  
Agua destilada, 1000 ml

El BP (142,5 ml) se mezcla con la emulsión Yema de huevo Telurito Sulfametazina (7,5 ml)

**Buffer CTAB**

100 m M Tris-HCl pH 8

20 mM EDTA pH 8

1,4 M NaCl 5 M

0.2% (w/v)  $\beta$  mercaptoetanol

Para preparar 80 ml totales se toman 8 ml de Tris-HCl, 3,2 ml EDTA y 22,4 ml de NaCl. Se le adiciona agua destilada hasta completar el volumen total.

**TRIS-HCl 1M**

Tris Base, 121,1 g

Agua destilada, 800 ml

HCl ~ 42 ml para llegar a pH 8.0

Llevar a 1000 ml con agua destilada

**EDTA 0,5M pH 8.0**

EDTA, 186,1 g

Agua destilada, 800 ml de

Ajustar el pH a 8 con NaOH

Llevar el volumen a 1000 ml con agua destilada

**NaCl 5M**

NaCl, 23,37 g

Agua destilada, 80 ml

**Caldo Lactosado**

Extracto de carne, 3 g

Peptona, 5 g

Lactosa, 5 g

Agua destilada, 1000 ml

pH: 6,9

**Citrato de Simmons Agar**

Sulfato magnésico heptahidratado, 0,2 g

Fosfato monoamónico, 1 g

Fosfato dipotásico, 1 g

Citrato sódico dihidratado, 2 g

Cloruro sódico, 5 g

Azul de bromotimol (0,2 %), 40 ml

Agar, 15 g

Agua destilada, 960 ml

**Cloroformo-Alcohol isoamílico 12:1 v/v**

Cloroformo, 33 ml

Alcohol isoamílico, 3 ml

Colocar en frasco caramelo o protegido por papel aluminio.

**Cresol Red**

Solución stock: 4 mg/ml

Solución de trabajo: 5 ml de cresol stock+5 ml de glicerol+ 4 ml de agua destilada.

**Czapek Concentrado**

NaNO<sub>3</sub>, 30 g

KCl, 5 g  
MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 5 g  
FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 0,1 g  
Agua destilada, 100 ml

**E. coli Caldo (EC)**

Triptosa o trpticase, 20 g  
Lactosa, 5 g  
Sales biliares, 1,5 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 g  
NaCl, 5 g  
Agua destilada, 1000 ml

**Eosina azul de metileno Agar (EMB)**

Peptona, 10 g  
Lactosa, 10 g  
Fosfato dipotásico, 2 g  
Eosina Y (solución acuosa al 2 % p/v), 20 ml  
Azul de metileno (solución acuosa al 0.25 % p/v), 25 ml  
Agar, 15 g  
Agua destilada, 955 ml

**Etanol 75%- acetato de amonio 10mM**

Acetato de amonio 10mM, 100 µl  
Etanol absoluto , 75 ml  
Llevar hasta 100 ml con agua destilada  
Acetato de amonio 10 mM  
Acetato de amonio, 77 g  
Llevar hasta 100 ml con agua destilada. Se esteriliza por filtrado.

**Fraser Caldo**

Peptona Proteosa, 5 g  
Triptona, 5 g  
“Lab Meco” polvo, 5 g  
Extracto de levadura, 5 g  
NaCl, 20 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,35 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 g  
Esculina, 1 g  
Cloruro de litio, 3 g  
Acido Nalidíxico (2% en 0,1 M NaOH), 1 ml  
Agua destilada, 1000 ml

**Glucosa Tamponado Caldo**

Peptona Proteosa, 5 g  
Glucosa, 5 g  
Fosfato dipotásico, 5 g  
Agua destilada, 1000 ml

**Infusión Cerebro Corazón (BHI)**

Extracto cerebro ternero, 12,5 g  
Extracto corazón de buey, 5 g  
Triptosa, 10 g  
NaCl, 5 g  
Fosfato de sodio, 2,5 g  
Agua destilada, 1000 ml

**Lauril Sulfato Triptosa Caldo (LST)**

Triptosa, 20 g  
Lactosa, 5 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,75 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,75 g  
NaCl, 5 g  
Lauril sulfato de sodio, 0,1 g  
Agua destilada, 1000 ml

**Lisina Hierro Agar (LIA)**

Peptona, 5 g  
Extracto de levadura, 3 g  
Glucosa, 1 g  
L- lisina, 10 g  
Citrato férrico amónico, 0,5 g  
Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,04 g  
Púrpura de Bromocresol, 0,02 g  
Agar, 15 g  
Agua destilada, 1000 ml

**MR-VP Caldo**

Pluripeptona, 7 g  
Glucosa, 5 g  
Fosfato dipotásico, 5 g  
Agua destilada, 1000 ml

**Nonidet P40**

Solución de trabajo al 0,05%

**Rappaport Vassiliadis Caldo (RV)**

Digerido pancreático de caseína, 4,54 g  
Cloruro de sodio, 7,2 g  
Fosfato monopotásico, 1,45 g  
Cloruro de magnesio, 13,4 g  
Oxalato de verde de malaquita, 36 mg  
Agua destilada, 1000 ml

**Reactivo de Kovacs**

Paradimetilaminobenzaldehído, 5 g  
Alcohol isoamílico (o amílico normal), 75 ml  
Ácido clorhídrico (concentrado), 25 ml

**Reactivos para prueba de Voges-Proskauer**

Solución al 5 % de alfa-naftol

Solución al 40 % de KOH con 0,3 % de creatina

**Solución de rojo de metilo**

Rojo de metilo, 0,1 g

Alcohol etílico, 300 ml

Agua 500 ml

**TAE 50X (buffer)**

Tris-Base, 242 g

Acido acético glacia, 57,1 ml

EDTA 0,5 M, pH 8, 100 ml

**TBE 5X**

Ácido bórico, 27,5 g

Tris-Base, 54,0 g

EDTA 0,5 M pH 8, 20 ml

Agua destilada, 980 ml

**TE 1X (buffer)**

10mM Tris-HCl pH 8, 10 ml

1mM EDTA pH 8, 2 ml

Agua destilada, 988 ml

**Tetratonato Caldo (TT)**

Peptona, 5 g

Sales biliares, 1 g

Carbonato de calcio, 10 g

Tiosulfato de sodio, 30 g

Agua destilada, 1000 ml

Antes de utilizar añadir 20 ml/litro de solución I<sub>2</sub>-KI (5 g de I<sub>2</sub> y 6 g de KI en 1 litro de agua destilada) y 10 ml /litro de solución al 0,1% de Verde Brillante.

**Triple Azucar Hierro Agar (TSI)**

Extracto de carne, 3 g

Extracto de levadura, 3 g

Peptona, 20 g

NaCl, 5 g

Lactosa, 10 g

Glucosa, 1 g

Citrato férrico, 0,3 g

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 0,3 g

Rojo Fenol, 0,025 g

Agar, 12 g

Agua destilada, 1000 ml

El medio se coloca en tubos y se solidifica en posición inclinada.

**Tween 20**

Solución de trabajo al 0,05%

**UVM Caldo**

Extracto de levadura, 5 g

Proteosa peptona, 5 g

NaCl, 20 g

Tripteina, 5g

Lab-Lemco Polvo, 5g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,35g

Esculina, 1 g

Acido Nalidíxico (2% en 0,1 M NaOH), 1ml

Clorhidrato de acriflavina, 12 mg

Agua destilada, 1000 ml

**Verde Brillante Agar (VB)**

Extracto de levadura, 3 g

Proteosa peptona, 10 g

NaCl, 5 g

Lactosa, 10 g

Sacarosa, 10 g

Rojo fenol, 80 mg

Verde brillante, 12,5 mg

Agar, 15 g

Agua destilada, 1000 ml

**ANEXO II: RECUENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS****Tabla II a:** Recuento (UFC/cm<sup>2</sup>) e identificación de los aislamientos obtenidos de salames de Colonia Caroya del invierno 2010.

Elaborador	Muestra	Aislamientos	Recuento MEA (UFC/cm <sup>2</sup> )	Recuento DG18 (UFC/cm <sup>2</sup> )
D	D1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	5,5 10 <sup>6</sup>	9,5 10 <sup>6</sup>
	D2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1,6 10 <sup>6</sup>	4,6 10 <sup>6</sup>
	D3	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	3,2 10 <sup>6</sup>	5 10 <sup>6</sup>
	D4	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	6,6 10 <sup>7</sup>	9 10 <sup>7</sup>
	D5	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	5,5 10 <sup>6</sup>	5,9 10 <sup>7</sup>
B	B1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6	4,8 10 <sup>7</sup>	5,4 10 <sup>7</sup>
		<i>M. racemosus</i>		
	B2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 1	5,4 10 <sup>7</sup>	1,6 10 <sup>8</sup>
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6		
	B3	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 3	4 10 <sup>6</sup>	1,1 10 <sup>7</sup>
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4		
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6		
<i>M. hiemalis</i>				
J	J1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 3	2,1 10 <sup>7</sup>	1,5 10 <sup>7</sup>
		<i>M. racemosus</i>		
	J2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6	5,5 10 <sup>6</sup>	8,3 10 <sup>6</sup>
		<i>P. brevicompactum</i>		
	J3	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	9,2 10 <sup>6</sup>	4,6 10 <sup>7</sup>
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6		
<i>P. brevicompactum</i>				
C	C1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	3,2 10 <sup>5</sup>	2,1 10 <sup>5</sup>
		<i>M. racemosus</i>		
	C2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1,8 10 <sup>6</sup>	1,7 10 <sup>7</sup>
		<i>S. candida</i>		
	C3	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1,5 10 <sup>7</sup>	9,3 10 <sup>6</sup>
		<i>M. racemosus</i>		
<i>S. candida</i>				
E	E1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6	6,3 10 <sup>6</sup>	1,8 10 <sup>7</sup>
		<i>P. simplicissimum</i>		
		<i>M. racemosus</i>		
	E2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1,2 10 <sup>6</sup>	3,6 10 <sup>6</sup>
	E3	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2,95 10 <sup>6</sup>	9,2 10 <sup>5</sup>

		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4		
G	G1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2,9 10 <sup>6</sup>	7,8 10 <sup>5</sup>
	G2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 1	1,1 10 <sup>6</sup>	1,1 10 <sup>6</sup>
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4		
	G3	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1,6 10 <sup>5</sup>	4,2 10 <sup>5</sup>
<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6				
F	F1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	8,5 10 <sup>6</sup>	1,2 10 <sup>6</sup>
	F2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 1	4,9 10 <sup>5</sup>	6,3 10 <sup>6</sup>
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4		
F3	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2,8 10 <sup>7</sup>	6,5 10 <sup>7</sup>	
H	H1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	7,9 10 <sup>6</sup>	1,2 10 <sup>7</sup>
	H2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 1	4,5 10 <sup>6</sup>	8,1 10 <sup>6</sup>
	H3	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	6,8 10 <sup>7</sup>	9,3 10 <sup>8</sup>
	H4	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1 10 <sup>5</sup>	1,2 10 <sup>6</sup>
<i>A. aculeatus</i>				
A	A1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	5,6 10 <sup>5</sup>	7,4 10 <sup>5</sup>
	A2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1,2 10 <sup>6</sup>	7,4 10 <sup>5</sup>
	A3	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1,6 10 <sup>8</sup>	8,9 10 <sup>7</sup>
		<i>S. candida</i>		
	A4	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	7,6 10 <sup>7</sup>	1,2 10 <sup>8</sup>
	A5	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2,3 10 <sup>7</sup>	6,8 10 <sup>7</sup>
A6	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 1	5,4 10 <sup>7</sup>	4,1 10 <sup>7</sup>	
I	I1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2,5 10 <sup>7</sup>	4,8 10 <sup>7</sup>
		<i>E. rubrum</i>		
	I2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1,3 10 <sup>7</sup>	2,1 10 <sup>7</sup>
	I3	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	Nd	Nd
	I4	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2,3 10 <sup>9</sup>	2,1 10 <sup>9</sup>
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4		
	I5	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6	Nd	5,4 10 <sup>7</sup>
	I6	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2,3 10 <sup>7</sup>	2,7 10 <sup>8</sup>
<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4				
<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6				

nd: no determinado

**Tabla II b:** Recuento (UFC/cm<sup>2</sup>) e identificación de los aislamientos obtenidos de salames de Colonia Caroya del invierno 2012.

Elaborador	Muestra	Aislamientos	Recuento MEA (UFC/cm <sup>2</sup> )	Recuento DG18 (UFC/cm <sup>2</sup> )
D	D1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	5 10 <sup>6</sup>	5 10 <sup>6</sup>
	D2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	9 10 <sup>7</sup>	9 10 <sup>7</sup>
B	B1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2,8 10 <sup>7</sup>	6,5 10 <sup>7</sup>
		<i>M. racemosus</i>		
	B2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2,1 10 <sup>7</sup>	nd
J	J1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	7 10 <sup>7</sup>	5,9 10 <sup>7</sup>
	J2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	8 10 <sup>7</sup>	7,5 10 <sup>6</sup>
<i>M. racemosus</i>				
C	C1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1,5 10 <sup>7</sup>	9,3 10 <sup>6</sup>
		<i>S. candida</i>		
		<i>M. racemosus</i>		
	C2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2 10 <sup>7</sup>	4,6 10 <sup>7</sup>
<i>M. racemosus</i>				
<i>P. simplicissimum</i>				
E	E1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1 10 <sup>7</sup>	nd
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4		
	E2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6	Nd	2,9 10 <sup>7</sup>
G	G1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	3,3 10 <sup>7</sup>	nd
	G2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	8,5 10 <sup>7</sup>	nd
<i>C. cladosporoides</i>				
H	H1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	6,8 10 <sup>7</sup>	9,3 10 <sup>8</sup>
	H2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2,3 10 <sup>7</sup>	6,8 10 <sup>7</sup>
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6		
<i>P. simplicissimum</i>				
A	A1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1,6 10 <sup>8</sup>	8,9 10 <sup>7</sup>
		<i>P. simplicissimum</i>		
	A2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2 10 <sup>8</sup>	1,2 10 <sup>8</sup>
<i>S. candida</i>				
I	I1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	5,47 10 <sup>7</sup>	4,1 10 <sup>7</sup>
	I2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2,5 10 <sup>7</sup>	4,8 10 <sup>7</sup>

**Tabla II c:** Recuento (UFC/cm<sup>2</sup>) e identificación de los aislamientos obtenidos de salames de Colonia Caroya del verano 2011.

Elaborador	Salame	Aislamientos	Recuento MEA (UFC/cm <sup>2</sup> )	Recuento DG18 (UFC/cm <sup>2</sup> )
B	B1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6	2,6 10 <sup>7</sup>	2,2 10 <sup>7</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
		<i>C.cladosporoides</i>		
		<i>M. racemosus</i>		
	B2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6	2,5 10 <sup>6</sup>	1,8 10 <sup>6</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
<i>M. racemosus</i>				
J	J1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	5,3 10 <sup>6</sup>	4,6 10 <sup>6</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
	J2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 1	2,6 10 <sup>7</sup>	1,46 10 <sup>7</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
C	C1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	9,6 10 <sup>6</sup>	8,1 10 <sup>6</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4		
	C2	<i>A. ochraceus</i>	7,6 10 <sup>6</sup>	5,9 10 <sup>6</sup>
E	E1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	4,7 10 <sup>6</sup>	8,2 10 <sup>6</sup>
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4		
		<i>P. fellutatum</i>		
		<i>A. ochraceus</i>		
	E2	<i>A. ochraceus</i>	2,5 10 <sup>7</sup>	9,98 10 <sup>6</sup>
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4		
G	G1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2,8 10 <sup>7</sup>	2,2 10 <sup>7</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
		<i>M. racemosus</i>		
		<i>P. implicatum</i>		
	G2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	2,3 10 <sup>7</sup>	1,03 10 <sup>7</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
		<i>C.cladosporoides</i>		
		<i>G. candidum</i>		
H	H1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	9,4 10 <sup>6</sup>	7,9 10 <sup>6</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
	H2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	9,2 10 <sup>7</sup>	3,7 10 <sup>8</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
A	A1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	6,4 10 <sup>6</sup>	1,08 10 <sup>7</sup>

		<i>A. ochraceus</i>		
	A2	<i>A. ochraceus</i>	$7,8 \cdot 10^7$	$5,03 \cdot 10^7$
I	I1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6	$1,06 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$
		<i>A. ochraceus</i>		
		<i>P. citreonigrum</i>		
	<i>M. racemosus</i>			
I2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	$2,3 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$	
	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6			
F	F1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	$1,1 \cdot 10^8$	$3,03 \cdot 10^8$
		<i>A. ochraceus</i>		
	F2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	$4,7 \cdot 10^6$	$1,03 \cdot 10^7$
		<i>A. ochraceus</i>		
		<i>P. citreonigrum</i>		
D	D1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	$4,25 \cdot 10^6$	$1,12 \cdot 10^7$
		<i>A. ochraceus</i>		
	D2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 1	$2,2 \cdot 10^6$	$1,8 \cdot 10^6$

**Tabla II d:** Recuento (UFC/cm<sup>2</sup>) e identificación de los aislamientos obtenidos de salames de Colonia Caroya del verano 2012.

Elaborador	Muestra	Aislamientos	Recuento MEA (UFC/cm <sup>2</sup> )	Recuento DG18 (UFC/cm <sup>2</sup> )
B	B1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	$4 \cdot 10^7$	$7,1 \cdot 10^7$
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6		
		<i>M. circinelloides</i>		
B2		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	$4 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^7$
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6		
		<i>M. circinelloides</i>		
J	J1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	$1,1 \cdot 10^8$	$7,6 \cdot 10^7$
		<i>A. ochraceus</i>		
	J2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	$1,8 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$
		<i>A. ochraceus</i>		
		<i>M. circinelloides</i>		
C	C1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	$3,6 \cdot 10^7$	$5,1 \cdot 10^7$
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4		
		<i>A. ochraceus</i>		
	C2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	$8,7 \cdot 10^7$	$5,5 \cdot 10^7$
<i>A. ochraceus</i>				
E	E1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	$8 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^6$

	E2	nd	1,5 10 <sup>7</sup>	1,8 10 <sup>7</sup>
G	G1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1,9 10 <sup>8</sup>	8,8 10 <sup>7</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
		<i>P. implicatum</i>		
	G2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	3,6 10 <sup>8</sup>	9,2 10 <sup>7</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
		<i>P. implicatum</i>		
H	H1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1,2 10 <sup>8</sup>	1,2 10 <sup>8</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
	H2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	7,2 10 <sup>8</sup>	6,5 10 <sup>8</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
A	A1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	4,7 10 <sup>8</sup>	5,2 10 <sup>8</sup>
		<i>C. cladosporoides</i>		
		<i>A. ochraceus</i>		
	A2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	4,7 10 <sup>8</sup>	5,2 10 <sup>8</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
I	I1	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	4,8 10 <sup>8</sup>	4,8 10 <sup>8</sup>
		<i>A. ochraceus</i>		
		<i>A. ochraceus</i>		
	I2	<i>P. nalgiovense</i> biotipo 4	1,6 10 <sup>8</sup>	2,3 10 <sup>8</sup>
		<i>P. nalgiovense</i> biotipo 6		
		<i>A. ochraceus</i>		
		<i>P. olsonii</i>		

nd: no determinada

**ANEXO III: SECUENCIAS CARGADAS EN EL GENBANK****Tabla III a:** Números de acceso de las secuencias cargadas en el GenBank correspondientes a cada aislamiento.

Aislamiento	Número de acceso GenBank	Secuencia
SCEM92	KC295422	ctttttttcgcgttgggatcaattgac aagtactaa ctggattacaggcaaaccat ctctggcgagcacggctctcgatggcgatggacagtaagttaacagtgat ggggattctggtgactacacgtctgatattgctaggtacaatggtacctccgacctcagctc gagcgtatgaacgtctactcaaccatgtgagtacaatgactgggaatcgatcaatcgtgcatca tctgatcggatgttttcttgataatctaggccagcggtgacaagtagtccccgtgccgttctggt cgattggagcccgtaccatggacgctgccgtccggtccctcggcaagcttttcgccccg acaactcgtctcggctcagtcgggtgctggaacaactgg
SCSU72	KC295423	ctttttttcgcgttgggatcaattgacaagtactaactggattacaggcaaaccatctctggcga gcacggctctcgatggcgatggacagtaagttaacagtgatggggattctggtggactacacgt ctgatattgctaggtacaatggtacctccgacctccagctcgagcgtatgaacgtctactcaa ccatgtgagtacaatgactgggaatcgatcaatcgtgcatcatctgatcggatgttttcttgataa tctaggccagcggtgacaagtagtccccgtgccgttctggtcgattggagcccgtaccatg gacgctgccgtccggtccctcggcaagcttttcgccccgacaactcgtctcggctcagtcgg gtgctggaacaactgg
SCR31	KC295424	ctttttttcgcgttgggatcaattgacaagtactaactggattacaggcaaaccatctctggcga gcacggctctcgatggcgatggacagtaagttaacagtgatggggattctggtggactacacgt ctgatattgctaggtacaatggtacctccgacctccagctcgagcgtatgaacgtctactcaa ccatgtgagtacaatgactgggaatcgatcaatcgtgcatcatctgatcggatgttttcttgataa tctaggccagcggtgacaagtagtccccgtgccgttctggtcgattggagcccgtaccatg gacgctgccgtccggtccctcggcaagcttttcgccccgacaactcgtctcggctcagtcgg gtgctggaacaactgg
SCLC101	KC295425	ctttttttcgcgttgggatcaattgacaagtactaactggattacaggcaaaccatctctggcgg cacggctctcgatggcgatggacagtaagttaacagtgatggggattctggtggactacacgtct gatattgctaggtacaatggtacctccgacctccagctcgagcgtatgaacgtctactcaacc atgtgagtacaatgactgggaatcgatcaatcgtgcatcatctgatcggatgttttcttgataatct aggccagcggtgacaagtagtccccgtgccgttctggtcgattggagcccgtaccatgga cgctgccgtccggtccctcggcaagcttttcgccccgacaactcgtctcggctcagtcgggt gctggaacaactgg
SCSU73	KC295426	ctttttttcgcgttgggatcaattgacaagtactaactggattacaggcaaaccatctctggcga gcacggctctcgatggcgatggacagtaagttaacagtgatggggattctggtggactacacgt ctgatattgctaggtacaatggtacctccgacctccagctcgagcgtatgaacgtctactcaa ccatgtgagtacaatgactgggaatcgatcaatcgtgcatcatctgatcggatgttttcttgataa tctaggccagcggtgacaagtagtccccgtgccgttctggtcgattggagcccgtaccatg

		gacgctgtccgctccggtccctcggcaagctttccgccccgacaactcgtctcggtcagtccg gtgctggaacaactgg
SCCEN63	KC295427	cttttttccgctgggtatcaattgacaagttactaactggattacaggcaaaccatctctggcga gcacggtctcgtatggcgtatggacagtaagtttaacagtgatggggattctggtggactacacgt ctgatatattgctaggtacaatggtacctccgacctccagctcgagcgtatgaacgtctactcaa ccatgtgagtacaatgactgggaatcgatcaatcgtgcatcatctgatcggatgttttcttgataa tctaggccagcggtgacaagtacgttccccggtccgttctggtcgattggagcccgggtaccatg gacgctgtccgctccggtccctcggcaagctttccgccccgacaactcgtctcggtcagtccg gtgctggaacaactgg
SCG81	KC295428	cttttttccgctgggtatcaattgacaagttactaactggattacaggcaaaccatctctggcga gcacggtctcgtatggcgtatggacagtaagtttaacagtgatggggattctggtggactacacgt ctgatatattgctaggtacaatggtacctccgacctccagctcgagcgtatgaacgtctactcaa ccatgtgagtacaatgactgggaatcgatcaatcgtgcatcatctgatcggatgttttcttgataa tctaggccagcggtgacaagtacgttccccggtccgttctggtcgattggagcccgggtaccatg gacgctgtccgctccggtccctcggcaagctttccgccccgacaactcgtctcggtcagtccg gtgctggaacaactgg
SCA52	KC295429	cttttttccgctgggtatcaattgacaagttactaactggattacaggcaaaccatctctggcga gcacggtctcgtatggcgtatggacagtaagtttaacagtgatggggattctggtggactacacgt ctgatatattgctaggtacaatggtacctccgacctccagctcgagcgtatgaacgtctactcaa ccatgtgagtacaatgactgggaatcgatcaatcgtgcatcatctgatcggatgttttcttgataa tctaggccagcggtgacaagtacgttccccggtccgttctggtcgattggagcccgggtaccatg gacgctgtccgctccggtccctcggcaagctttccgccccgacaactcgtctcggtcagtccg gtgctggaacaactgg
SC9/773	KC295430	cttttttccgctgggtatcaattgacaagttactaactggattacaggcaaaccatctctggcga gcacggtctcgtatggcgtatggacagtaagtttaacagtgatggggattctggtggactacacgt ctgatatattgctaggtacaatggtacctccgacctccagctcgagcgtatgaacgtctactcaa ccatgtgagtacaatgactgggaatcgatcaatcgtgcatcatctgatcggatgttttcttgataa tctaggccagcggtgacaagtacgttccccggtccgttctggtcgattggagcccgggtaccatg gacgctgtccgctccggtccctcggcaagctttccgccccgacaactcgtctcggtcagtccg gtgctggaacaactgg
SCCEN61	KC295431	cttttttccgctgggtatcaattgacaagttactaactggattacaggcaaaccatctctggcga gcacggtctcgtatggcgtatggacagtaagtttaacagtgatggggattctggtggactacacgt ctgatatattgctaggtacaatggtacctccgacctccagctcgagcgtatgaacgtctactcaa ccatgtgagtacaatgactgggaatcgatcaatcgtgcatcatctgatcggatgttttcttgataa tctaggccagcggtgacaagtacgttccccggtccgttctggtcgattggagcccgggtaccatg gacgctgtccgctccggtccctcggcaagctttccgccccgacaactcgtctcggtcagtccg gtgctggaacaactgg
SC9/782	KC295432	cttttttccgctgggtatcaattgacaagttactaactggattacaggcaaaccatctctggcga gcacggtctcgtatggcgtatggacagtaagtttaacagtgatggggattctggtggactacacgt ctgatatattgctaggtacaatggtacctccgacctccagctcgagcgtatgaacgtctactcaa

		ccatgtgagtacaatgactgggaatcgatcaatcgtgcatcatctgatcgatgttttcttgataa tctagggcagcggtgacaagtacgttccccgtgcccgttctggcgattggagcccgggtaccatg gacgctgcccgtccgtcccttcggaagctttccgccccgacaactcgtcttcggtcagtcgg gtgctgtaacaactgg
SCDA62	KC295433	cttttttctcggtgggtatcaattgacaagttactaactggattacaggcaaacctctctggcga gcacggctcgcgatggcgatggacagtaagtttaacagtgatggggattctggggactacacgt ctgatatattgctaggtacaatggtacctccgacctccagctcgagcgtatgaacgtctactcaa ccatgtgagtacaatgactgggaatcgatcaatcgtgcatcatctgatcgatgttttcttgataa tctagggcagcggtgacaagtacgttccccgtgcccgttctggcgattggag cccgtaccatggacgctgcccgtccgtcccttcggaagctttccgccccgacaactcgtc ttcggtcagtcgggtgctgtaacaactgg
SCG111	KC295434	cttttttctcggtgggtatcaattgacaagttactaactggattacaggcaaacctctctggcga gcacggctcgcgatggcgatggacagtaagtttaacagtgatggggattctggggactacacgt ctgatatattgctaggtacaatggtacctccgacctccagctcgagcgtatgaacgtctactcaa ccatgtgagtacaatgactgggaatcgatcaatcgtgcatcatctgatcgatgttttcttgataa tctagggcagcggtgacaagtacgttccccgtgcccgttctggcgattggagcccgggtaccatg gacgctgcccgtccgtcccttcggaagctttccgccccgacaactcgtcttcggtcagtcgg gtgctgtaacaactgg
SCSU71	KC295435	Ccacctcccaccggtgtataccgtacctgttgcttcggcgagcccgccccccttcttaggggtg gcacagcgcctgccggagacaccaactgtaaacactgtctgaagtttgcgtctgagtcgattgt atcgcaatcagttaaaactttcaacaatggatctcttggtccggcatcgtatgaagaacgcagcg aaatgcgataaataatgtgaattgcagaattcagtgatcatcagcttgaacgcacattgcac cccctggtattccgggggtatgcctgtccgagcgtattgctgccctcaagcacggctgtgtgtt gggtcgtcgtccccccgggggacgggcccgaaggcagcggcgccaccgctccggctct cgagcgtatgggctttgtacccgctctgtaggcccggccggctgctggccgacgctgaaaa gcaaccaatctatttcatcaggtgacctcggatcaggtaggatgccgctgaacttaagcata taa
SC9/772	KC295436	ccacctcccaccggtgtataccgtacctgttgcttcggcgagcccgccccccttcttaggggtg gcacagcgcctgccggagacaccaactgtaaacactgtctgaagtttgcgtctgagtcgattgt atcgcaatcagttaaaactttcaacaatggatctcttggtccggcatcgtatgaagaacgcagcg aaatgcgataaataatgtgaattgcagaattcagtgatcatcagcttgaacgcacattgcac cccctggtattccgggggtatgcctgtccgagcgtattgctgccctcaagcacggctgtgtgtt gggtcgtcgtccccccgggggacgggcccgaaggcagcggcgccaccgctccggctct cgagcgtatgggctttgtacccgctctgtaggcccggccggctgctggccgacgctgaaaa gcaaccaatctatttcatcaggtgacctcggatcaggtaggatgccgctgaacttaagcata taa
SCDA71	KC295437	ccacctcccaccggtgtataccgtacctgttgcttcggcgagcccgccccccttcttaggggtg gcacagcgcctgccggagacaccaactgtaaacactgtctgaagtttgcgtctgagtcgattgt atcgcaatcagttaaaactttcaacaatggatctcttggtccggcatcgtatgaagaacgcagcg aaatgcgataaataatgtgaattgcagaattcagtgatcatcagcttgaacgcacattgcac

		cccctggtattccggggggtatgcctgtccgagcgtcattgctgccctcaagcacggctgtgtgtt gggtcgtcgtccccccgggggacgggcccgaaggcagcggcgccaccgctccggtcct cgagcgtatggggctttgtacccgctctttaggcccggccggctgtggccgacgctgaaaa gcaaccaatctatttcatcaggttgacctcggatcaggtagggatacccgctgaacttaagcata tcaa
SCV71	KC295438	ccacctcccaccggtataaccgtacctgttgcttcggcgagcccggcccccttcttaggggtg gcacagcgtcgcgggagacaccaacgtgaacactgtctgaagtttgcgtctgagtcgattgt atcgcaatcagttaaaactttcaacaatggatctcttggtccggcatcgtgaagaacgcagcg aaatgcgataaataatgtgaattgcagaattcagtgatcatcagctttgaacgcacattgcac cccctggtattccggggggtatgcctgtccgagcgtcattgctgccctcaagcacggctgtgtgtt gggtcgtcgtccccccgggggacgggcccgaaggcagcggcgccaccgctccggtcct cgagcgtatggggctttgtacccgctctttaggcccggccggctgtggccgacgctgaaaa gcaaccaatctatttcatcaggttgacctcggatcaggtagggatacccgctgaacttaagcata tcaa
SCEM91	KC295439	ccacctcccaccggtataaccgtacctgttgcttcggcgagcccggcccccttcttaggggtg gcacagcgtcgcgggagacaccaacgtgaacactgtctgaagtttgcgtctgagtcgattgt atcgcaatcagttaaaactttcaacaatggatctcttggtccggcatcgtgaagaacgcagcg aaatgcgataaataatgtgaattgcagaattcagtgatcatcagctttgaacgcacattgcac cccctggtattccggggggtatgcctgtccgagcgtcattgctgccctcaagcacggctgtgtgtt gggtcgtcgtccccccgggggacgggcccgaaggcagcggcgccaccggtccggtcctc gagcgtatggggctttgtacccgctctttaggcccggccggctgtgtggccgacgctgaaaag caaccaatctatttcatcaggttgacctcggatcaggtagggatacccgctgaacttaagcatat caa
SCLC71	KC295440	ccacctcccaccggtataaccgtacctgttgcttcggcgagcccggcccccttcttaggggtg gcacagcgtcgcgggagacaccaacgtgaacactgtctgaagtttgcgtctgagtcgattgt atcgcaatcagttaaaactttcaacaatggatctcttggtccggcatcgtgaagaacgcagcg aaatgcgataaataatgtgaattgcagaattcagtgatcatcagctttgaacgcacattgcac cccctggtattccggggggtatgcctgtccgagcgtcattgctgccctcaagcacggctgtgtgtt gggtcgtcgtccccccgggggacgggcccgaaggcagcggcgccaccgctccggtcct cgagcgtatggggctttgtacccgctctttaggcccggccggctgtgtggccgacgctgaaaa gcaaccaatctatttcatcaggttgacctcggatcaggtagggatacccgctgaacttaagcata tcaa

**ANEXO IV: FICHA TÉCNICA DMC PROTECT**

DOMCA  
 Camisa de Jerez s.l.  
 18620 (Alhendin) Granada, ESPAÑA  
 Tel +34-958-376486 Fax +34-958-376389  
 E-mail : [politecnico@domca.com](mailto:politecnico@domca.com)  
 Pág. web : [www.domca.com](http://www.domca.com)

FICHA TÉCNICA  
 23.01.02 Vers.: 0.

<b>PRODUCTO</b>	:	<b>DMC PROTECT</b>
<b>CODIGO</b>	:	00000058 (A1VP001)
<b>APLICACIÓN</b>	:	Pintura fungicida - bactericida - algicida para interiores. Especial para la protección microbiológica de paredes en cámaras frigoríficas, secaderos, salas de manipulación y de embalaje de alimentos. ... Sin disolventes orgánicos, inodora y no inflamable.
<b>COMPOSICION</b>	:	Copolímeros vinílicos, cargas inorgánicas, colorante (dióxido de titanio), biocidas.
<b>DISOLUCION</b>	:	1ª mano : - 70:30 (Protect:Agua) para cemento. - 50:50 (Protect:Agua) para yeso. 2ª mano : - 95:5 (Protect:Agua) para cemento. - 80:20 (Protect:Agua) para yeso. A mayor absorción de la superficie, mayor grado de dilución.
<b>LIMPIEZA Y DILUCION</b>	:	Agua.
<b>TIEMPO DE SECADO</b>	:	A 20°C, secs en 3 horas. Intervalo entre dos aplicaciones : 12 horas
<b>RENDIMIENTO</b>	:	7 - 12 m <sup>2</sup> por litro y aplicación, dependiendo de la porosidad de la superficie.
<b>T° DE APLICACIÓN</b>	:	5 - 30 °C

Esta información sirve a título orientativo. Elabores cualquier responsabilidad si el producto no se utiliza adecuadamente.  
 Documento sujeto a cambio sin previo aviso.

Página 1 de 2

00000058

ENVASE : Cubos 25 Kg. (00300056)

**ESPECIFICACIONES FISICO-QUIMICAS:**

Contenido en sólidos (120°C,1h)	53 - 57 %
Viscosidad (Brookfield LVDV-I+sp 4,60 min <sup>-1</sup> )	3000-6000 cp
pH	6.0 - 7.0

R.S.I : 39.1656/GR

**NORMATIVA:**

- RD. 115/2003, de 31 de enero, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo.
- Real Decreto 142/2002: Lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios.
- Directiva 95/0/CE del Parlamento Europeo y del Consejo: Aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes; sus modificaciones en la Directiva 98/73/CE y en la Directiva 2001/5/CE.
- RD. 2001/1995, de 7 de diciembre, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos colorantes autorizados para el uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización, publicado en el BOE número 19, de fecha 22 de enero de 1996 y posteriores modificaciones.

Esta información se da a título orientativo. Eliminamos cualquier responsabilidad si el producto no se utiliza adecuadamente.  
Documento sujeto a cambio sin previo aviso.

Página 2 de 2

000000000000

**Figura IV a:** Ficha técnica del DMC Protect.