UNSAM

Tesis de Maestría

“Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de la población fúngica de embutidos secos fermentados de las principales localidades productoras de la República Argentina “

Lic. Graciela Vila

Directora: Dra Graciela N. Pose
Co-directora: Dra Vanesa Ludemann

2015

A mis padres.....

Agradecimientos:

Son muchos los que de una u otra manera colaboraron en la concreción de éste sueño que luego de un largo recorrido se cumple y a quienes estoy agradecida:

-A la Dra Graciela Pose por guiarme, transmitirme su experiencia, confiar en mi capacidad, compartir alegrías y frustraciones, pero especialmente por permitirme expresar mis ideas con libertad.

-A la Dra Vanesa Ludemann por su acompañamiento y su guía. Un ser especial a quien aprendí a querer.

-Al Ing. Juan Segura por su colaboración en el procesamiento de datos y especialmente por la buena onda.

-A la Ing. Mariana Greco, mi compañera incondicional en los momentos difíciles, esos en los cuales las fuerzas se acaban……..gracias Marianita!!!!

-A mis queridas amigas Ale, Mary y Norma que siempre tuvieron la palabra justa en el momento adecuado para impulsarme a seguir.

-A mi hermana por el aguante diario.

-A Minna y Alejandro por sus consejos.

-A la Dra Semorile mi referente en el área de Microbiología General.

-A la Universidad Nacional de Quilmes por permitirme el uso del laboratorio de Micología de alimentos.

-A la Universidad Nacional de Río Negro con sede en Villa Regina (Río Negro) por permitirme el uso de su laboratorio de Biología Molecular.

-A mi curiosidad y mi constancia……

Índice

Indice

Resumen 1

Introducción 5

1. Los embutidos 5
   1.1 Origen de los embutidos secos fermentados

1.2 Tecnología de su elaboración 10

1.2. a) Embutido 11

1.2. b) Fermentación 13

1.2. c) Maduración 13

1.3 Aspectos microbiológicos de la elaboración de embutidos secos 14
fermentados artesanales

1.3. a) Microflora 14

1.3. b) Micoflora superficial 15

1.3. b) (1) Hongos y levaduras 16

1.3.b) (2) Producción de Metabolitos secundarios 18

1.4 El género *Penicillium* 19

1.4. a) Características generales del género *Penicillium* 19

1.4. b) Subgénero *Penicillium* 22

1.4. b) (1) Su interacción con el hombre 25

1.4.b) (2) Producción de Micotoxinas 26

1.4. c) *Penicillium nalgiovense* 27

1.5 Caracterización de las poblaciones Fúngicas 29

1.5.a) Marcadores en estudios de diversidad genética 29

1.5. a.(1) Marcadores Fenotípicos 30

1.5. a(2) Marcadores Moleculares 31

1.5. a. (2) (i) Bioquímicos 31

1.5. a (2) (ii) Genéticos 36

1.6) Caracterización del área de estudio 42

1.6) (a) Centros productivos de Embutidos secos fermentados en Argentina 42

Objetivo General 45

Capítulo I: **"*Caracterización morfológica de la Micobiota superficial de Embutidos Secos Fermentados Artesanales de diferentes localidades productoras de Argentina"***

Objetivo 46

I.1 Materiales y Métodos 47

I.1. a) Caracterización Climática y Biogeográfica de las localidades de estudio. 47

I.1.b) Muestreo 47

I.1. c) Caracterización Morfológica de la micobiota del emplume de las muestras de embutidos secos fermentados artesanales 48

I.1 c) (I) Características de las muestras 48

I.1 c) (II) Recuento total de hongos filamentosos y levaduras sobre la superficie de los embutidos 49

I.1 c) (III) Identificación de géneros fúngicos y recuento por géneros 50

I.1 c) (IV) Aislamiento e identificación de especies fúngicas y recuento por especie 50

I.1 c) (V) Determinación de Biotipos de *Penicillium nalgiovense* 53

I.1 d) Conservación de los aislamientos. 55

I.2 Resultados y discusión 56

I. 2 a) Caracterización Climática y Biogeográfica de las regiones de estudio. 56

Ubicación geográfica.

I.2 (b) Muestreo 56

I.2 c) Caracterización Morfológica de la micobiota del emplume de las muestras de embutidos secos fermentados artesanales 60

I.2 c) (I) Características de las muestras 60

I.2 c) (II) Recuento total de hongos filamentosos y levaduras sobre la superficie de los embutidos 61

I.2 c) (III) Identificación de géneros fúngicos y recuento por géneros. 66

I.2 c) (IV) Aislamiento e identificación de especies fúngicas y recuento por especie. 71

I.2 c) (V) Determinación de Biotipos de *Penicillium nalgiovense* 87

Capítulo II: ***"Caracterización bioquímica de las poblaciones de P. nalgiovense que colonizan la superficie de Embutidos Secos Fermentados Artesanales"***

Objetivo 91

II. 1 Materiales y Métodos 92

II. 1 a) Crecimiento y recuperación de Micelios. 92

II. 1 b) Obtención del extracto proteico y determinación de la concentración de proteínas. 92

II. 1 c) Obtención de perfiles de isoenzimas 96

II. 1 c) (I) Perfil de α-Esterasa (α-EST. EC: 3.1.1) 103

II. 1 c) (II) Perfil de Malato deshidrogenasa dependiente de NADP+ (MADPH. EC: 1.1.1.40) 104

II. 1 c) (III) Perfil de Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT. EC 2.6.1.1) 105

II. 1 c) (IV) Perfil de Superóxido Dismutasa (SOD. EC 1.15.1.1) 105

II. 1 c) (V) Perfil de Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH) EC 1.1.1.49 106

II. 1 e) Comparación de perfiles de isoenzimas por localidad 106

Resultados y discusión 107

II. 2 a) Crecimiento y recuperación de Micelios 107

II.2 b) Obtención del extracto proteico y determinación de la concentración de proteínas 107

II. 2 c) Obtención de perfiles de Isoenzimas 107

II. 2 c) (I) Perfiles de α-Esterasa: 107

II. 2 c) (II) Perfil de Malato dehidrogenasa dependiente de NADP+ (MADPH. EC: 1.1.1.40) 116

II. 2 c) (III) Perfil de Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT) 125

II. 2 c) (IV) Perfil de Superóxido Dismutasa (SOD. EC 1.15.1.1) 131

II. 2 c) (V) Perfil de Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH) EC 1.1.1.49 131

II. 2 e) Comparación de perfiles de isoenzimas por localidad 131

***Capítulo III**: "Caracterización genética de poblaciones de Penicillium nalgiovense que colonizan la superficie de Embutidos Secos Fermentados Artesanales"*

Objetivo 135

III. 1 Materiales y métodos 136

III. 1 a) Crecimiento y Obtención de micelios 136

III. 1 b) Extracción de ADN genómico 136

III. 1 c) Calidad del ADN extraído 137

III. 1 d) Cuantificación del DNA extraído 138

III.1 e) Conservación del ADN 139

III. 1 f) Confirmación de Identidad de los aislamientos de *P. nalgiovense* 140

III. 1 g) Caracterización Genética de aislamientos de *P. nalgiovense* por SRAP-PCR 143

III. 2 Resultados y discusión 150

III. 1 f) Confirmación de Identidad de los aislamientos de *P. nalgiovense* 150

III. 2 g) Caracterización Genétca de aislamientos de P. nalgiovense por SRAP-PCR 154

Conclusiones 161

Bibliografía 164

Anexos 174

Anexo I: Medios de Cultivo y soluciones 175

Anexo II: Claves de Identificación 179

Anexo III: Aislamientos 184

Anexo IV: Concentración de proteínas en Extractos 188

Anexo V: Presentaciones a Congresos 189

Resumen

Resumen

En Argentina Los embutidos secos fermentados artesanales se elaboran desde el siglo XIX, momento en el cual surgieron diversos centros productivos en la Pampa Húmeda, como resultado de la inmigración especialmente de Italia. Así encontramos localidades en las provincias de Córdoba, Buenos Aires y La Pampa que se caracterizan por la producción de salames artesanales de calidad, con un perfil sensorial distintivo, que es el resultado de sus condiciones de manufactura.

Durante el proceso de secado de los salames, determinados hongos colonizan la superficie de la tripa. El desarrollo de los mismos constituye, por un lado uno de los factores que contribuyen a determinar el perfil sensorial del salame y por otro lado un indicador de las condiciones ambientales en los que se desarrolla el proceso de maduración. En la elaboración artesanal del salame, la fuente tradicional de estos hongos es la micoflora natural del ambiente.

El presente trabajo consistió en caracterizar morfológica, bioquímica y molecularmente la micoflora que coloniza los embutidos secos fermentados artesanales de las siguientes localidades productoras de Argentina: Colonia Caroya y Oncativo en la Provincia de Córdoba, Tandil y Mercedes en la Provincia de Buenos Aires, Jacinto Arauz, Alpachiri, Colonia Barón, General Campos, Santa Rosa en la Provincia de La Pampa.

Para la caracterización morfológica se realizó el aislamiento de hongos filamentosos y levaduras a partir de la micobiota superficial de 79 muestras de salames. La identificación de los aislamientos de hongos filamentosos a nivel de género se realizó siguiendo las claves de Samson y col. (1994) y a nivel de especie de acuerdo a Pitt y Hocking (2001).

Se obtuvieron un total de 196 aislamientos de hongos filamentosos, el género *Penicillium* representa en el 68% de los mismos, seguido por los géneros: *Mucor, Aspergillus, Cladosporium y Scopulariopsis*. Del total de especies identificadas *P. nalgiovense* corresponde a la especie más frecuente (55%) seguido por *Mucor racemosus, Aspergillus ochraceus y Cladosporium cladosporoides.*

Fueron evaluados los biotipos *de P. nalgiovense* acorde a Fink, Gremmels y col. (1988). El análisis morfológico de los aislamientos de *P. nalgiovense* indica la predominancia del Biotipo 4 en Colonia Caroya, Oncativo y Tandil, mientras que en La Pampa y Mercedes predomina el biotipo 1. Ambos biotipos confieren a la superficie del producto una coloración turquesa pareja, característica de los embutidos artesanales.

Posteriormente se realizó la caracterización molecular de los aislamientos de *P. nalgiovense* de cada localidad, usando Isoenzimas como marcadores bioquímicos y SRAP- PCR como marcador genético.

Para obtener los extractos proteicos a partir de los cuales se evaluaron diferentes sistemas de Isoenzimas, fueron inoculadas suspensiones de esporas en medio de crecimiento de micelios. El micelio recuperado por filtración, luego de 7 días de incubación a 25°C y 150 rpm fue molido en buffer BPP y el homogenato centrifugado a fin de recuperar el sobrenadante conteniendo las proteínas. Las mismas fueron separadas por medio de geles de poliacrilamida discontinuos verticales no desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Se evaluó la presencia en los extractos de α-Esterasas (EST EC:3.1.1.1), Malato deshidrogenasa (MDHP E.C 1.1.1.4), Glutamato

Oxalacetato Transaminasa (GOT EC: 2.6.1.1), Superóxido Dismutasa (SOD EC: 1.15.1.1) y Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH EC 1.1.1.49).

A partir de los datos obtenidos en los geles de α- EST se encontraron 19 bandas de diferente movilidad electroforética. El polimorfismo observado permitió predecir la existencia de variabilidad intraespecífica entre los aislamientos considerados. No se observó polimorfismo en las bandas correspondientes a MDH y GOT. Las enzimas SOD y G6PDH no revelaron bandas.

Las bandas obtenidas a partir de cada uno de los zimogramas fueron utilizadas para elaborar una matriz de datos en la cual se tomó como valor 1: presencia de la banda y valor 0: ausencia de la banda. A partir de ésta matriz de datos presencia-ausencia se obtuvo una matriz de similitud por Coeficiente de Jaccard. Del análisis de agrupamiento por UPGMA de dicha matriz surgen dos grupos: uno con aislamientos de las localidades de Colonia Caroya y Oncativo (ambos de la Provincia de Córdoba) y otro grupo con los aislamientos correspondientes a las localidades de Tandil y Mercedes en la provincia de Buenos Aires y los aislamientos de las localidades de la provincia de La Pampa,

Por último se realizó la caracterización utilizando marcadores genéticos. Se extrajo el ADN genómico de micelios crecidos en MEA durante 7 días a 25°C por medio del kit DNeasy Plant Mini (QIAGEN).

En primer lugar se confirmó la identificación de los aislamientos de *P. nalgiovense* por amplificación por PCR de secuencias conservadas de ADN ribosomal que comprenden el gen que codifica para la subunidad 5,8S y las secuencias de los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS4.

De ésta manera se confirmó en un 99,9%, la identificación de los aislamientos de *P. nalgiovense*, que previamente fue realizada por técnicas tradicionales.

Una vez confirmada la identificación se utilizó como marcador genético de variabilidad intraespecífica la técnica de SRAP-PCR, la misma fue utilizada como una primer aproximación para verificar su aplicabilidad en aislamientos de *P. nalgiovense*.

Se probaron un total de 17 combinaciones de pares de primers, de los cuales 4 amplificaron fragmentos. Fueron reveladas un total de 10 bandas polimórficas en los 18 aislamientos testeados. El dendrograma resultante del análisis de los fragmentos sobre 5 aislamientos seleccionados por su patrón de bandas, uno para cada localidad, muestra la existencia de dos grupos de aislamientos: el Grupo I constituido por aislamientos provenientes de las localidades de Colonia Caroya y Tandil (conformando el subgrupo IA) y Oncativo. (subgrupo IB). El Grupo II formado por aislamientos de Mercedes y La Pampa.

Similar análisis realizado sobre un mayor número de aislamientos no permitió la caracterización por localidad.

El presente trabajo permitió caracterizar desde un punto de vista polifásico las poblaciones fúngicas que constituyen el emplume de los embutidos secos fermentados artesanales de la República Argentina.

Introducción

INTRODUCCIÓN

1. Los Embutidos

1.1. Origen de los embutidos secos fermentados:

La humanidad ha intentado desarrollar técnicas de conservación de alimentos desde que la mayor parte de las poblaciones basaron su alimentación en productos perecederos como la carne, el pescado y las aves. El procesamiento de las carnes tuvo sus orígenes en tiempos prehistóricos. La técnica de picar la carne fue el primer paso hacia la elaboración de productos de carne estructurados, el segundo paso fue el descubrimiento de que la carne podía conservarse si se la envasaba en una tripa animal y luego se la secaba.

Es posible que se hayan rellenado vejigas, piel, cuero o huesos largos con carne picada u otros alimentos para luego exponerlos al secado o ahumado. El uso de la sal como conservante se encuentra documentado desde el año 2670 a.C en China.

La fermentación es probablemente uno de los procesos biotecnológicos más antiguos que se conocen. En el año 589 a.C se desarrolló un producto que contenía trozos de carne de oveja, sal, azúcar y cebolla empacados en tripas de animales y conservado por fermentación. En la época romana ya aparecen algunos embutidos llamados “botulus o botellos” y que han dado lugar en la época actual a los botelos o botillos de Galicia, Asturias y León en España. (Savic Z y col., 2010).

El arte de fabricar embutidos utilizando intestinos de animales sobrevivió a la caída del imperio romano y continuó a lo largo de la Edad Media. Debido al auge de la industria del chacinado, el comercio de las tripas saladas se convirtió en una mercancía de importancia a lo largo del sur y centro de Europa. Alrededor del año 1300 d.C, el poeta Johannes Hadlaub señaló que el pueblo alemán valoraba las comidas con carne en especial los embutidos. En el año 1600 ciudades como Nüremberg, Munich y Viena compitieron en la elaboración del embutido más largo.

Según registros históricos los primeros embutidos fermentados, similares a nuestros actuales salames fueron fabricados en Italia en el año 1700.

La carne vacuna y de cerdo era cortada en trozos pequeños, sazonada con sal y especias y luego embutidas en recipientes flexibles (generalmente tripa de cerdo u oveja) para facilitar su almacenamiento. Finalmente se las colgaba al aire para permitir su secado. De esta manera se conseguía retardar el deterioro ocasionado por diferentes tipos de microorganismos. Nace así el "Salami" (del latín: sale, sal).

Con la revolución industrial en los siglos XVIII y XIX se evidenciaron grandes mejoras en la conservación y el procesamiento de la carne, surgen técnicas que permiten la deshidratación, secado y el ahumado en países como Alemania, Suiza, Dinamarca, Holanda y países nórdicos (Murcia J., 2012)

En nuestro país, por su parte, la evolución histórica de la industria de conservación de carnes puede dividirse en tres grandes etapas: "Época de las vaquerías" (espacios de reserva de ganado) entre los años 1600 al 1800; "Época de los Saladeros" (establecimiento fabril destinado a producir carne salada y seca conocida como tasajo o cecina y el charque o charqui) abarcando prácticamente todo el siglo XIX; y la "Época de los Frigoríficos" en la que se produce una transformación revolucionaria en el proceso de conservación de las carnes sustituyendo la sal por el frío artificial (Giberti H., 1985).

En 1873, se efectuó por primera vez en la República Argentina un embarque de carnes frescas utilizando el sistema de frío artificial recientemente inventado por Charles Tellier.

La evolución histórica de la industria de chacinados tiene relación directa con ese método de conservación de las carnes. Y es justamente en esa época en que nace dicha industria en la Argentina.

Los jamones y salchichones con los que las familias agasajaban a los invitados a las fiestas religiosas comenzaron a comercializarse en épocas de baja producción de carnes, con una aceptación del público inmediata, convirtiéndose al comienzo del siglo XX en una industria con procesos bien específicos, que la diferencian de la frigorífica propiamente dicha, y conquistando un mercado muy amplio y exigente.

Su propósito fundamental es el de transformar la carne en nuevos productos con alto valor agregado: los chacinados y salazones, utilizando distintos procedimientos de elaboración y conservación. La industria de los Productos Chacinados en nuestro país se divide en Embutidos y No embutidos con diferentes características de elaboración (Tabla 1)

<table>
<tr>
<td>
Embutidos frescos:

• Chorizo criollo (parrillero)
• Longaniza parrilleras
• Salchichas frescas

Embutidos secos:

• Salamín picado fino y grueso
• Salamín tipo suizo
• Salames de Milán
• Salame Porteño
• Longanizas Española
• Longaniza Calabresa
• Longaniza Napolitana
• Longaniza Húngara ahumada
• Sopresatta.

Embutidos cocidos:

• Salchichones (con jamón, primavera, de carne, de hígado)
• Mortadelas
• Salchichas tipo Viena (ahumada o no)
• Salchichas de copetín (ahumada o no)
</td>
<td>

</td>
</tr>
<tr>
<td>
No embutidos cocidos

• Matambre
• Arrollado vacuno
• Arrollado porcino
• Cima rellena
• Queso de cerdo
• Lechón arrollado
• Pasta de hígado
• Fantasía
• Galantina
• Pata de cerdo rellena.
• Fiambre cocido de Pata de cerdo.
• Fiambre cocido de Paleta de cerdo.
• Fiambre cocido de Lomo de para emparedados.

No embutidos frescos:

• Hamburguesas
• Empanados.
</td>
<td>

</td>
</tr>
</table>

Tabla 1: Tipos de embutidos. Fuente: CAICHA en base a datos de SENASA

Esta gran cantidad de variantes en los productos nacionales es su característica más notable y es la que le reviste de la importancia económica que hoy posee. En cuanto a la comercialización mas del 99.5% de la producción de chacinados durante el año 2011 se destino a consumo interno y el resto a exportaciones, por lo que el mercado a nivel internacional no ha sido explotado en la medida en que se realiza en otros países (Figura 1).

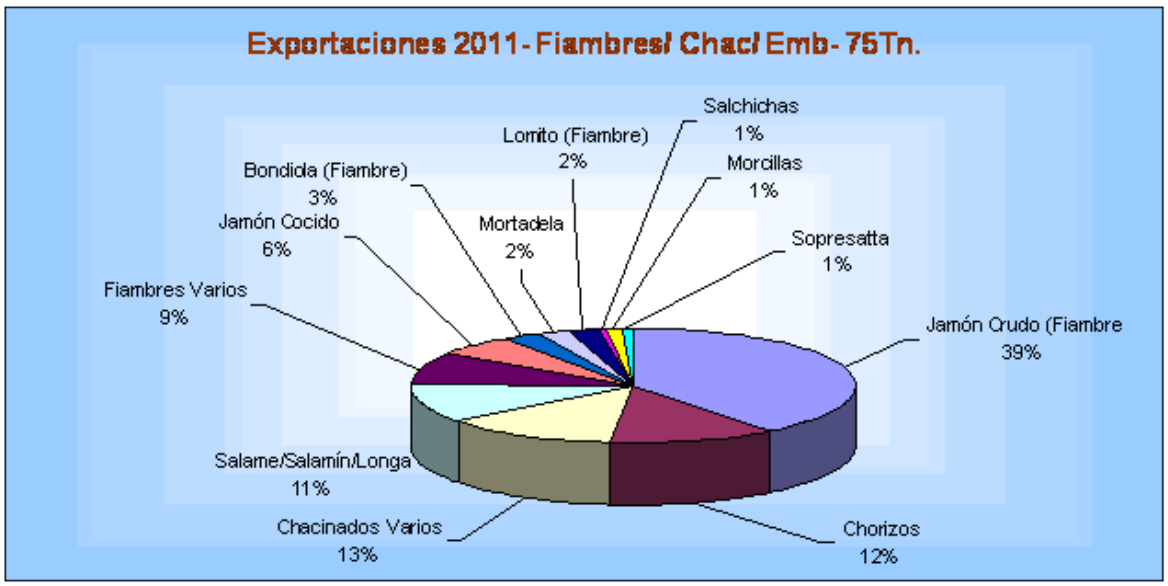


Figura 1: Producción de chacinados durante el año 2011. Fuente: CAICHA en base a datos de SENASA

Actualmente los embutidos se desarrollan en cada región o país con técnicas propias tradicionales que se combinan con técnicas modernas de conservación, para aumentar la calidad del producto conservando su tradición artesanal.

1.2 Tecnología de su elaboración:

Según el Código Alimentario Argentino (C.A.A) se entiende por Embutidos secos, aquellos embutidos crudos que han sido sometidos a un proceso de deshidratación parcial para favorecer su conservación por un lapso prolongado (C.A.A. Cap VI, Art 306)

Con el nombre genérico de Salame, se entiende el embutido seco, elaborado sobre la base de carne de cerdo o carne de cerdo y vacuno, con el agregado de tocino, sal, salitre, especias, vino blanco y azúcar (C.A.A. Cap VI, Art 338).

El salame es elaborado con carne de vaca y cerdo picada, azúcar, nitrito de sodio, sal, especias y condimentos. Las especias, los aditivos, el azúcar y la sal suelen agregarse a la masa básica de carne y grasa picadas, la mezcla se homogeniza para distribuir adecuadamente y en forma pareja los componentes. La a_w de la masa se reduce de 0,90 a 0,96 por la presencia de sal, los agentes de curado, azúcares y nitritos ejercen su efecto inhibidor.

El producto obtenido es posteriormente sometido a los siguientes procesos (Figura 2)

- Embutido
- Fermentado
- Maduración y secado.

1.2. a) Embutido.

El embutido se realiza en máquinas de vacío. La mezcla obtenida a partir de la materia prima se mantiene a una temperatura inferior a 20°C, lo cual influye en la consistencia del producto final. Si la mezcla se calienta demasiado, la refrigeración insuficiente o deficiente de la misma provoca que las partículas de grasa se dispongan alrededor de la carne magra y el resultado es un embutido muy blando. También resulta perjudicada la cesión de agua al exterior del producto durante la desecación, ya que la grasa de distribuye en forma de película en la superficie del embutido (Colmenero F y col. 1989).

Al embutir se pueden usar tripas naturales o sintéticas; en ambos casos, deben permitir la difusión de agua desde el interior de la pieza, y deben adaptarse a los cambios de tamaño del embutido durante el proceso madurativo, debidos a la deshidratación. Cuanto mayor sea el calibre, más lenta es la pérdida de agua y, por ende, más lenta la adquisición de la consistencia típica, el centro del embutido presentará menor deshidratación, en tanto que la parte externa contendrá menos agua. En embutidos de calibre estrecho la pérdida de agua es más uniforme.

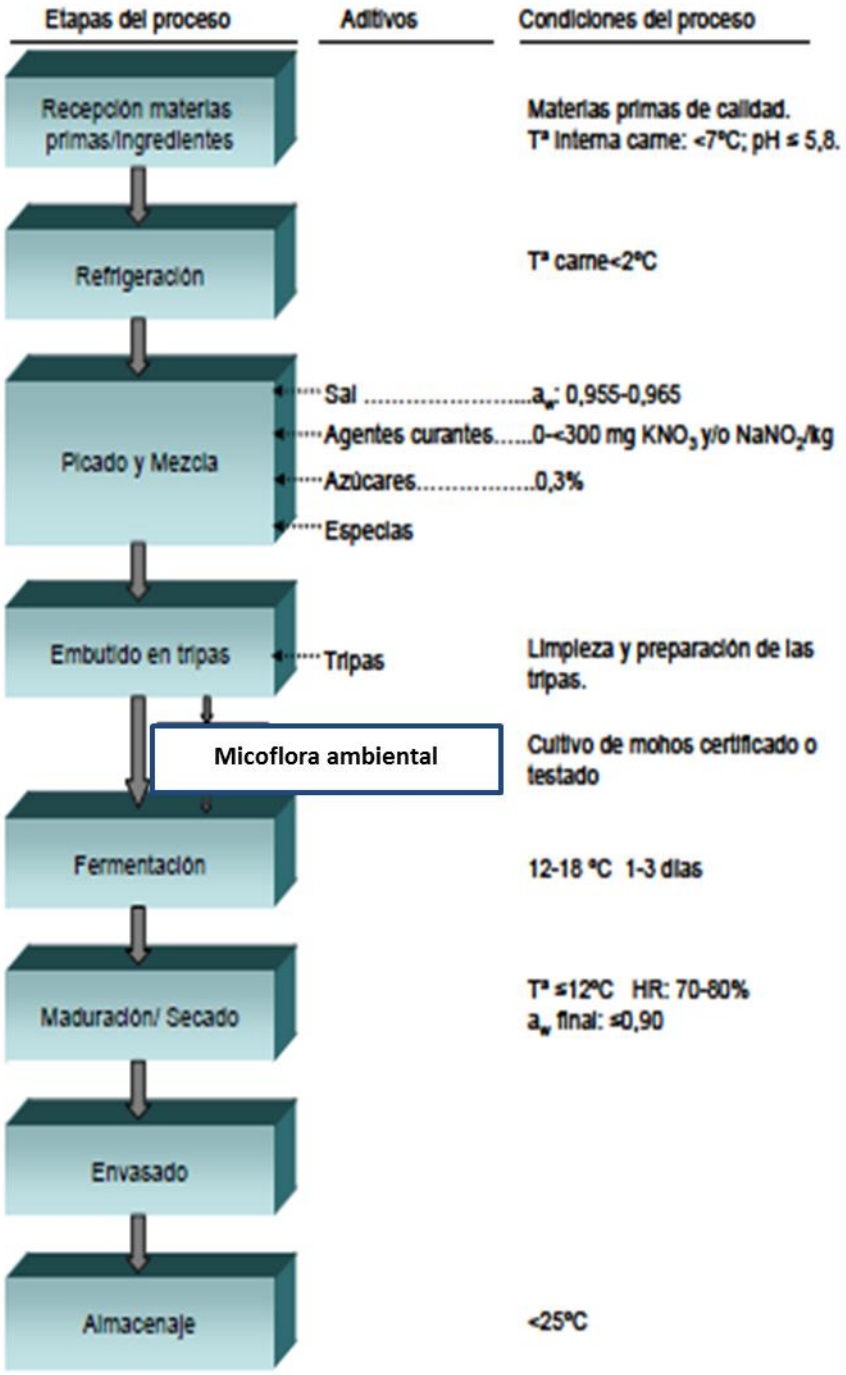


Figura 2: Diagrama de flujo de la elaboración de un embutido seco fermentado. Adaptado de Lücke (1998)

1.2. b) Fermentación

Una vez embutidos se cuelgan en cámaras de fermentación bajo condiciones de temperatura y humedad controladas: la humedad debe ser al comienzo de un 90-95% por un período de tiempo de 24 a 72 hs para luego descender a 85% favoreciendo sólo el crecimiento de microorganismos deseables. La temperatura debe oscilar entre los 20°C-25°C. Durante ésta etapa los microorganismos, presentes en la carne o adicionados como starters, metabolizan los azúcares a ácido láctico disminuyendo el pH a valores cercanos a 5.0, lo que reduce la capacidad de retención de agua de la mezcla, facilitando el secado posterior. Ambos aspectos varían en embutidos elaborados artesanalmente teniendo en cuenta las características particulares de la región de producción.

Junto con la fermentación de azúcares, las proteínas se degradan a péptidos por acción de las proteasas, aumentando el nitrógeno no proteico y se inicia la lipólisis por acción de lipasas microbianas y endógenas de la carne (Colmenero F. y col., 1989).

1.2. c) Maduración:

Una vez transcurrido el tiempo de fermentación (48-72hs), los embutidos se trasladan a cámaras de curado donde empiezan los procesos de maduración y secado de los embutidos. Nuevamente se controlan las condiciones de humedad, temperatura ambiental y velocidad del aire. Estos parámetros varían según la consistencia (semiduro o duro) que se quiera obtener en el producto. Para los embutidos secos se utilizan 10-17°C de temperatura, con una humedad relativa de 65-80% y 1 m/s la velocidad del aire en la cámara. Estas condiciones aseguran que el producto

madure de manera homogénea y sin defectos de secado en su superficie (Demeyer D.,2004).

Durante el proceso de maduración se produce una fuerte deshidratación y se adquiere la textura típica del producto. Se reduce la actividad de agua, lo que disminuye de manera notable el desarrollo bacteriano y favorece el desarrollo de hongos superficiales. Paralelamente a los procesos de deshidratación continúan los procesos de proteólisis, iniciados en la fermentación, lo que enriquece la fracción de Nitrógeno no proteico, provocando un pequeño aumento del pH y acelerando la pérdida de agua.

La lipólisis continúa aumentando la concentración de ácidos grasos libres que al oxidarse provocan la aparición de compuestos volátiles y no volátiles que contribuyen al sabor y aroma del embutido (Lücke y col., 1998). El período de maduración se prolonga de 20 a 60 días según el producto que se desee obtener.

I.3 Aspectos microbiológicos de la elaboración de embutidos secos fermentados artesanales

I. 3. a) Microflora

La fermentación de los productos cárnicos embutidos se inicia una vez que la carne ha sido embutida, en los productos elaborados artesanalmente está asociada de manera directa al tipo y cantidad de microorganismos de la flora proveniente del animal sacrificado y de la que ha sido adquirida durante todo el proceso de manipulación.

Al inicio de la fermentación todos los microorganismos presentes tienen las mismas condiciones

para multiplicarse, poco tiempo después la deshidratación progresiva durante el secado junto con la alta concentración de nitritos y de sal dificultan el crecimiento de algunos tipos de bacterias no deseables y permiten el desarrollo de otras. Entre ellas predominan las de la Familia *Micrococáceas* como *Staphylococcus saprophyticus* reportado en estudios realizados sobre muestras de salame de la provincia de Tucumán en Argentina (Fontana *y* col, 2005), éstos reducen nitratos a nitritos e intervienen en el metabolismo de los ácidos grasos, liberando compuestos volátiles que aportan el aroma característico al salame. Su crecimiento declina a medida que disminuye el pH durante la fermentación.

Simultáneamente se ve favorecido el desarrollo de bacterias lácticas las que al producir ácido láctico provocan una mayor disminución del pH impidiendo el desarrollo de microorganismos patógenos y contribuyendo al desarrollo del aroma y sabor del embutido por la producción de ácidos volátiles, alcohol y dióxido de carbono. Además cuando el pH alcanza el punto isoeléctrico de las proteínas éstas pierden capacidad de retención de agua, facilitando la deshidratación y el descenso de a_w por debajo de 0,90. En embutidos artesanales de Argentina se encuentran *Lactobacillus sakei y Lactobacillus plantarum* como especies dominantes (Fontana y col, 2005).

1.3. b) Micoflora superficial

La fuente tradicional de hongos sobre embutidos secos fermentados de elaboración artesanal es la micoflora autóctona del lugar, constituida por hongos y levaduras. Esta flora particular, además de su apariencia típica, contribuye al desarrollo de características organolépticas particulares que diferencian a cada embutido según su origen.

En el proceso de maduración la cobertura de micelio producida por los hongos tiene las siguientes funciones:

- Regula la humedad, compensando los cambios de humedad relativa ambiente, obteniendo una velocidad de secado más uniforme en el centro.
- Evita la penetración de oxígeno y la incidencia de la luz, reduciendo la tendencia al desarrollo de rancidez oxidativa.
- Produce el descenso de la concentración de ácido láctico, con el consecuente aumento del pH. Esto explicaría el sabor más agradable de los productos madurados con hongos comparados con aquellos madurados sólo por fermentación láctica (Grazia y col., 1986)
- Poseen actividad proteolítica y lipolítica relacionada con su habilidad para producir enzimas, lo que influye en las características organolépticas, entre ellas el aroma, resultante de la producción de compuestos volátiles (Ludemann y col., 2004).

1.3. b) (1) Hongos y Levaduras

Los hongos asociados al emplume de embutidos secos fermentados artesanales son especies *de Penicillium* tales como *P. nalgiovense, P. olsonii, P. chrysogenum, P. verrucosum, P. spathulatum, P. solitum, P. oxalicum, P. commune, P. camemberti, P.expansum, P. miczynskii y P. simplicissimum. (Mintzlaff,H.y col, 1972;* López-Diaz, T. y col,2001, Alapont, C. y col, 2014; Ludemann V. y col, 2004; Sonjak S. y col, 2010; Galvalisi U., 2012). También se asocian especies de *Penicillium* contaminantes como P*. aurantiogriseum* (Moracanin S., 2008), y especies de los géneros *Aspergillus, Scopulariopsis, Rhizopus, Eurotium y Mucor* (Castellari y col., 2010).

Aspergillus sp puede competir con *Penicillium sp* pero sólo con temperatura de almacenamiento elevada y baja actividad de agua. Las toxinas producidas por *Aspergillus sp*. han sido detectadas sólo en embutidos madurados a altas temperaturas, condiciones que no suelen darse en la práctica, ya que la maduración normalmente se realiza a temperaturas que rondan los 15°C, condiciones en las cuales *Aspergillus* es desplazado por *Penicillium sp y Scopulariopsis.*

Al comenzar el proceso de fermentación las levaduras dominan la superficie del salame, siendo *Debaryomyces hanseneii* predominante en salames, revistiendo importancia por su actividad lipolítica y su capacidad de degradar el Ácido Láctico, lo cual contribuye a la generación de componentes volátiles (Toldrá F, 2007). Luego de unas pocas semanas dominan la superficie de manera natural los hongos mencionados anteriormente, en especial *Penicillium nalgiovense* (Ludemann y col., 2004) que presenta diferentes biotipos los cuales confieren al producto colores que varían desde el blanco al verde azulado, siendo deseable el blanco por el aspecto que le confiere a la superficie del salame. El crecimiento de cepas deseables de *Penicillium nalgiovense* en la superficie de los embutidos depende de diversos factores como la temperatura, la actividad de agua y la presencia de NaCl, siendo éste último factor estimulante de la proteólisis y lipólisis a 25°C (Ludemann y col, 2004).

Si la actividad de agua se mantiene alta se produce el desarrollo de mohos de los géneros *Mucor* y *Rhizopus*, los que provocan un aspecto no deseable en la superficie del embutido. De manera similar, *Cladosporium herbarum* produce manchas de color negro deteriorando el aspecto externo del producto.

I.3. b) (2) Producción de metabolitos secundarios: Micotoxinas

Es generalmente aceptado que las cepas de hongos usadas en alimentos deberían ser no toxicogénicas (incapaces de producir micotoxinas) y no tóxicas para los consumidores. Sin embargo, cuando la fuente tradicional de hongos sobre embutidos secos fermentados es la misma flora natural del ambiente, esta consiste en hongos heterogéneos, con representantes de diferentes especies y familias. La mayoría de estos hongos no son deseables y podrían conducir a serios problemas, tanto para el consumidor como para el productor. En este orden, estudios realizados en diferentes partes del mundo sobre la micoflora de superficie de varios tipos de estos embutidos han revelado que la mayoría de las cepas aisladas son indeseables, no sólo por su color imperfecto y apariencia del micelio sino también por su capacidad para producir toxinas. Algunas de las especies de *Penicillium* encontradas en salames son productoras de micotoxinas como Citreoviridina, citrinina, Acido cyclopiazónico, isofumigaclavina A, ochratoxina A, patulina, roquefortina C, rugulovasina A (Fink-Gremmels, 1988), aunque su presencia se restringe a sólo unos pocos milímetros bajo la superficie de la tripa.

En Argentina fueron reportadas especies productoras de micotoxinas en la superficie de embutidos cárnicos de la provincia de Buenos Aires (Pose y col., 2004). En estudios posteriores se determinó que el 43% a 50% de las especies fúngicas aisladas en la zona sudeste de la provincia de Buenos Aires son micotoxigénicas (Castellari y col., 2006)

Sin embargo existen estudios realizados en la micoflora superficial de salames artesanales elaborados en Uruguay con el objetivo de evaluar aquellas especies aptas para ser utilizadas como

cultivos iniciadores y por lo tanto no toxicogénicos, que indican la ausencia de producción de micotoxinas en *P. nalgiovense, P. brevicompactum* y P. *puberulum*. Siendo *P.expansum y P.griseofulvum* los únicos productores de Patulina y Ácido Ciclopiazónico respectivamente (Galvalisi y col, 2012).

I.4 *El Género Penicillium:*

Reino: Micetes

Phylum: Ascomycota

Clase: Ascomycetes

Subclase: Eurotiomycetidae

Orden: Eurotiales

Familia: Trichocomaceae

Género: Penicillium

El nombre genérico *Penicillium* del latín penicillus (el pincelito), fue publicado por primera vez en la obra de Link "Observationes in Ordines Plantarum Naturales" en 1809.

I.4. a) Características generales del Género *Penicillium*

Este género se caracteriza por poseer un micelio vegetativo con hifas hialinas, septadas, algunas veces fuertemente coloreadas. Su estructura reproductiva es el Conidióforo que forma conidios en

una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides las cuales dan origen a conidios en cadenas basípetas no ramificadas, hialinos, pequeños, desde globosos hasta cilíndricos, lisos o finamente rugosos que en grupos se ven de color verde, verde azulado, verde aceituna o gris. (Figura 3).

El conidióforo está unido al micelio mediante la estipe. Entre ésta y las fiálides pueden aparecer diferentes células. Dichas células se presentan agrupadas partiendo de un mismo punto del que se originan. Aparte del de las fiálides los puntos de ramificación son uno, dos o excepcionalmente tres a lo largo del conidióforo. La célula de soporte de la fiálide se denomina métula y la célula de soporte de la métula se denomina rama, en las especies que las presentan. Estas ramas parten del estipe, aunque pueden partir, a su vez de otras ramas (Pitt J, 2000)

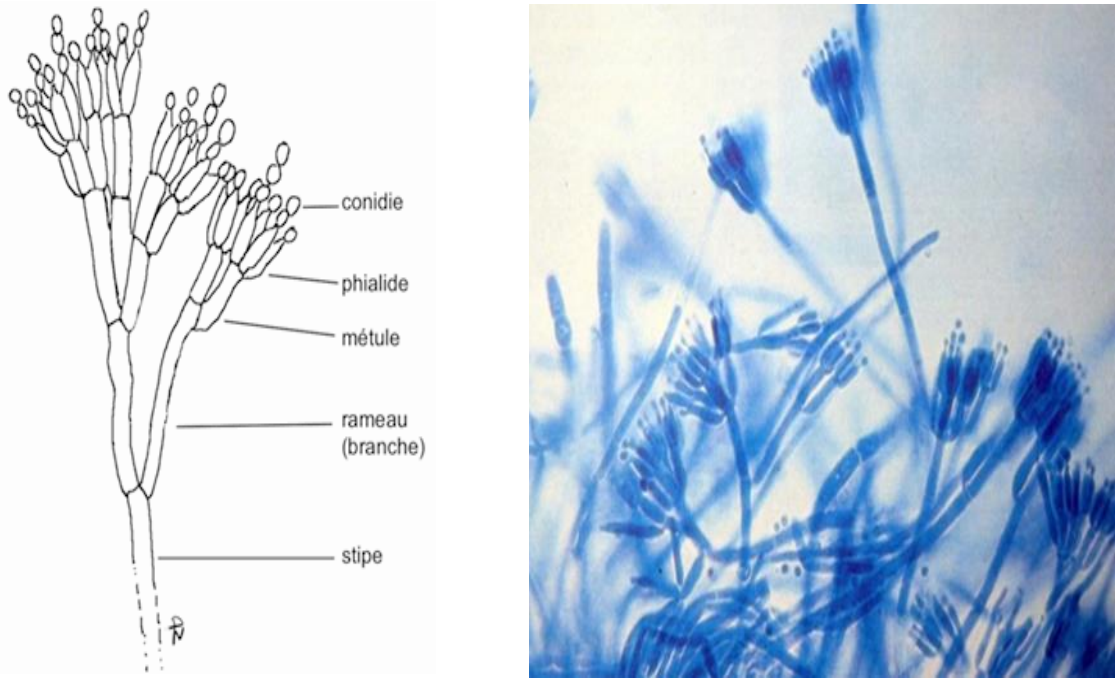


Figura 3: Conidióforo del Género *Penicillium*. Terminología referente a las diferentes ramificaciones de la estructura reproductiva (extraído de ESMISAB: University of Brest, Western Brittan)

En los Conidióforos las ramificaciones se ubican formando verticilos (Figura 4), por lo que se dividen, según el número de verticilos que poseen en:

- Monoverticilados : el conidióforo presenta un único punto de ramificación desde el conidio hasta el estipe.
- Biverticilados: presentan, fiálides y métulas, entre el conidio y la estipe
- Terverticilados: el conidióforo presenta todas las estructuras descriptas: fiálides, métulas, ramas y estipe.

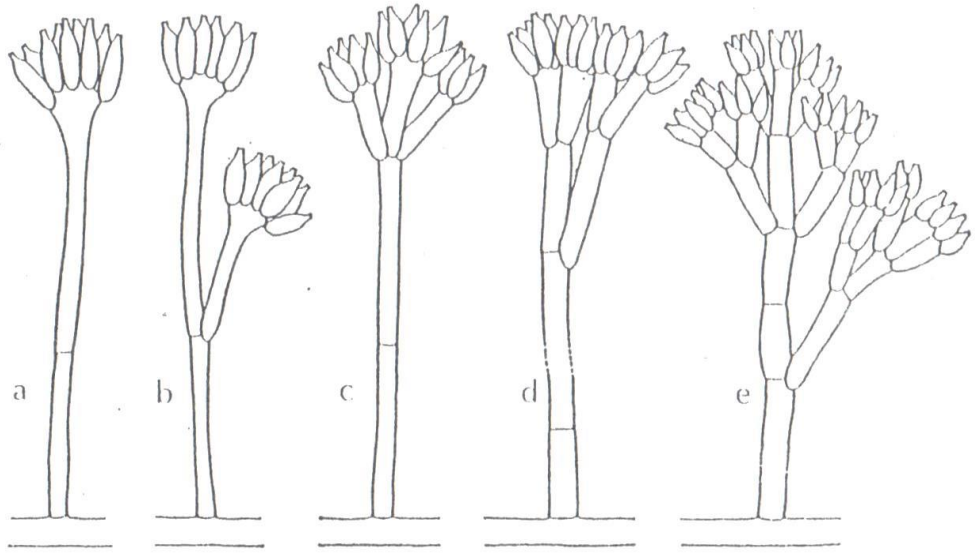


Figura 4: Tipos de Conidióforos en *Penicillium* según el número de sus ramificaciones: a, b. simple (Monoverticilados); c: una ramificación (Biverticilado), d: dos ramificaciones (Terverticilado), e: tres ramificaciones (cuaterverticilado)

De acuerdo a la morfología del conidióforo y la velocidad de crecimiento de la colonia en Czapek-Glicerol el Género *Penicillium* se divide en 4 subgéneros:

-***Subgénero Aspergilloides:*** monoverticilados.

-***Subgénero Penicillium***: terverticilados, de crecimiento rápido.

-***Subgénero Biverticillum***: biverticilados simétricos, de crecimiento lento.

-***Subgénero Furcatum***: biverticilados y monoverticilados, de crecimiento asimétrico

Fuente: Pitt and Hocking, 2009.

1.4. b) Subgénero *Penicillium*:

En el subgénero *Penicillium* los conidióforos son predominantemente terverticilados, aunque también se encuentran estructuras biverticiladas o cuaterverticiladas. Las fiálides siempre se encuentran sostenidas por una métula y éstas a su vez son sostenidas por ramas (Figura 5). Las fiálides son típicamente ampuliformes y en pocas especies cilíndricas o acerosas. Presentan crecimiento a 5°C, pero no crecen a 37°C.

La morfología macroscópica y microscópica de las colonias constituye el principal sistema de clasificación propuesto inicialmente por Raper y Thom en 1949 y mejorado por Samson en 1976 y Pitt en 1979. De acuerdo a éste sistema las principales características a tener en cuenta son:

- la presencia de estipes de paredes perfectamente lisas que se distinguen al microscopio de aquellas con paredes finamente o claramente rugosas.
- el color de las colonias para el cual se utiliza el "Handbook of Colour"(Kornerup y Wanscher, 1978) por medio del cual algunas especies pueden resolverse sin dudas pero presenta dificultades de identificación para los casos de coloración intermedia.

Figura 5: Subgénero *Penicillium*. a) Conidióforo. b) Colonia de *P. nalgiovense* en MEA

Este sistema de clasificación presenta dificultades a nivel taxonómico debido a la presencia de diferencias sutiles entre numerosas especies que no pueden aclararse.

Con la finalidad de solucionar los problemas de identificación se introdujeron criterios fisiológicos para la diferenciación entre especies del subgénero. El primero de ellos fue la utilización del medio Agar Creatina (CREA) desarrollado por Frisvand en 1985, permite diferenciar aquellas especies con afinidad por los alimentos proteicos de aquellas con afinidad por los alimentos ricos en carbohidratos. El medio fue mejorado en 1993 por Pitt con el agregado de Púrpura de Bromocresol para estimar el pH de reacción para cada especie denominándose Agar neutro de Creatina Sacarosa (CSN).

Posteriormente comenzaron a publicarse estudios utilizando otras propiedades del subgénero *Penicillium* como la producción de metabolitos secundarios y en especial de micotoxinas propuesta por Frisvand en 1981. Otra de las características fisiológicas que se consideró de valor taxonómico fue la producción de enzimas por las diferentes especies del género propuesta por Cruickshank en 1987. La dificultad de los estudios enzimáticos radica en su escasa

reproducibilidad. En 1990 Lund desarrolló un método sencillo, el reactivo de Ehrlich, para identificar especies del subgénero, basado en la visualización de Indol como metabolito secundario.

Recientemente comenzaron a considerarse modernas técnicas moleculares como criterio taxonómico, como es el caso de la secuenciación de las regiones ITS1 e ITS2 que permitieron establecer diferencias entre *P. roqueforti, P. carneum y P. paneum*. (Skouboe y Boysen, 2000). También se usaron genes de regiones de ADN ribosomal para establecer relaciones filogenéticas entre especies de *Penicillium* terverticilados (Peterson y col., 2000).

Samson, Seifert y Louis-Seize usaron una secuencia parcial del gen de β- tubulina para resolver la identificación de las especies correspondientes a la serie Viridicata, siendo éste gen uno de los que mejores resultados dieron hasta el momento (Samson R. y col., 2004)

De acuerdo a estas consideraciones Frisvand y Samson (2004) subdividen al Género *Penicillium* Subgénero *Penicillium* en 6 secciones (Tabla 2), cada una de las cuales posee características fenotípicas distintas

Género *Penicillium* subgénero *Penicillium*	
Sección	***Serie***
Coronata	*Olsoni*
Roqueforti	*Roqueforti*
Chrysogena	*Chrysógena* *Mononematosa* *Aethiopica* *Persicina*
Penicillium	*Expansa* *Urticicolae* *Claviformia* *Itálica* *Gladioli*
Digitata	*Digitata*
Viridicata	*Viridicata* *Corymbífera* *Verrucosa* *Camemberti* *Solita*

Tabla 2: Clasificación de las especies del subgénero Penicillium en secciones, basada en la morfología, patrones de crecimiento, ecología, extrolitos y secuencia parcial de beta tubulina (basada en Frisvad y Samson 2004).

1.4. b) (1) Su interacción con el hombre

La interacción de las diversas especies del subgénero *Penicillium* con el hombre origina diversos efectos, algunos **perjudiciales** ya que se encuentran entre las principales causas del deterioro de los alimentos. La capacidad de éstas especies de crecer en semillas y alimentos almacenados se relaciona con su capacidad de crecer en lugares con baja actividad de agua: $a_w < 0,80$ (*P. brevicompactum, P. chrysogenum, P. implicatum*) y baja tensión de oxígeno (*P.roqueforti*) como así también su resistencia a sustancias preservantes. Muchos de ellos son capaces de causar daño en los alimentos a temperatura de refrigeración.

Algunas especies de *Penicillium* afectan a las frutas y bulbos de plantas, incluyendo *P. expansum,*

manzanas y peras; *P. digitatum*, cítricos, y *P. allii*, ajo.

Otras son patógenas para animales y humanos*: P. marneffei*, que causa mortalidad en las ratas de bambú de Vietnam, se ha convertido en una infección oportunista común de las personas infectadas por el VIH en el sudeste de Asia.

Otros efectos pueden ser **benéficos** para el hombre: algunas especies son utilizadas en la industria alimentaria como *P. camemberti y P. roqueforti*, utilizados en la producción de quesos. *P. nalgiovense* se utiliza para mejorar el sabor de embutidos secos fermentados (Goicochea A., 2010)

Otros sirven en Biotecnología para la producción de una serie de enzimas y otras macromoléculas, tales como Acido glucónico, cítrico y tartárico, así como varios pectinasas, lipasas, amilasas, celulasas y proteasas. Algunas especies de *Penicillium* han mostrado potencial para su uso en biorremediación debido a su capacidad para descomponer una variedad de compuestos xenobióticos.

En medicina *P. chrysogenum* se utiliza para la producción de Penicilina y la griseofulvina es un medicamento antifúngico y un agente quimioterapéutico potencial que fue descubierto en *P. griseofulvum*. Especies adicionales que producen compuestos capaces de inhibir el crecimiento de células tumorales in vitro incluyen: *P. pinophilum*, P. *canescens, y P. glabrum.*

1.4.b) (2) Producción de Micotoxinas:

El subgénero *Penicillium* posee numerosas especies que fueron reportadas como toxicogénicas y constituyen un alto riesgo de intoxicación alimentaria. (Tabla 3)

Micotoxinas	***Principales especies productoras del subgénero Penicillium***
Ocratoxina A	*P. verrucosum, P.nordicum*
Patulina	*P.griseofulvum, P.expansum*
Citrinina (CIT)	*P.citrinum, P. verrucosum, P .expansum*
Ácido Penicílico (AP)	*P.aurantiogriseum, P.viridicatum*
Ácido Ciclopiazónico	*P.commune, P.camemberti, P.griseofulvum*
Roquefortina C	*P.chrysogenum, P. roqueforti, P. expansum, P. crustosum*
Toxina PR	*P. chrysogenum, P. roqueforti*
Nalgiovensina	*P. nalgiovense*
Griseofulvina	*P.griseofulvum, P.dipodomys*
Citroviridina	*P.citreonigrum*
Ciclorotina	*P.islandicum*
Adaptado de Frisvad y Samson (2004)	

Tabla N° 3: Principales especies productoras de Micotoxinas del subgénero *Penicillium*

1.4. c) Penicillium nalgiovense:

Penicillium nalgiovense es una de las especies más conocidas del género *Penicillium*, originalmente fue ampliamente usada en la manufactura de productos fermentados, especialmente quesos, en Europa. Posteriormente comenzó a usarse en la elaboración de embutidos secos fermentados.

Tradicionalmente *Penicillium nalgiovense* ha sido identificado atendiendo a características morfológicas de las colonias que forma al crecer en determinados medios de cultivo. La distinción definitiva de ésta especie fue realizada por Cruickshank y Pitt en 1976, como forma doméstica de *P. chrysogenum*.

Las descripciones morfológicas macroscópicas y microscópicas de *P. nalgiovense* se basan en la observación del crecimiento de las colonias en medios de cultivo estándard. Las colonias en CYA usualmente miden 28-35 mm de diámetro, son radialmente surcadas, densas y velutinosas. La producción de conidios es de débil a fuerte, con coloración desde blanco a verde pálido. Pocos aislamientos son productores de exudado. En éste medio el reverso de las colonias es amarillo pálido.

En MEA el diámetro de las colonias es variable (10-30 mm), son planas, fuertemente esporuladas, con conidios desde blancos a verde oscuros, sin exudado ni pigmentos. Se caracterizan por presentar el reverso de color anaranjado fuerte o marrón, siendo ésta una característica diferencial de la especie.

Las colonias en GN25 miden 14-22 mm, son planas, con moderada producción de conidios. En CYA presentan germinación a 5°C y a 37°C no presentan crecimiento.

Los conidióforos son terverticilados, con una estructura compacta terminal, ocasionalmente cuaterverticilados, de paredes lisas. Con fiálides ampuliformes o ligeramente cilíndricas. Conidios esféricos o sub-esferoidales de paredes lisas.

Los aislamientos de *P. nalgiovense* muestran una variación morfológica sustancial de manera que pueden dividirse en seis biotipos, teniendo en cuenta las variaciones en crecimiento de las colonias en MEA Y CYA, así como su grado de esporulación y color (Fink-Gremmels y col., 1988).

Penicillium nagiovense es reportado como productor de extrolitos tales como: Diafortinas y Dipodazinas (Larsen y col., 2001). Así como también se conoce su capacidad de producir Penicilina (Laich F. y col., 1990; Andersen y Frisvad, 1994). En cuanto a la producción de micotoxinas, muchos

aislamientos son productores en bajas concentraciones de Nalgiovensina y Nalgiolaxina (Frisvad, J. 2004).

1.5. Caracterización de poblaciones Fúngicas

1.5. a) Marcadores en estudios de diversidad genética

Un marcador es un carácter o un gen que debido al ligamiento puede usarse para indicar la presencia de otro gen; es decir, cualquier característica A (sea un gen, una proteína, tipo de hoja, etc.) que esté asociada a la presencia o expresión de una característica B (como vigor, altura, resistencia a enfermedades, etc.) puede considerarse como un marcador, pues la presencia de A necesariamente implica la de B (Solís Ramos y col.,2005)

Esto ofrece la posibilidad de estudiar poblaciones de organismos, y por ejemplo, diferenciarlas o seleccionar aquellas que presenten rasgos de interés para el hombre.

Existen dos tipos de marcadores:

- Marcadores fenotípicos en los cuales los polimorfismos se detectan a través de sus productos.
- Marcadores moleculares o genómicos en los que los polimorfismos se detectan a nivel de ADN.

Los primeros tienen como desventaja que se encuentran influenciados por el ambiente ya que se basan en la expresión de características morfológicas del organismo maduro.

Los marcadores moleculares, en cambio, no se encuentran influenciados por el ambiente, los polimorfismos analizados se encuentran en zonas del genoma que no se expresan en fases tempranas del desarrollo o en la madurez.

1.5. a (1) Marcadores Fenotípicos: Morfológicos

Históricamente, la taxonomía (o clasificación de organismos) ha estudiado características fenotípicas, los cuales se evalúan mediante marcadores morfológicos. Estos marcadores tienen la desventaja de que pueden estar influenciados por el ambiente.

Cuando observamos un organismo, vemos su fenotipo que es el resultado de la interacción de su genotipo con el ambiente. Este mismo genotipo puede producir fenotipos distintos cuando se encuentra en diferentes ambientes por lo que la variación que vemos en distintas poblaciones es debida en parte a diferencias genéticas y en parte a diferencias ambientales pero no podemos distinguir entre la contribución de ambas (Glenn y col., 1995)

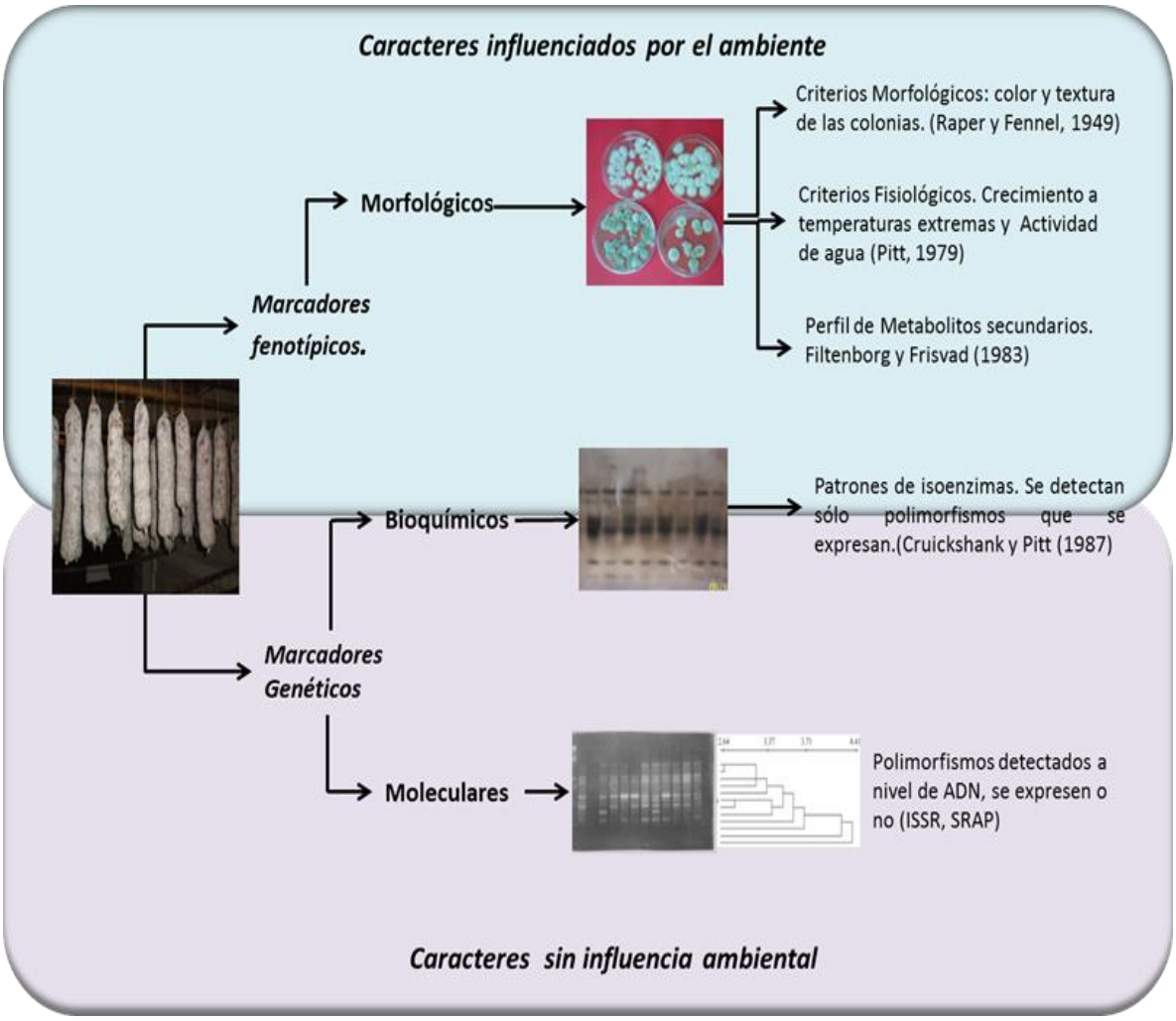


Figura 6: Marcadores utilizados para estudios de diversidad genética.

1.5.a . (2) Marcadores Moleculares

1.5. a) (2)(i) Bioquímicos

El descubrimiento de las isoenzimas ha favorecido la creación de marcadores moleculares más eficientes que los morfológicos ya que permiten comparar el fenotipo de un individuo con su genotipo de manera independiente de la influencia ambiental

Los marcadores bioquímicos incluyen a las proteínas y dentro de ellas a las isoenzimas o aloenzimas, constituyendo la primera generación de marcadores moleculares. Las proteínas son los productos primarios de los genes y se forman mediante los procesos transcripción y traducción, por lo que se ven menos influidas por el ambiente (Vazquez J., 2000).

El término isozima designa a cada una de las múltiples formas enzimáticas que catalizan la misma reacción con similar o idéntica especialidad de sustrato. El término isoenzima, acuñado por Marker y Moller en 1959, fue introducido posteriormente y se refiere a formas moleculares múltiples de enzimas que derivan de un mismo órgano o tejido, poseen similares orígenes genéticos y actividades catalíticas semejantes.

El uso de isoenzimas como marcadores genéticos se basa en su heterogeneidad, ya que la misma enzima presenta diferentes formas moleculares que pueden ser separadas según su carga eléctrica y por electroforesis. Esto permite estudiar la variabilidad genética existente entre individuos de una misma población. La diferencia de cargas eléctricas entre una enzima y otra es el resultado de cambios en su estructura molecular que pueden consistir en simples sustituciones de aminoácidos a nivel de la estructura primaria o en casos complejos que sea diferente el número de polipéptidos que forman parte de la enzima. Esta variación corresponde, generalmente, a diferencias en la secuencia del genoma, lo que permite caracterizar la variación a nivel molecular.

Aunque las isoenzimas catalizan el mismo sustrato, pueden ser molecularmente muy diferentes porque son sintetizadas por genes distintos o ser sintetizadas por el mismo gen pero representar la expresión de alelos diferentes (Quirós. C y col., 1991).

La obtención de patrones de isoenzimas combina:

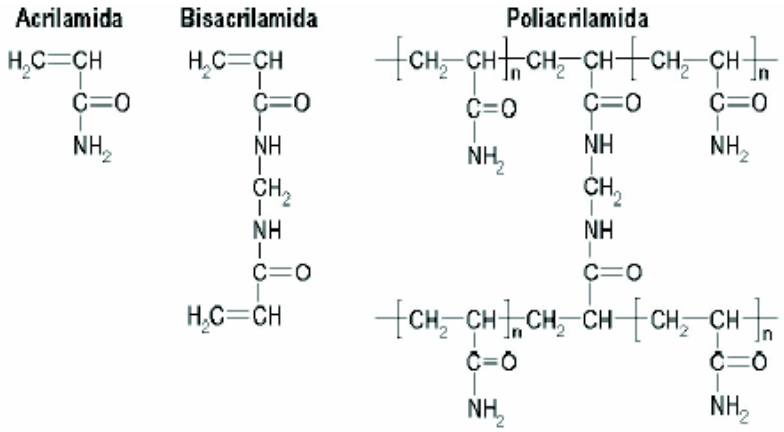
- ***Procedimientos electroforéticos***: que permiten separar moléculas teniendo en cuenta su diferente movilidad en un campo eléctrico

El fenómeno denominado electroforesis sucede cuando una molécula con una carga neta en solución se desplaza por acción de una campo eléctrico; de esta manera la molécula migra hacia uno u otro electrodo según su carga: los aniones (-) irán hacia el ánodo (+) y los cationes (+) hacia el cátodo (-). En estas condiciones las moléculas disueltas migran a una velocidad proporcional a la relación carga/masa.

Las separaciones electroforéticas generalmente se realizan sobre matrices que sirven de tamices moleculares que potencian la separación.

Los geles de poliacrilamida, usados frecuentemente para separar proteínas, se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida y del monómero entrecruzador N, N'-metilen-bis-acrilamida.

La polimerización se inicia por acción de iones de persulfato de amonio (APS), las aminas terciarias como el N, N, N, N´-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato.



Para la electroforesis en gel de poliacrilamida de muestras proteicas se puede utilizar un sistema de buffers continuo o discontinuo.

El sistema continuo tiene una única clase de gel, el separador (separating) y usa el mismo buffer que el de corrida. El discontinuo está formado por dos geles distintos. En la parte de arriba se coloca un gel separador con un tamaño de poro mayor (stacking) que sirve para concentrar las muestras (en una banda) antes de que ingresen al gel separador.

El sistema discontinuo otorga una mayor resolución ya que las proteínas ingresan como una banda discreta al gel de separación.

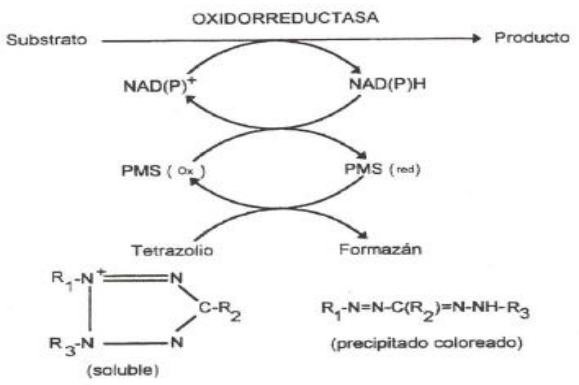
- ***Tinción de la actividad enzimática***: se utiliza para localizar la posición relativa de las formas múltiples de las enzimas luego de su resolución por medios electroforéticos. La técnica clásica está basada en la formación de un precipitado cromogénico no difusible en el sitio de la actividad enzimática (Suso J., 1997).

  Según el colorante básico utilizado la tinción puede ser:

  (a) Sistema Diazónico: que permite detectar enzimas hidrolíticas (fosfatasas,esterasas, aminopeptidasas).

  Sal de diazonio + alcohol arílico ➔ colorante azónico

  b) Sistema Tetrazolium: permiten poner de manifiesto las deshidrogenasas (malato deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, etc).



c) Sistema almidón-iodo: para reconocer amilasas, catalasas y fosforilasas.

La multiplicidad isoenzimática puede ser el resultado de ciertos cambios en la secuencia de ADN (mutaciones) que codifica para estas enzimas lo que puede resultar en cambios en la composición de aminoácidos. Además pueden estar codificadas por diferentes alelos del mismo locus o por diferentes loci los que a su vez pueden ser multialélicos, suministrando una gran fuente de variación. (Iglesias y col., 1980).

Si estos cambios se producen, las proteínas podrían tener la misma actividad biológica, pero como su composición de aminoácidos varía, podrían tener diferente carga neta y por tanto diferentes velocidades de migración en un campo eléctrico.

Estas diferencias determinan patrones característicos de migración electroforética de cada isoenzima lo que posibilita la determinación de polimorfismos sólo mediante el empleo de frecuencias de bandas que nos permiten detectar variaciones genéticas entre organismos de la misma o distinta población lo que suministra información taxonómica para estudios filogenéticos y de biodiversidad (D´Angelo A., 2012)

En micología las isoenzimas han sido utilizadas para resolver numerosos problemas taxonómicos calculando la distancia genética entre poblaciones como es el caso de *Penicillium chrysogenum* y las especies xerófilas relacionadas (Banke y col., 1997)

A pesar del amplio uso de ésta técnica presenta inconvenientes que dificultan su uso en la estimación de la variación genética porque muchos de los cambios de bases de ADN no originan modificación en las secuencias de aminoácidos de las proteínas por lo que no son detectados.

1.5. a) (2)(ii) Genéticos

Los marcadores genéticos fueron en los últimos años la solución a éste problema, ya que permiten evidenciar polimorfismos en la secuencia de ADN de dos individuos, modifiquen éstas o no su fenotipo, esto se debe a que los marcadores moleculares permiten señalar regiones codificantes y no codificantes del genoma.

Existen diversas técnicas de Biología Molecular que permiten detectar estas regiones entre ellas aquellas basadas en hibridación de ADN, amplificación de ADN o técnicas mixtas.

Una de las técnicas más utilizadas para diferenciar entre especies es la que utiliza las regiones codificantes y no codificantes del ARN ribosomal. Los genes que codifican ARN ribosomal son ampliamente usados para la identificación de hongos y plantas, y para la construcción de árboles filogenéticos (Pianzzola y col., 2004; Scott J. y col. 2004). El ARNr es necesario en gran cantidad para producir los ribosomas celulares, por lo que existen múltiples copias de los genes del ARNr, frecuentemente arreglados en tándem pero separados unos de otros por espaciadores que no son transcriptos (Figura 7. a). Cada gen para un ARNr (Figura 7 b) codifica la información para los tres tipos de ARNr encontrados en ribosomas eucarióticos (18S, 5.8S y 28S), pero también contiene otra información valiosa, especialmente en las secuencias espaciadoras internas (ITS – Internal Transcribed Spacer) y en las secuencias espaciadoras externas (ETS – Externally Transcribed Spacer).

Los genes que codifican para ARNr inicialmente producen un pre-ARNr (Figura 7.c), el cuál luego es procesado, y esto incluye la escisión de las regiones espaciadores para producir los tres ARNr maduros (Figura 7. d).

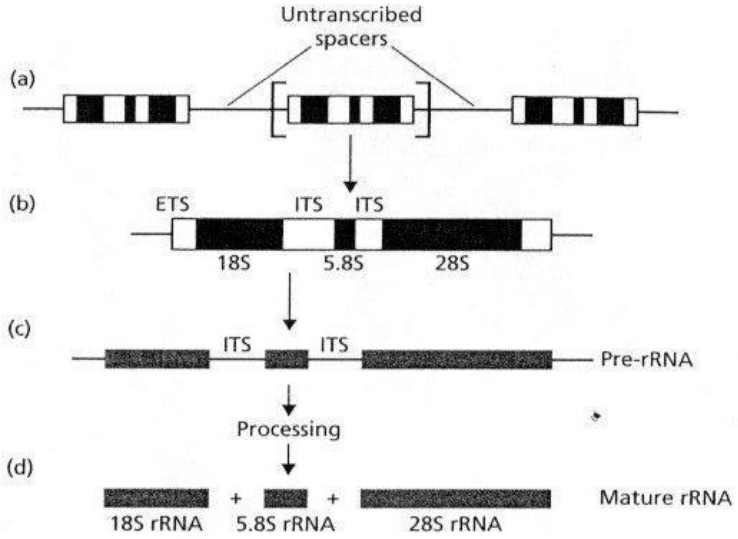


Figura 7: Organización y procesamiento de los genes ARNr eucariotas

Los 18S ARNr han acumulado suficientes cambios durante la evolución, tanto que pueden ser usados como una especie de "reloj molecular". Las regiones ITS son aún más variables y son frecuentemente usadas para distinguir entre diferentes especies. Esto se lleva a cabo por medio de PCR (Polymerase Chain Reaction) usando cebadores (primers) que se ligan a los extremos 5´ y 3´ de cada cadena de ADN. El diseño de cebadores universales dentro de las zonas altamente conservadas de los genes ARNr para PCR ha permitido amplificar las regiones ITS1 e ITS2 en un amplio número de microorganismos (Figura 8)

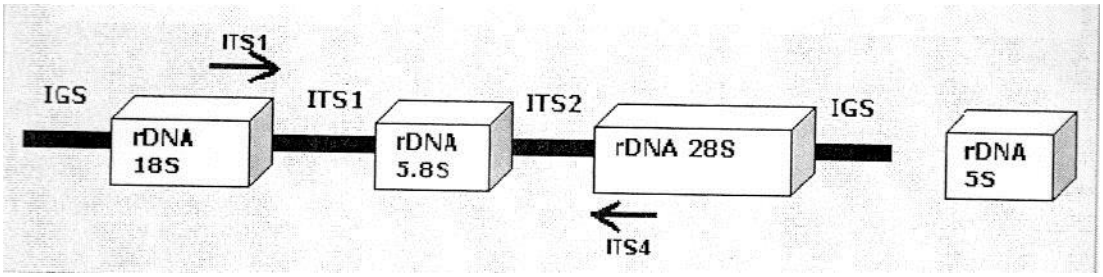


Figura 8: Diseño de cebadores universales para PCR

El uso de marcadores moleculares en los análisis genéticos y en el mejoramiento de las plantas ha tenido una difusión extremadamente rápida. Las principales aplicaciones incluyen la obtención de "huellas genéticas" (fingerprinting) genómicas de individuos, variedades y poblaciones; el análisis de la estructura y diversidad genética en poblaciones naturales y de mejoramiento y bancos de germoplasma; el establecimiento de relaciones filogenéticas entre diferentes individuos y especies; la construcción de mapas genéticos de alta cobertura genómica y la localización de genes de interés económico

Los más usados son: RAPD y AFLP, presentan limitaciones como son la baja reproducibilidad y alto costo, con la ventaja de que no requieren conocimiento previo de secuencias sobre las cuales se desarrollarán los primers (por lo que son conocidos como marcadores moleculares "anónimos").

Las limitaciones son superadas con dos nuevas técnicas: ISSR-PCR y SRAP.

La ISSR-PCR utiliza los microsatélites (SSRs) como primers para amplificar las regiones intermedias (ISSR) que normalmente son muy polimórficas, se los conoce como marcadores moleculares "dependientes de secuencia". El polimorfismo de éstas regiones está dado por el diferente número de repeticiones, que al ser amplificados dan fragmentos de distinto tamaño que se desplazan con distinta movilidad en una corrida electroforética.

Los SSRs son repeticiones cortas en tándem (STRs) o repeticiones de número variable en tándem (VNTRSs) de 1-4 bases que se encuentran ampliamente distribuidas en el genoma eucariota, a partir de éstas regiones se pueden armar los primers que servirán para amplificar los ISSRs de diferentes tamaños.

Las secuencias repetidas de los microsatélites usadas como primers pueden ser di, tri, tetra o penta-nucleótidos. Pueden tener uno o dos nucleótidos extra arbitrarios en el extremo 3´o 5´usados como "ancla" asegurando que la amplificación comience en el extremo 3´o 5´ del

microsatélite. Cuando dos secuencias repetidas se encuentran dentro de una distancia amplificable y con una orientación invertida el primer complementario a ellas puede iniciar la amplificación, por lo que puede usarse un único primer (Figura 9).

La molécula generada, con un tamaño particular, se considera un "locus", que representa el segmento de ADN entre los microsatélites. Los ISSRs frecuentemente amplifican de 25 a 50 bandas en una sola reacción. Este patrón característico de productos de PCR se considera la "huella digital genética" de cada uno de los individuos analizados. El polimorfismo entre individuos de la misma población puede detectarse, ya que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el primer y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada (Zietkiewicz y col., 1994).

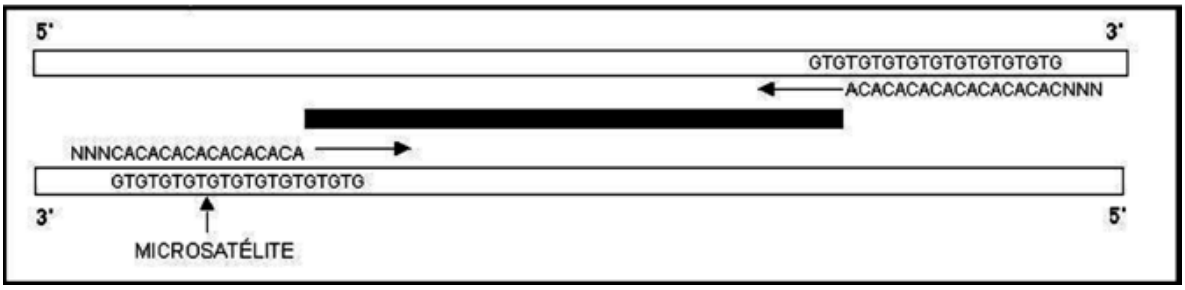


Figura 9: Amplificación con un primer $(CA)_n$ anclado en el extremo 5'con tres nucleótidos extras. Se amplifica el segmento intermedio entre dos secuencias de microsatélite en orientación invertida. Fuente: Libro Herramientas moleculares. Cap: 19

Los ISSR permiten diferenciar regiones polimórficas inter e intraespecíficas de un gran número de organismos: en hongos especies del Género *Penicillium* obtenidas de muestras de suelo de Brasil fueron diferenciadas genéticamente utilizando como primers (GTG)5 and (GACA)4 (Maciel y col., 2006), en *Pyrenophora tritici*-repentis patógeno de Trigo fueron estimadas usando ésta técnica (Moreno y col., 2008). *P. citrinum* productores de citrinina obtenidos de muestras de alimentos se

diferenciaron taxonómicamente de aquellos no productores de la micotoxina (Di Conza y col., 2007), se estimó la ausencia de relación entre variabilidad genética y origen geográfico en aislamientos de *Fusarium poae* provenientes de Argentina e Inglaterra (Dinolfo M. y col.,2010). En plantas existen numerosas evidencias de sus aplicaciones (Reddy M. y col., 2002). Por ejemplo esta técnica permitió estimar la variación genética en cultivares de Chinese yam (Yanqing Zhou y col., 2008), y en especies del Género Agave (Dávila y col., 2007).

Una nueva técnica se suma a la anterior SRAP consiste en el diseño de primers que con grandes posibilidades de amplificar marcos abiertos de lectura (ORFs). Los primers utilizados poseen 17 a 18 nucleótidos de longitud y constan de las siguientes partes:

El primer forward consiste en una secuencia Core de 13-14 bases, las primeras 10-11 bases del extremo 5´ llamadas filler o relleno sin secuencia específica , seguidas de la secuencia CCGG y luego 3 bases seleccionadas en el extremo 3´. La variación en esas 3 bases genera un set de primers que poseen sólo igual Core. Este primer tiene como blanco los EXONES (regiones altamente conservadas) del marco abierto de lectura (ORFs) cuyo contenido es rico en GC (46%).

El primer reverse posee los mismos componentes que el forward con las siguientes variaciones: el Core es seguido por la secuencia AATT en lugar de CCGG, seguida por 3 bases seleccionadas en el extremo 3´. El alto contenido en AT se debe a que este primer tiene como blanco promotores e INTRONES que son muy variables entre individuos.

De ésta manera se asegura la presencia de bandas polimórficas basadas en introns y exones.

Ambos primers no deben formar estructuras secundarias tipo Hairpins u otras, deben tener un 40-50% de contenido GC. La secuencia relleno o filler debe ser distinta en ambos primers (Quiros F, 2001)

Esta técnica fue desarrollada por Quirós y aplicada al mapeo genético de *Brassica oleracea.*, aunque también se obtuvieron buenos resultados en cítricos, manzanas, cherry, etc. Permite determinar polimorfismos con mucha fidelidad y combina simplicidad, reproducibilidad, bajo costo y la posibilidad de secuenciar las bandas obtenidas, además de utilizar marcos abiertos de lectura como secuencias blanco.

Existen numerosos trabajos en hongos basados en el uso de marcadores genéticos. (Tabla4)

Técnica molecular	**Organismo estudiado**	**Objetivo**	**Resultado**	**Referencia**
RFLP y RAPD	*P.expansum* *P.solitum*	Caracterizar aislamientos y establecer relaciones filogenéticas	Limitada diversidad por RAPD e información adicional de regiones específicas RFLP.	Pianzzola, M.(2004)
ITS	*Penicillium subgénero Furcatum Eupenicillium*	Caracterizar y establecer relaciones filogenéticas.	La técnica permite separar filogenéticamente ambos grupos, aunque la variabilidad es baja.	Skouboe,P *et al.* (1999)
RAPD	*P.expansum* *P.griseoroseum*	Diferenciar morfológica y molecularmente ambas cepas productoras de pectinasas	Se observó polimorfismo en la región sub-telomérica de por lo menos 3 cromosomas.	Cardoso Gomes P, *et al.* (2007)
RAPD	*P.auriantiogriseum var. Aurantiogriseum.* *P.verrucosum y P.puberulum*	Caracterizar taxonómicamente.	Se observa una alta diversidad entre especies, resultados consistentes con ITS y mtsrDNA.	Cheol-Sik Yoon *et al.* (1995)
AFLP	*P.verrucosum*	Diferenciar morfológica y genéticamente aislamientos productores de Ochratoxina	Se observa una gran diversidad genética entre aislamientos provenientes de distintas regiones	Frisvad,J.*et al*.(2005)
ISSR	P.citrinum P.chrysogenum	Diferenciar cepas productoras y no productoras de Citrinina	Los patrones obtenidos en todas las cepas de P. citrinum fueron muy similares y permitieron agruparlas según la cantidad de toxina producida.	Di Conza *et al.*(2007)
SCARs	*Hongos micorricos arbusculares*	caracterización de secuencias amplificadas y secuenciadas a partir de esporas de hongos micorrícicos arbusculares generadas en un sistema de raíces transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*	Fue posible desarrollar iniciadores SCAR con los cuales se amplificó de manera específica el hongo G.intraradices	Gómez-Leyva Juan *et al.* (1991)

Tabla 4: Marcadores moleculares utilizados para estudios taxonómicos en hongos

1.6) Caracterización del área de estudio

1.6) (a) Centros productivos de Embutidos secos fermentados en Argentina

En el Río de la Plata se dice en singular *salame* y en plural *salames*. Junto al jamón, el salame es uno de los fiambres más populares de Argentina y Uruguay, siendo –en general– de un tipo muy semejante al salami de Milano*. Las variedades de salame producidas en la región se distinguen según su textura interna en "picados gruesos", "picados finos", sopressattas y salamines, que suelen ser generalmente más especiados y así más curtidos, secos (y por esto más oscuros) y duros que los de Italia.

En Argentina surgieron diversos centros productivos a partir de la segunda mitad del siglo XIX, centros en los cuales se estableció una numerosa inmigración oriunda de Italia, es por este motivo que en toda la Pampa Húmeda: casi la totalidad de la provincia de Buenos Aires – en donde se destacan las ciudades de Mercedes y Tandil–, los 3/4 orientales de la provincia de Córdoba (Río Cuarto, Villa María, San Francisco, Colonia Caroya, Oncativo etc.), la mayor parte de la provincia de Santa Fe y el este de la provincia de La Pampa, se realizan con gran calidad y en gran cantidad excelentes salames.

En Tandil la elaboración de embutidos secos fermentados surge de la mano de la corriente inmigratoria proveniente de Italia y España que llegaron a la región a fines del siglo XIX y principios del siglo XX, instalando pequeños establecimientos elaboradores en el cordón serrano de Tandilia en la Provincia de Buenos Aires, como los de las familias de los Anglada, Borgonovo, Cagnoli, Ortega, Menéndez y Testa, que dieron pié a la industria actual del “salame tandilero”.

En Mercedes similar corriente inmigratoria se instaló en áreas de quintas cercanas a la ciudad trayendo consigo la tradicional elaboración de embutidos y constituyéndose en la "Capital Nacional del salame Quintero".

En Colonia Caroya (localidad del centro de la provincia de Córdoba, en el departamento Colón) la producción del salame comenzó con el arribo de contingentes italianos provenientes del Friuli a la provincia de Córdoba, éstas familias fundaron la colonia en 1876 (Donadoni M.,2010). Actualmente, el salame se elabora a partir de recetas familiares que fueron evolucionando en el tiempo a partir de la adaptación de los hábitos y conocimientos de los inmigrantes friulanos a las nuevas condiciones de vida. La producción que siempre se destinó al consumo de la familia que lo elaboraba y de los vecinos que participaban en la carneada, ha conocido una orientación creciente al mercado actual. (Champredonde, M.y col, 2010, 2013). En la actualidad existen 18 productores que se dedican a la elaboración del salame, que producen anualmente más de 315 mil kilos en total.

Por su parte Oncativo también debe su forma de elaborar salames a las recetas heredadas de los inmigrantes italianos pero en éste caso de la zona del Piamonte y cuenta en la actualidad con más de 20 establecimientos reconocidos a nivel nacional.

El punto en común que poseen éstas zonas productoras de embutidos secos fermentados artesanales es la tipicidad territorial que se encuentra influenciada no sólo por factores geográficos particulares de cada región, sino también por factores humanos que le confieren calidad y originalidad al producto. Estas características permiten que determinados productos obtenidos artesanalmente obtengan "Denominación de origen".

Las etiquetas DO son una forma de diferenciar los productos agroalimentarios al consumidor con el fin de obtener mayores cuotas de mercado. Asimismo, la imagen de la región de origen y la

calidad específica de los productos crea una identidad única para dichos productos y de esta forma se consigue un mayor valor añadido. Además de mostrarse ante el consumidor con la seguridad de lo auténtico, un producto regional que cuente con una DO tiene varias otras ventajas, entre ellas:

- Indica que tienen una calidad que los hace especiales por el lugar del cual provienen.
- Asegura el cumplimiento de un protocolo controlado.
- Promueve la protección de especies autóctonas.
- Protege los procedimientos de elaboración propios de la zona.

En Argentina, Tandil obtuvo el reconocimiento de Denominación de Origen para su producción de salame por parte del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca en el año 2011 (Secretaria de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación)

Por su parte Colonia Caroya se encuentra en proceso de obtención de la denominación de Origen desde el año 2008 (Champredonde y col., 2013).

Objetivo General

Objetivo General

El objetivo del presente trabajo fue:

"Caracterizar las poblaciones fúngicas que colonizan la superficie de Embutidos Secos Fermentados Artesanales de distintas localidades productoras de la República Argentina mediante un enfoque polifásico basado en la determinación de características morfológicas, bioquímicas y genéticas mediante la utilización de Marcadores Fenotípicos y Moleculares".

Capítulo I

"Caracterización morfológica de la micobiota superficial de Embutidos Secos Fermentados Artesanales"

Objetivo

El objetivo de ésta primer etapa fue:

"Caracterizar morfológicamente la micobiota que coloniza la superficie de los Embutidos Secos Fermentados Artesanales de diferentes localidades productoras del país utilizando marcadores fenotípicos"

I. 1 Materiales y Métodos

I.1 a) Caracterización Climática y Biogeográfica de las localidades de estudio.

Se analizaron las características climáticas (Temperatura media anual, lluvias y humedad relativa) así como también las característica de la región biogeográfica correspondientes a las siguientes localidades en estudio: Colonia Caroya y Oncativo (Provincia de Córdoba), Tandil y Mercedes (Provincia de Buenos Aires), Colonia Barón, General Campos, Santa Rosa, Jacinto Arauz y Alpachiri (Provincia de La Pampa).

Dicha información fue obtenida en las páginas web de las siguientes estaciones experimentales pertenecientes al INTA:

E.E.A Manfredi (Provincia de Córdoba)

E.E.A Balcarce (Provincia de Buenos Aires)

E.E.A Guatraché (Provincia de La Pampa)

I.1 (b) Muestreo

Se recolectaron un total de 79 muestras de 33 establecimientos productores de salames artesanales, que no utilizan cultivos iniciadores para la formación del emplume de los mismos.

Los establecimientos productores fueron muestreados entre los meses de Julio del año 2010 y Noviembre del año 2011, se encuentran ubicados en localidades productoras de la República Argentina mencionadas en el ítem I.1.

I.1 c) Caracterización Morfológica de la micobiota del emplume de las muestras de embutidos secos fermentados artesanales.

I.1 c) (I) Características de las muestras

Cada una de las muestras recolectadas fue conservada a 4°C, desde su obtención hasta su tratamiento.

Previamente a la extracción de la tripa, se observó la textura y el color del emplume. Se midió la longitud y el radio de cada muestra con la finalidad de calcular su área según la fórmula:

$$A \text{ (área)}: 2 \times \pi \times r \, (h+r)$$

Donde:

r: radio (cm)

h: longitud (cm)

Posteriormente se determinó el pH de las muestras con un pHmetro Lutron PH-206 con electrodo de punta para alimentos sólidos. Para la determinación se cortó cada muestra por la mitad, y se introdujo el electrodo en 5 lugares distintos de la misma: tres puntos en los bordes y 2 puntos en el centro. El promedio de las 5 determinaciones se consideró el pH de la muestra.

I.1 c) (II) Recuento total de hongos filamentosos y levaduras sobre la superficie de los embutidos.

A cada una de las muestras obtenidas se les extrajo la tripa, utilizando un bisturí esterilizado sin dañar el emplume.

Las tripas obtenidas fueron colocadas en bolsas estériles a las cuales se agregó 200 ml de agua de peptona 0,1% (p/v). Fueron homogeneizadas en stomacher durante 1 minuto.

A partir de la solución de esporas obtenida se realizaron diluciones seriadas en tubos conteniendo 9,0 ml de agua peptona 0,1% (p/v).

De cada dilución se transfirieron 0,1 ml a placas de Petri conteniendo Agar Dicloran Glicerol 18% (DG18, Anexo I) y 0,1 ml en Agar Extracto de Malta (MEA, Anexo I) y se realizó siembra en superficie con espátula de Drigalsky, en ambos casos los cultivos se realizaron por duplicado e incubados a 25°C durante 7 días.

Una vez obtenidos los cultivos en ambos medios, se seleccionaron aquellas placas conteniendo 10-100 unidades formadoras de colonias (UFC) para llevar a cabo el recuento.

El recuento total de hongos filamentosos y levaduras, para cada una de las muestras se expresó en UFC/cm^2, para lo cual se tuvo en cuenta además del número de colonias por dilución, el área de cada muestra (inciso I.3 a), según se expresa en la siguiente fórmula:

$$\text{Recuento total:} \quad \frac{(UFC \times 10 \times 10^{n°\text{de dilución}}) \times 200}{2 \times \pi \times r\,(h+r)}$$

r: radio del salame

h: longitud del salame

I.1 c) (III) Identificación de géneros fúngicos y recuento por géneros

Con el objeto de obtener un cultivo puro, libre de contaminación y que permita una identificación adecuada, las colonias con diferente aspecto macroscópico encontradas en las placas de recuento fueron aisladas por inoculación con ansa de aguja de las esporas, en tres puntos equidistantes en placas standard (90 mm) conteniendo medio MEA (Agar Extracto de Malta). Las placas fueron incubadas 7 días a 25°C. La pureza de las colonias fue constatada por la uniformidad en la apariencia de las mismas luego de alcanzado el tiempo de incubación.

La identificación de los géneros fúngicos aislados se realizó teniendo en cuenta sus características macroscópicas y microscópicas según la clave para la identificación de Géneros fúngicos de Samson y col.,1995 (Anexo II).

El recuento de los géneros fúngicos se realizó teniendo en cuenta el número de aislamientos sobre el total de muestras analizada.

I.1 c) (IV) Aislamiento e identificación de especies fúngicas y recuento por especie.

Para identificar las especies fúngicas, las colonias de cada género aisladas en el inciso 3) ii fueron identificadas de acuerdo a los procedimientos descriptos por Pitt y Hocking (2001). Anexo II.

Los tres medios y temperaturas utilizados fueron:

- CYA (Czapek Yeast Extract Agar) usado a 25°C, a 5°C y a 37°C.
- MEA (Malt Extract Agar) usado a 25°C.
- G25N (25% Glicerol Nitrate Agar) usado a 25°C.

Como medio adicional de identificación se utilizó el Agar Neutro Creatinina Sacarosa (CSN) incubado a 25°C (Anexo I).

La identificación se llevó a cabo por inoculación con ansa aguja de los cultivos siguiendo el esquema que muestra la figura 10.

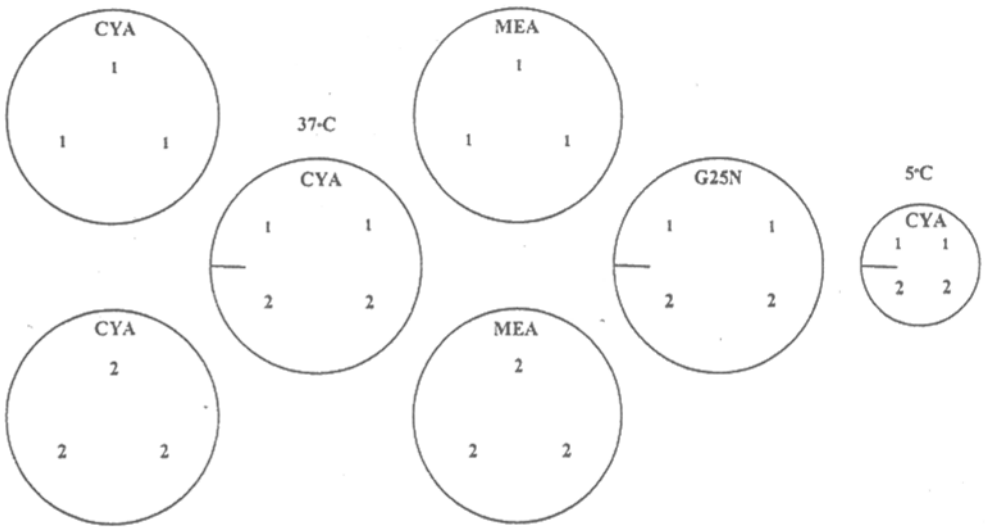


Figura 10: Diagrama de Identificación según Pitt y Hocking (1997)

Las placas de Petri de CYA y MEA que se incubaron a 25°C fueron inoculadas en tres puntos equidistantes desde el centro de cada placa, en placas de vidrio (para evitar la dispersión estática de esporas facilitando la medición de las colonias) de diámetro standard (90-100 mm). Las placas de G25N y CYA (37°C) se inocularon en dos puntos en placas de diámetro similar de plástico. A 5 °C se usaron placas de diámetro más pequeño (50-60 mm) de plástico debido a que el crecimiento en esa temperatura es mínimo.

Todas las placas se incubaron durante 7 días en bolsas de polietileno para prevenir la evaporación y secado de los medios.

Para la identificación se consideraron:

- **Características macroscópicas de las colonias:**
  - ✓ Diámetro.
  - ✓ Coloración del anverso y el reverso.
  - ✓ Textura.
  - ✓ Presencia de surcos.
  - ✓ Presencia de exudado.
  - ✓ Presencia de pigmento.

- **Características microscópicas de las colonias:**

Se observó la estructura del conidióforo de cada uno de los aislamientos crecidos en CYA y MEA a 25°C. Para lo cual se realizaron preparados microscópicos extrayendo con ansa aguja porciones de material de la periferia de cada colonia, asegurando de ésta manera la presencia de estructuras esporuladas y esporas. El material obtenido se colocó sobre portaobjetos y se tiñó con colorante azul de algodón.

Las estructuras se observaron con un aumento de 10X y 40X.

Con los resultados obtenidos se accedió a las claves de Pitt y Hocking (2000), para obtener la identificación a nivel de especie (Anexo II).

Para cada una de las especies fúngicas aisladas se realizó el cálculo de la frecuencia (Fr) y la predominancia o densidad relativa (Dr) teniendo en cuenta las siguientes fórmulas (Gonzalez y col., 1990; Pacin y col..2003; Saleemi y col;2010),

$$Fr = \frac{\text{N° de muestras con 1 género o especie}}{\text{N° total de muestras}} \times 100$$

$$Dr = \frac{\text{N° de aislamientos de 1 género o especie}}{\text{N° total de aislamientos}} \times 100$$

I.1 c) (V) Determinación de Biotipos de *Penicillium nalgiovense*

Con el fin de determinar el biotipo correspondiente a cada uno de los aislamientos de *Penicillium nalgiovense* se siguió la metodología propuesta por Fink-Gremmels (1988)(Tabla 5)

	Colonias en MEA	Color de las colonias	Grado de desarrollo de los conidios
A- Agar extracto de malta Colonias grandes (20- 26 mm)			
Biotipo 1		CYA: turquesa MEA: verde	+++ +++
Biotipo 2		CYA: Blanco MEA: Azul	+ +
Biotipo 3		CYA: blanco MEA: blanco o azul pálido	+ +
B- Agar extracto de malta Colonias pequeñas (10-20 mm)			
Biotipo 4		CYA: turquesa MEA: verde	+++ +++
Biotipo 5		CYA: verde MEA: verde	+
Biotipo 6		CYA: blanco MEA: amarillento	+

Tabla 5: Biotipos de *Penicillium nalgiovense* adaptado de Fink-Gremmels (1988)

I.1 d) Conservación de los aislamientos.

Los aislamientos de cada uno de los géneros y especies obtenidos a partir del análisis de las muestras se conservaron:

- En crioviales conteniendo agua destilada estéril. Para ello se crecieron cultivos puros de los aislamientos en placas con medio MEA durante 7 días a 25°C. A partir de los mismos se tomaron porciones de micelio con sacabocado estéril, las cuales se colocaron en los viales. Se guardaron a 4°C.
- Los mismos cultivos puros se utilizaron para obtener esporas que se tomaron de la superficie de los micelios con ansa ojal estéril y se depositaron en crioviales conteniendo glicerol al 18%. Se guardaron en freezer a -20°C.
- Los aislamientos de *Penicillium nalgiovense* fueron guardados además en crioviales con glicerol al 18% en freezer a -80°C.
- Los aislamientos del género *Mucor* fueron guardados en crioviales con agar al 2% y conservados a -20°C.

I.2 Resultados y discusión

I. 2 a) Caracterización Climática y Biogeográfica de las regiones de estudio.

Ubicación geográfica.

Las localidades de donde se obtuvieron las muestras del presente trabajo se encuentran ubicadas en la denominada "Región Pampeana" en la zona centro - este de la República Argentina. (Figura 11).

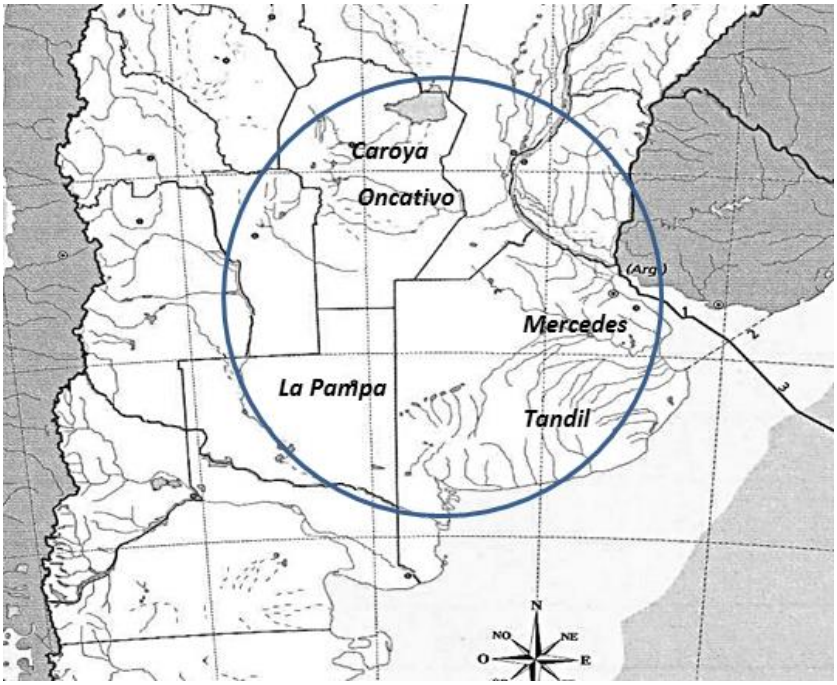


Figura 11: Región Pampeana. Ubicación geográfica de las áreas de estudio

La ubicación exacta de las localidades de estudio se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 6: Coordenadas de ubicación geográfica por localidad

Localidad	***Colonia Caroya***	***Oncativo***	***Tandil***	***Mercedes***	***La Pampa(NE)***
Provincia	Córdoba	Córdoba	Buenos Aires	Buenos Aires	La pampa
Latitud	31°2´ Sur	31°55´ sur	37º20' Sur	34°39´Sur	36°37´Sur
Longitud	64°5´Oeste	63°40´Oeste	59º08' Oeste	59°25´Oeste	64°17´Oeste
Altitud	491msnm	282msnm	188msnm	38msnm	195msnm

I.1.b. Clima y regiones biogeográficas

Colonia Caroya y Oncativo:

Ambas localidades se encuentran ubicadas en la Provincia de Córdoba, en la región Biogeográfica del Espinal.

La región se ubica dentro del clima templado continental semiseco con tendencia subhúmedo con 50 a 100 mm de déficit hídrico anual. Tiene verano cálido e invierno frío, no riguroso. Hay predominio de vientos del nordeste. En invierno son más frecuentes los vientos del sur. La velocidad media del viento es de 12 km/h

- Temperatura media anual: 18 °C, máxima media anual 26 °C, la mínima media anual 10 °C.
- Lluvias: en la isohieta de 700 a 800 mm (se producen en verano y principios de otoño)
- Período libre de heladas: de octubre hasta la 1ª quincena de mayo.

Tandil:

Se encuentra ubicada en la provincia de Buenos Aires en la región Biogeográfica del pastizal Pampeano. El clima es templado y húmedo, sin situaciones extremas. La acción moderadora del mar se manifiesta restando rigurosidad al invierno.

- Temperatura media anual: 14°C, máxima media anual 20°C, mínima media anual 7°C.
- Lluvias: Las precipitaciones medias anuales son de 800 mm. Con un régimen isohigro (regular).
- Humedad relativa media anual: 77%

Mercedes:

Se ubica en la Provincia de Buenos Aires, en la región Biogeográfica del pastizal Pampeano con un clima templado húmedo de llanura. Recibe la influencia de vientos húmedos provenientes del Atlántico y vientos húmedos locales del mar y el Río de La Plata que moderan la temperatura. Vientos secos y frescos del sudoeste son causantes de cambios bruscos de temperatura.

- Temperatura media anual: de 16,5°C, mínima media anual: 9°C, máxima media anual: 23°C.
- Lluvias: precipitaciones media anuales de 1000 mm, concentrándose en los meses de enero, febrero, marzo y octubre.
- Humedad relativa media anual: 79%

NE de La Pampa:

Ubicada en la Provincia de La Pampa, en la región Biogeográfica del pastizal pampeano, con clima templado húmedo. Predominan los vientos fríos provenientes de la Antártida y conocidos con el nombre de “Pampero” que producen rápidos descensos de temperatura.

- Temperatura media anual: 24°C, mínima media anual: 7°C, máxima media anual: 40°C
- Lluvias: las precipitaciones superan los 800 mm anuales en el noreste de la provincia.
- Humedad relativa media anual: 68%

I.2 (b) Muestreo

En la siguiente tabla se discriminan las muestras recolectadas según su procedencia:

Provincia de procedencia	*Localidad de procedencia*	*Número de establecimientos muestreados*	*Número de muestras obtenidas*
Córdoba	Colonia Caroya	10	30
	Oncativo	8	17
Buenos Aires	Tandil	5	15
	Mercedes	4	8
La Pampa	Colonia Barón	1	1
	General Campos	1	2
	Santa Rosa	1	1
	Jacinto Arauz	1	2
	Alpachiri	1	1
	Embajador Martini	1	2

Tabla 7: Muestreo. Se detalla Provincia, Localidad, número de establecimientos muestreados y número de muestras obtenidas.

I.2 c) Caracterización Morfológica de la micobiota del emplume de las muestras de embutidos secos fermentados artesanales

I.2 c) (I) Características de las muestras

Provincia	*Localidad*	*Características de la muestra*	
Córdoba	*Colonia Caroya*	**pH promedio**: 6,46 **Area promedio**: 290 cm^2 **Emplume**: Con zonas de color blanco y turquesa, desparejo.	
	Oncativo	**pH promedio**: 6,90 **Area promedio**: 295 cm^2 **Emplume**: con zonas de color blanco, verdoso, homogéneo.	
Buenos Aires	*Tandil*	**pH promedio**: 5,89 **Area promedio**: 167,39 cm^2 **Emplume**: de color blanco azulado, desparejo.	
	Mercedes	**pH promedio**: 6,44 **Area promedio**: 269 cm^2 **Emplume**: de color verde claro, homogéneo.	
La Pampa	*Noreste de La Pampa*	**pH promedio**: 6,16 **Area promedio**: 323 cm^2 **Emplume**: de color blanco azulado, homogéneo.	

Tabla 8: Características de las muestras por Provincia y localidad de origen

I.2 c) (II) Recuento total de hongos filamentosos y levaduras sobre la superficie de los embutidos

Se analizaron los resultados obtenidos del estudio de 79 muestras de embutidos secos fermentados artesanales cuyos datos individuales de recuento total y por género se presentan en el Anexo III. El recuento se realizó en diferentes diluciones y se seleccionaron aquellas placas que arrojaron valores entre 10 y 100 colonias por placa (Figura 12)

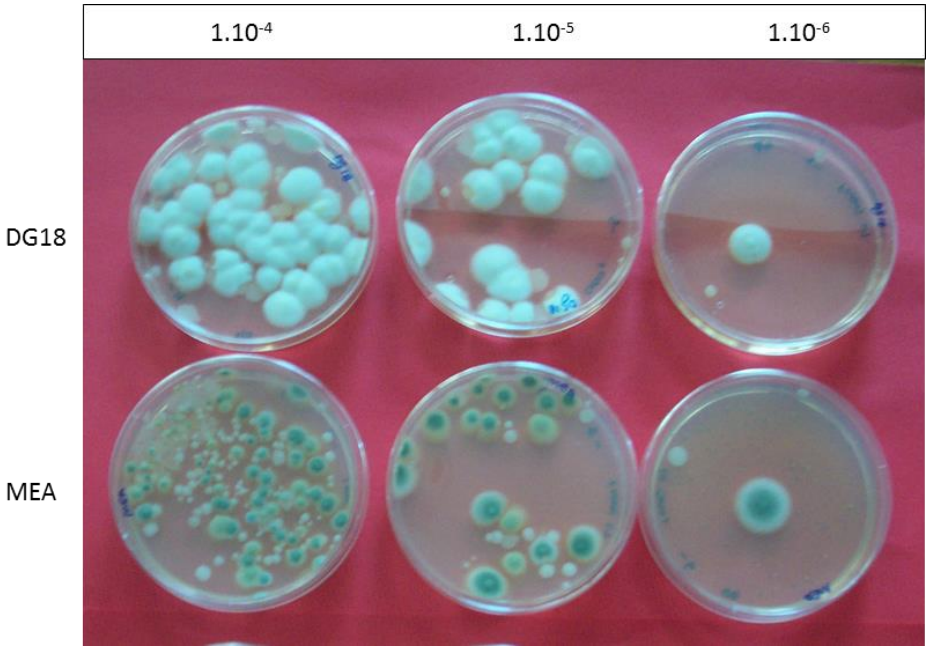


Figura 12: Placas de recuento en DG18 y MEA para diferentes diluciones estudiadas.

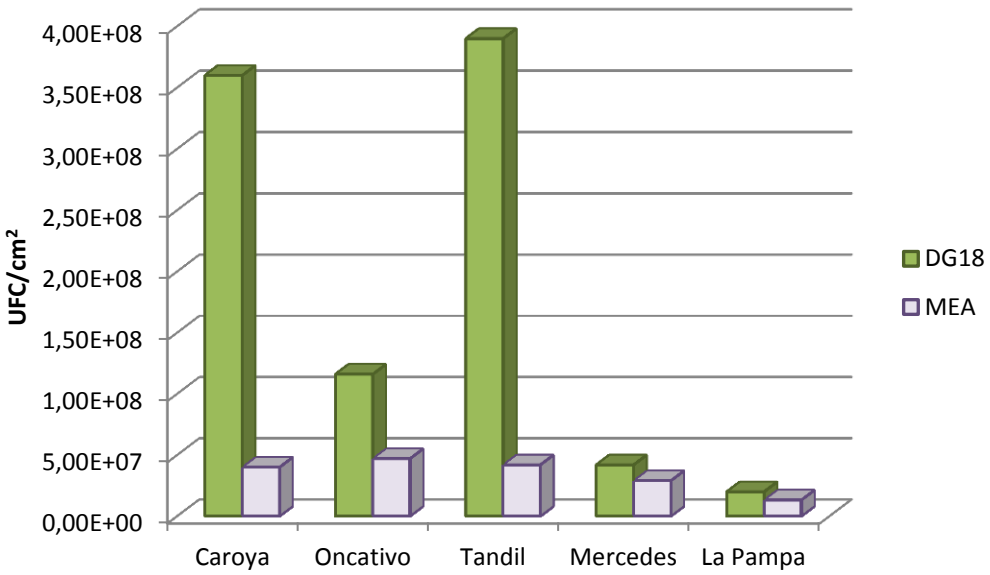
En la tabla 9 se pueden observar los valores promedio para el recuento total de Hongos Filamentosos obtenidos para cada una de las localidades de estudio, a partir de los cultivos en los medios DG18 y MEA, ambos expresados en UFC/cm^2.

Recuento Total de Hongos Filamentosos										
Localidades		***Colonia Caroya***		***Oncativo***		***Tandil***		***Mercedes***		***La Pampa***	
Nº de muestras		30		17		15		8		9	
Medio		***DG18***	***MEA***	***DG18***	***MEA***	***DG18***	***MEA***	***DG18***	***MEA***	***DG18***	***MEA***
Recuentos (UFC/cm)^2	***Mínimo***	2.10^5	$5{,}8.10^4$	$1{,}09.10^7$	$2{,}5.10^6$	1.10^4	$9.2.10^5$	$6{,}2.10^6$	$6{,}8.10^6$	$6{,}5.10^5$	$1{,}3.10^5$
	Máximo	$5{,}9.10^8$	$1{,}6.10^8$	$2{,}23.10^8$	$9{,}4.10^7$	$7{,}9.10^8$	$8.5.10^7$	$7{,}8.10^7$	$5{,}2.10^7$	$5{,}7.10^7$	$5{,}2.10^7$
	Promedio	$3{,}6.10^8$	4.10^7	$1{,}16.10^8$	$4{,}7.10^7$	$3{,}9.10^8$	$4.2.10^7$	$4{,}2.10^7$	$2{,}9.10^7$	2.10^7	2.10^7

Tabla 9: Recuento total de flora fúngica. Se indican valores Mínimos, Máximos y Promedio en UFC/cm^2 para cada una de las regiones de estudio.

El recuento total en DG18 se encontró entre 10^4 y 10^8 UFC/cm^2, siendo el promedio $1{,}8.10^8$ UFC/cm^2, observándose mayor número y desarrollo de colonias fúngicas en comparación con el medio MEA donde el recuento total varía en el rango de 10^5 y 10^7 UFC/cm^2, siendo el promedio $3{,}4.\ 10^7$ UFC/cm^2.

Figura 13: Perfil de los valores promedio del recuento total de Hongos filamentosos en CYA y MEA para cada una de las regiones de estudio



Respecto al desarrollo de la flora fúngica en los distintos medios de cultivo utilizados, se observa un mayor desarrollo fúngico en el medio DG18 en las localidades de Colonia Caroya (Provincia de Córdoba) y Tandil (Provincia de Buenos Aires), siendo menor el desarrollo fúngico en el mismo medio en Oncativo (Provincia de Córdoba), Mercedes (Provincia de Buenos Aires) y en la Provincia de La Pampa (Figura 13)

El recuento de levaduras en el medio de cultivo DG18 se encontró entre 10^6UFC/cm^2 y 10^7UFC/cm^2, siendo el promedio 3,54. 10^7UFC/cm^2. En el medio de cultivo MEA el recuento se encontró entre 10^6UFC/cm^2 y 10^8UFC/cm^2, siendo el promedio 7,26. 10^8UFC/cm^2. En éste medio se observó mayor desarrollo de levaduras (Tabla 10)

Recuento Total de Levaduras										
Localidades		***Colonia Caroya***		***Oncativo***		***Tandil***		***Mercedes***		***La Pampa***	
Nº de muestras		30		17		15		8		9	
Medio		***DG18***	***MEA***	***DG18***	***MEA***	***DG18***	***MEA***	***DG18***	***MEA***	***DG18***	***MEA***
Recuentos (UFC/cm)²	***Mínimo***	$1{,}8.10^6$	2.10^7	$2{,}03.10^6$	$2{,}34.10^6$	$1{,}24.10^7$	$1{,}36.10^7$	$1{,}34.10^7$	$3{,}28.10^7$	$5{,}79.10^6$	$2{,}55.10^6$
	Máximo	$1{,}9.10^8$	$1{,}5.10^8$	$2{,}81.10^8$	$1{,}64.10^8$	$5{,}98.10^7$	$1{,}8.10^8$	$6{,}56.10^7$	$6{,}88.10^8$	$8{,}8.10^7$	$5{,}9.10^8$
	Promedio	$5{,}4.10^7$	3.10^7	$7{,}66.10^7$	$4{,}97.10^7$	$3{,}50.10^7$	$8{,}59.10^7$	$3{,}08.10^7$	$3{,}59.10^8$	$3{,}21.10^7$	$2{,}02.10^8$

Tabla 10: Tabla de recuento de levaduras por localidad

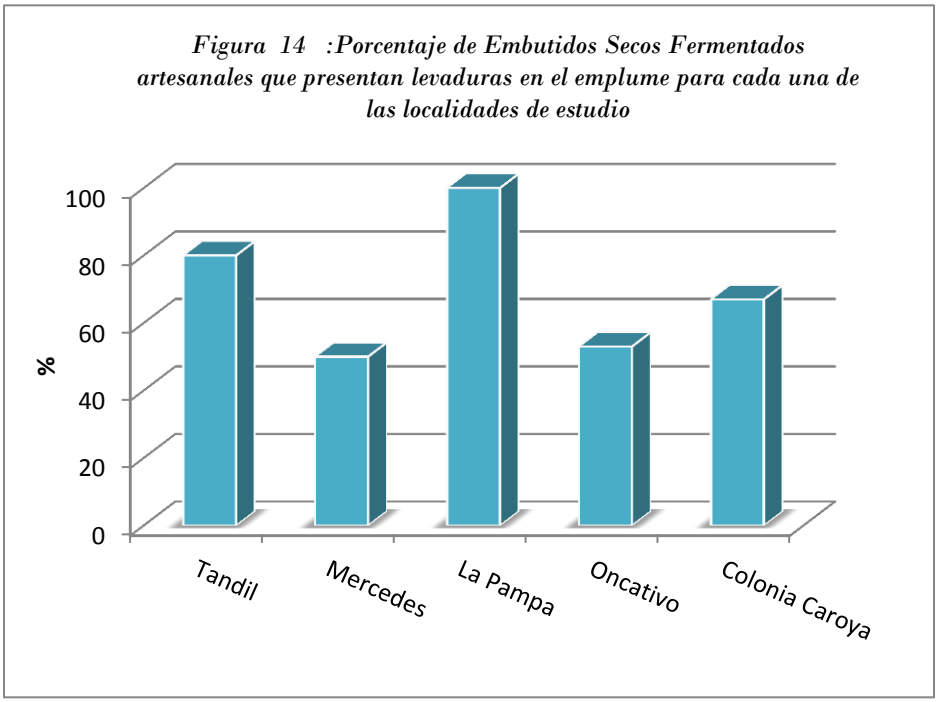
La presencia de levaduras en la superficie de los embutidos secos fermentados contribuye de manera favorable durante el período de maduración al aroma y sabor de los mismos así como también permite la formación de una cubierta protectora que impide la desecación del producto (Lucke, 1987). Sus propiedades han sido reportadas por numerosos estudios, en los mismos se encontró que la concentración de levaduras de los géneros *Debaryomyces y Cándida* durante el proceso de maduración aumenta, junto con los hongos en especial hacia el final del proceso, sugiriendo su intervención en las propiedades sensoriales del producto (Cukon. N.y col.,2012; Dalla Santa. O y col.,2011). Similares resultados se obtuvieron en estudios realizados en jamones curados de Italia (Simoncini. N y col., 2007; Berni E y col., 2012). Existen estudios que comprueban la influencia de levaduras del género *Debaryomyces* en la generación de compuestos volátiles durante la maduración de salames y la inhibición de la formación de productos de oxidación de lípidos (Flores. M y col., 2004).

En nuestro trabajo pudimos observar que sobre un total de 79 muestras de embutidos secos fermentados artesanales estudiados el 68 % (54 muestras) presentan levaduras en el emplume junto con hongos filamentosos.

Las localidades de la provincia de La Pampa se caracterizan por presentar levaduras en el 100% las muestras. Le siguen la localidad de Tandil con un 80% de las muestras con levaduras, Colonia Caroya con un 67% de las muestras con levaduras, Oncativo y Mercedes con 53% y 50% de las muestras con levaduras respectivamente (Figura 14)

No se observa relación entre la localización geográfica de las muestras y el porcentaje de éstas con levaduras en su emplume, de lo cual podemos implicar que el desarrollo de las mismas depende de las condiciones ambientales del lugar donde se produjo la maduración, como son temperatura, porcentaje de humedad y actividad de agua, siendo independiente de la ubicación geográfica de las localidades estudiadas. Estos resultados son coincidentes con investigaciones llevadas a cabo en embutidos cárnicos secos elaborados artesanalmente en la localidad de Balcarce en la Provincia de Buenos Aires donde el 100% un total de 50 muestras obtenidas en distintas estaciones del año presentaron levaduras de los géneros *Debaryomyces y Cándida* (Goicoechea A., 2010).

Figura 14 :Porcentaje de Embutidos Secos Fermentados artesanales que presentan levaduras en el emplume para cada una de las localidades de estudio



I.2 c) (III) Identificación de géneros fúngicos y recuento por géneros.

La determinación de géneros fúngicos presentes en cada una de las 79 muestras se realizó a partir del análisis de colonias con diferente aspecto macroscópico y microscópico de las placas de recuento en medio Agar Extracto de Malta (MEA).

De las 79 muestras analizadas, se obtuvieron aislamientos del género *Penicillium* en 78 de ellas, este resultado supone la presencia del género *Penicillium* en el 98,73% de las muestras analizadas. El siguiente género más frecuentemente aislado fue *Mucor* presente en 35 de las 79 muestras analizadas, lo que representa el 44,3% de las mismas. Con menor frecuencia se aislaron: *Cladosporium* en 13,92% de las muestras, *Aspergillus* en 8,86% de las muestras, *Scopulariopsis* en 5% de las muestras, *Geotrichum y Geomyces* en 1,26% de las muestras (Figura 15)

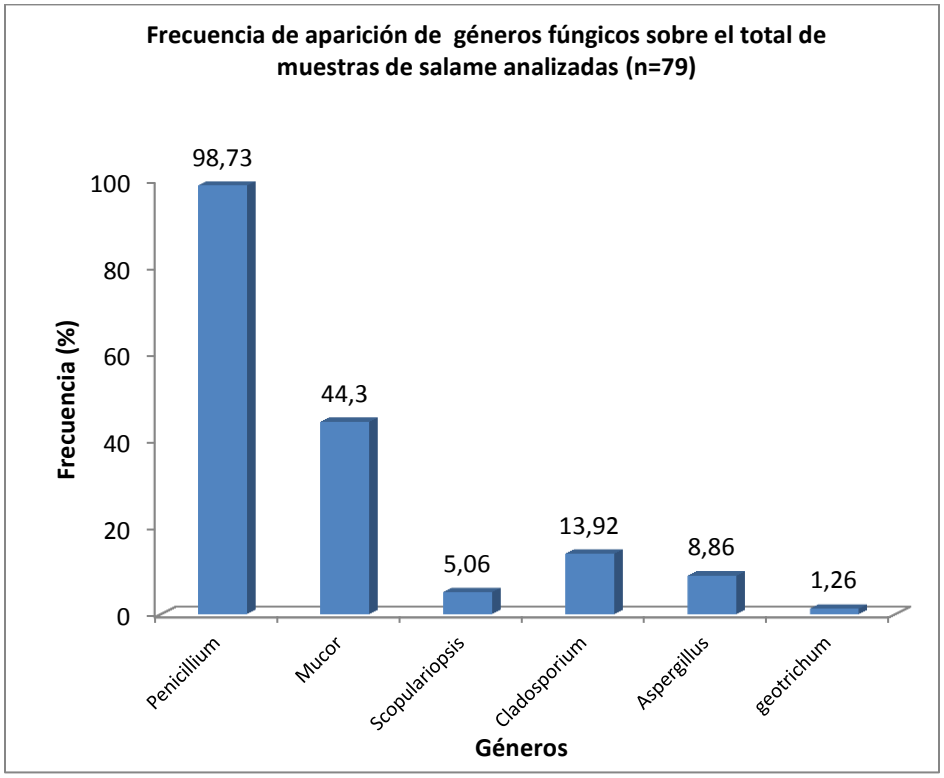
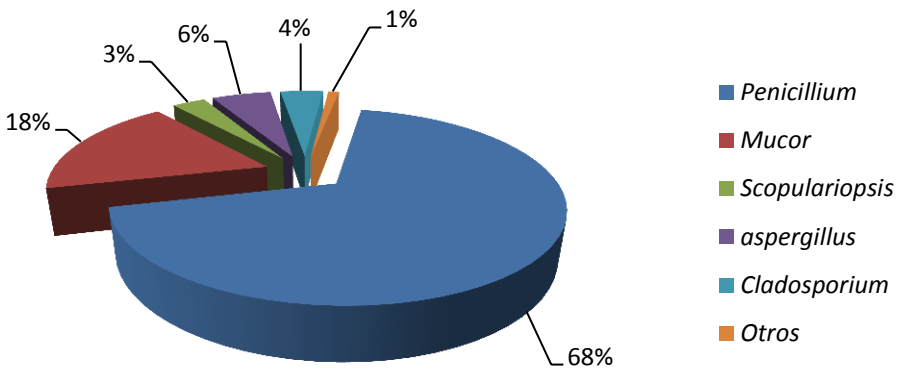


Figura 15: Frecuencia de aparición de géneros fúngicos sobre el total de muestras de embutidos secos fermentados analizadas

Respecto a los géneros fúngicos correspondientes a los 196 aislamientos obtenidos el 68% (134 aislamientos) corresponden al *Género Penicillium*, representando el mayor porcentaje de recuento. *Mucor* resulta ser el segundo género en orden de importancia con un 18% (35 aislamientos). Los restantes géneros encontrados representan porcentajes menores: Aspergillus 6% (11 aislamientos), *Cladosporium* 4% (8 aislamientos), *Scopulariopsis* 3% (6 aislamientos). Otros géneros se encuentran en porcentajes menores al 1%: *Geomyces y Geotrichum* (Figura 16).

Figura 16: Proporción del recuento por géneros fúngicos sobre el total de aislamientos
n=196



La presencia de hongos del género *Penicillium* en el emplume de embutidos secos fermentados artesanales de las localidades estudiadas es una de las características que en nuestro país otorga tipicidad a éste tipo de productos artesanales (Canel y col., 2013; Ludemann y col., 2004). Los embutidos son colonizados en éstas localidades de manera espontánea por la micobiota ambiental, de manera que los géneros aislados dependen de las condiciones ambientales de las sótanos donde se produce la maduración. El género *Penicillium* es reportado como el predominante en embutidos secos fermentados madurados por un corto período de tiempo, su presencia contribuye a otorgar aroma y sabor al

producto así como también inhibe la multiplicación de bacterias y hongos indeseables. En períodos de maduración prolongados dominan la superficie otros géneros como *Aspergillus y Eurotium* los cuales se desarrollan en sustratos con reducida actividad de agua. En nuestras muestras no se encontró el género *Eurotium*.

Estos resultados son coincidentes con diversos estudios realizados en Argentina. En el área de Tandilia en la provincia de Buenos Aires fueron estudiadas muestras provenientes de cinco plantas productoras de salames artesanales, en diferentes épocas del año y con diferentes períodos de maduración, obteniéndose *Penicillium*, como género predominante seguido de *Aspergillus, Eurotium, Mucor, Rhizopus y Cladosporium* (Castellari,C y col. 2010; Ludemann y col, 2004). Similares resultados arrojan estudios realizados en la localidad de Colonia Caroya, provincia de Córdoba (Canel ,R y col. 2013).

En otras partes del mundo los resultados son comparables. En salames de tipo italiano, analizados en Uruguay se encontraron diez especies del género *Penicillium*, siendo la más abundante *P. nalgiovense* (96% de densidad relativa) (Galvalisi, U. 2012) .En España, en la región central en Cantimpalos, provincia de Segovia el estudio de aislamientos provenientes del emplume de salames de tipo Cantimpalo indica la presencia de *Penicillium* subgénero *Penicillium* en 38 de 54 aislamientos, siendo el resto del orden Mucorales (López-Díaz, T y col. 2001). En embutidos crudos curados de Noruega sobre un total de 161 muestras fueron aislados cuatro géneros siendo el género *Penicillium* predominante en el 88,3% de los aislamientos seguido de los géneros *Cladosporium y Eurotium* (Asefa, D y col., 2009). *Penicillium* fue el género encontrado en el 90,8% de los salames tradicionales del norte de Grecia (Papagianni, M. y col.,2007).

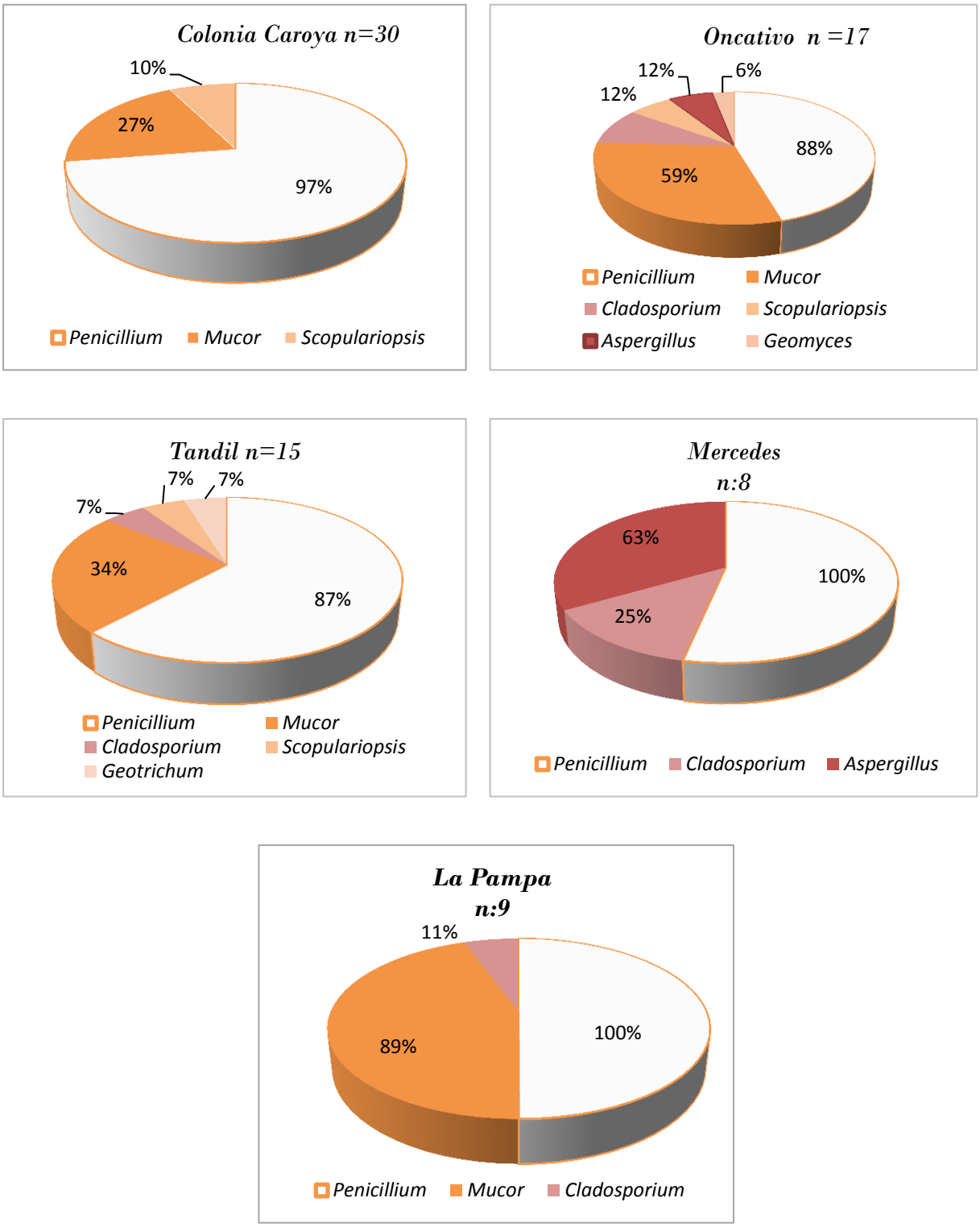
La presencia del género *Mucor* en el 44 % del total de nuestras muestras, así como también la presencia de *Scopulariopsis y Cladosporium*, puede deberse a la elevada actividad de agua (a_w) presente durante el proceso de maduración. Las esporas de éstos géneros de hongos filamentosos se encuentran en el aire

de las cuevas o cámaras de maduración y recubren la superficie de los salames como micobiota contaminante. Sorensen y col (2008) detectaron el género *Cladosporium* en muestras de aire de las cámaras de maduración de carnes curadas, similares resultados fueron reportados por Castellari y col. (2010). Aislamientos del orden Mucorales se encontraron en muestras de salames de España y fueron atribuidas a posible contaminación en el período post-producción (Lopez-Diaz y col., 2001).

Por otra parte la presencia del género *Aspergillus* en la superficie de los embutidos constituye un problema debido a la posible producción de micotoxinas y a que confiere características organolépticas indeseables en los productos. Su presencia puede atribuirse a factores como alta temperatura durante el período de maduración y como consecuencia una baja actividad de agua lo que favorecería el desarrollo de especies xerófilas (Canel y col., 2013, Castellari y col., 2010, Iacumin y col., 2009, Berni y col., 2012).

Una vez que se determinaron los géneros fúngicos sobre la totalidad de las muestras se realizó el estudio de la distribución de géneros por localidad a fin de establecer características particulares de cada una de ellas (Figura 18)

Figura 18: Frecuencia de muestras que presentan cada género aislado sobre el total de muestras de cada localidad



Del análisis de muestras de embutidos por localidad se desprende:

- En las localidades de Mercedes (provincia de Buenos Aires) y La Pampa se encuentra presente el género *Penicillium* en la totalidad (100%) de las muestras.
- En las localidades de Colonia Caroya, Tandil y Oncativo el género *Penicillium* no fue aislado en todas las muestras aunque se encontró en un porcentaje mayor al 90%.
- Las muestras provenientes de las localidades de La Pampa presentaron el género *Mucor* en el 89% de los casos. Las localidades de Colonia Caroya, Oncativo, Tandil y La Pampa presentan el género *Mucor* en un porcentaje mayor al 25 % de las muestras. La localidad de Mercedes no presenta muestras con dicho género.
- Los géneros *Cladosporium, Scopulariopsis, Geotrichum y Geomyces* se encuentran en un porcentaje menor al 15% de las muestras en todas las localidades.
- La localidad de Mercedes presenta en 5 de 8 muestras el género *Aspergillus* (63%). La localidad de Oncativo presenta el mismo género en sólo 2 de las 17 muestras analizadas equivalente a un 12%.
- Las localidades con mayor número de géneros en sus muestras son Oncativo y Tandil.

I.2 c) (IV) Aislamiento e identificación de especies fúngicas y recuento por especie.

Las colonias de cada género aisladas en el inciso 3-ii fueron utilizadas para realizar la identificación a nivel de especies. Siguiendo el método de identificación propuesto por Pitt y Hocking (2001) se obtuvieron un total de 196 aislamientos de hongos filamentosos: 57 aislamientos corresponden a la localidad de Colonia Caroya , 51 aislamientos a la localidad de Oncativo (ambas localidades situadas en la Provincia de Córdoba), 35 aislamientos corresponden a Tandil, 32 aislamientos corresponden a

Mercedes (ambas localidades situadas en la Provincia de Córdoba) y 21 aislamientos corresponden a distintas localidades de la Provincia de La Pampa.

Para cada uno de los géneros identificados, se aislaron las especies detalladas en la tabla 11, teniendo en cuenta el número de aislamientos por especie.

Género	Número de aislamientos	Género y especie	Número de aislamientos	Género y especie predominante
Penicillium	134	P. nalgiovense P. chrysogenum P. implicatum P. solitum P. brevicompactum P. griseofulvum	108 9 9 3 2 1	 P. nalgiovense
Mucor	35	M. racemosus M. circinelloides M. hiemalis M. piriformis	15 12 7 1	 M. racemosus
Aspergillus	11	A. ochraceus	11	 A. ochraceus
Cladosporium	8	C. cladosporoides C. sphaerospermum C. herbarum	5 2 1	 C. cladosporoides
	8	Otros	8	

Tabla 11: Especies aisladas a partir de las muestras de Embutidos Secos Fermentados Artesanales analizados.

Los géneros y especies identificados, fueron discriminados de acuerdo a las localidades de las cuales provienen las muestras en las que fueron aislados (Tabla 12)

Localidad	Aislamientos	Número	Total de aislamientos
Caroya	*Penicillium nalgiovense*	43	n=57
	Mucor racemosus	7	
	Scopulariopsis candida	3	
	Penicillium brevicompactum	2	
	Mucor piriformis	1	
	Mucor hiemalis	1	
Oncativo	*Penicillium nalgiovense*	25	n=51
	Mucor circinelloides	11	
	Aspergillus ochraceus	3	
	Cladosporium cladosporoides	3	
	Penicillium implicatum	2	
	Mucor racemosus	2	
	Scopulariopsis candida	2	
	Penicillium citrinum	1	
	Geotrichum candidum	1	
	Mucor hiemalis	1	
Tandil	*Penicillium nalgiovense*	16	n=35
	Penicillium chrysogenum	7	
	Mucor racemosus	6	
	Geomyces	1	
	Penicillium griseofulvum	1	
	Penicillium solitum	1	
	Penicillium citrinun	1	
	Scopulariopsis candida	1	
	Cladosporium herbarum	1	
NE La Pampa	*Penicillium nalgiovense*	10	n=21
	Mucor hiemalis	5	
	Penicillium solitum	2	
	Penicillium implicatum	1	
	Cladosporium cladosporoides	1	
	Cladosporium sphaerospermum	1	
	Mucor circinelloides	1	
Mercedes	*Penicillium nalgiovense*	14	n=32
	Aspergillus ochraceus	8	
	Penicillium implicatum	6	
	Penicillium chrysogenum	2	
	Cladosporium sphaerospermum	1	
	Cladosporium cladosporoides	1	

Tabla 12: Número y tipo de aislamientos por localidad

Teniendo en cuenta los aislamientos correspondientes a cada una de las tres provincias y sus localidades muestreadas, se analizó la frecuencia de aparición (Fr) de especies fúngicas y la densidad relativa (Dr)

En la **Provincia de Buenos Aires** se observó la siguiente distribución por localidad:

- Tandil: sobre un total de 15 muestras 10 presentaron *P. nalgiovense* como aislamiento más frecuente. En 6 de las 15 muestras fueron hallados P. *chrysogenum y M. racemosus*. Con frecuencias menores fueron hallados: *P.griseofulvum (1/15), P.citrinum (1/15), P. citrinum (1/15), S. cándida (1/15), C.herbarum (1/15) y Geomyces* sp (1/15).

  La mayor densidad relativa corresponde a *P. nalgiovense* que se encontró en 16 de los 35 aislamientos de ésta localidad.

- Mercedes: sobre un total de 8 muestras 6 presentaron *P. nalgiovense* como aislamiento más frecuente. En 5 de las 8 muestras se encontró A. ochraceus. En menor frecuencia se hallaron: P. *implicatum* (4/8*), P.chrysogenum* (1/8), *C.sphaerospermun* (1/8) y C. *cladosporoides* (1/8).

  La mayor densidad relativa corresponde a *P.nalgiovense* que se encontró en 14 de los 32 aislamientos de ésta localidad.

En la **Provincia de Córdoba** se observó la siguiente distribución por localidad:

- Colonia Caroya: sobre un total de 30 muestras 27 presentaron *P. nalgiovense* como aislamiento más frecuente. Con una frecuencia mucho menor se encontraron: M. *racemosus* (8/30), *P.brevicompactum* (2/30), *S. cándida* (2/30), *M.piriformis* y *M.hiemalis* (1/30).

  La mayor densidad relativa corresponde a *P. nalgiovense* presente en 43 de los 57 aislamientos de la localidad.

- Oncativo: sobre un total de 17 muestras 14 presentaron *P. nalgiovense* como aislamiento más frecuente, seguido *por M.circinelloides* (8/17). Con mucha menor frecuencia se aislaron *C.cladosporoides* (3/17), *A. ochraceus* (2/17), *M.racemosus* (2/17), *P.implicatum, P. citrinum, M.hiemalis, S. cándida y G. candidum* (1/17).

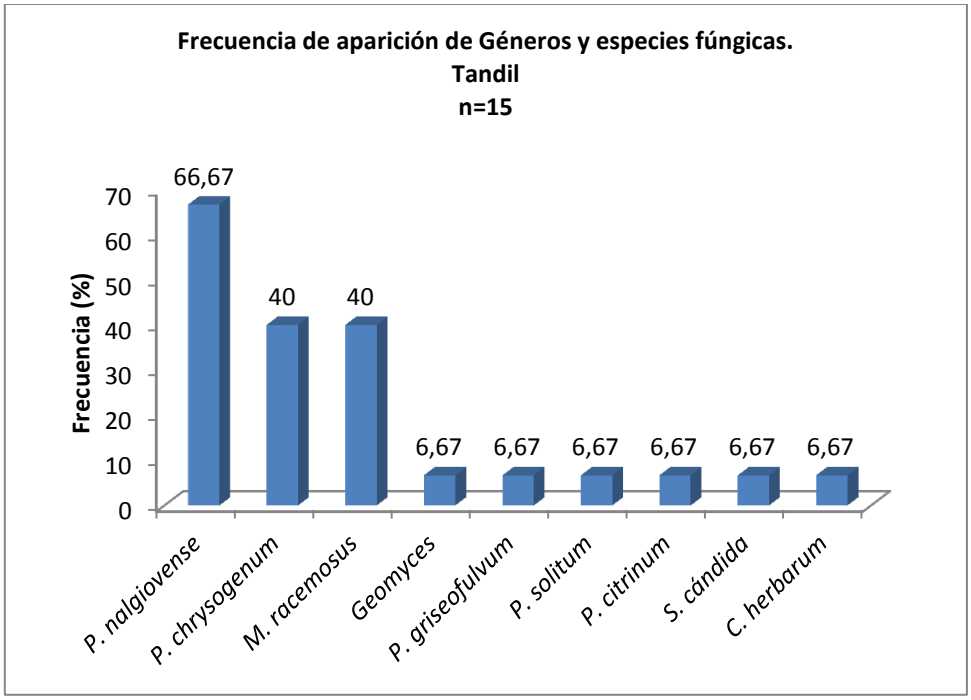
  La mayor densidad relativa corresponde a *P. nalgiovense* presente en 25 de los 51 aislamientos presentes.

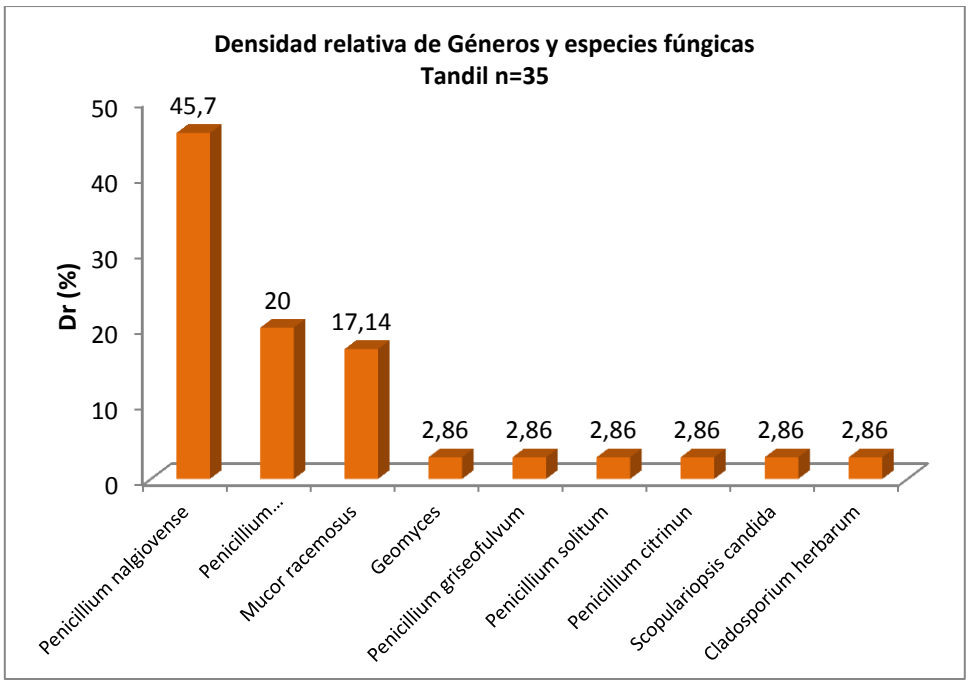
En la **Provincia de La Pampa** se observó la siguiente distribución en las localidades muestreadas:

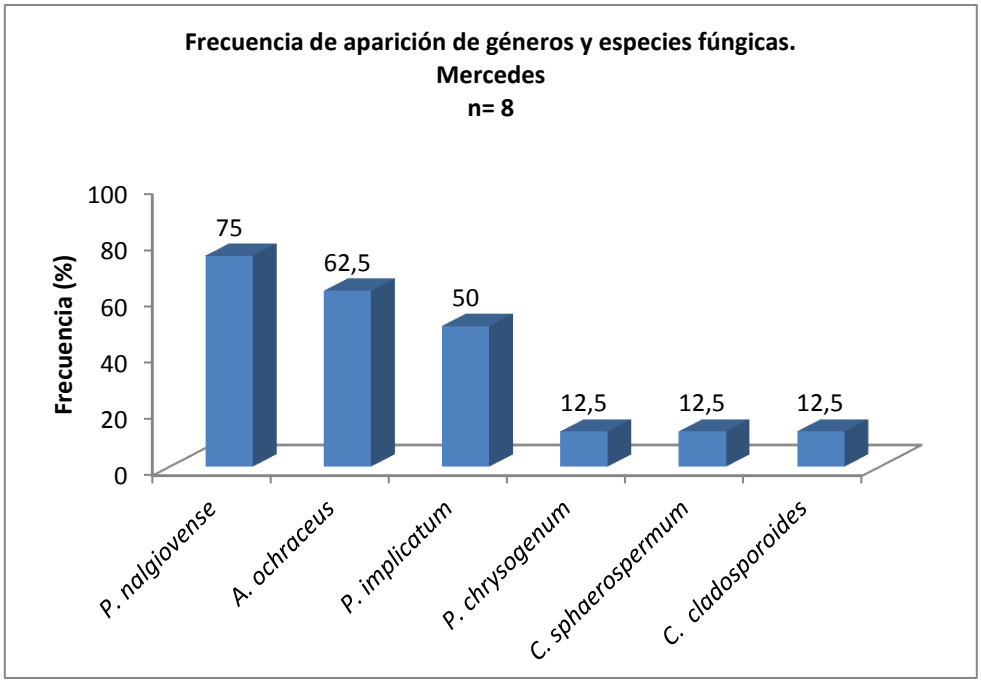
- Sobre un total de 9 muestras 8 presentaron como aislamiento más frecuente *P. nalgiovense*. En segundo lugar *M. hiemalis* (5/9). Con menor frecuencia se aislaron: *M.circinelloides (3/9), P.solitum, P.implicatum, C. cladosporoides y C. sphaerospermun* (1/9). La mayor densidad relativa corresponde a *P. nalgiovense* presente en 10 de los 21 aislamientos presentes

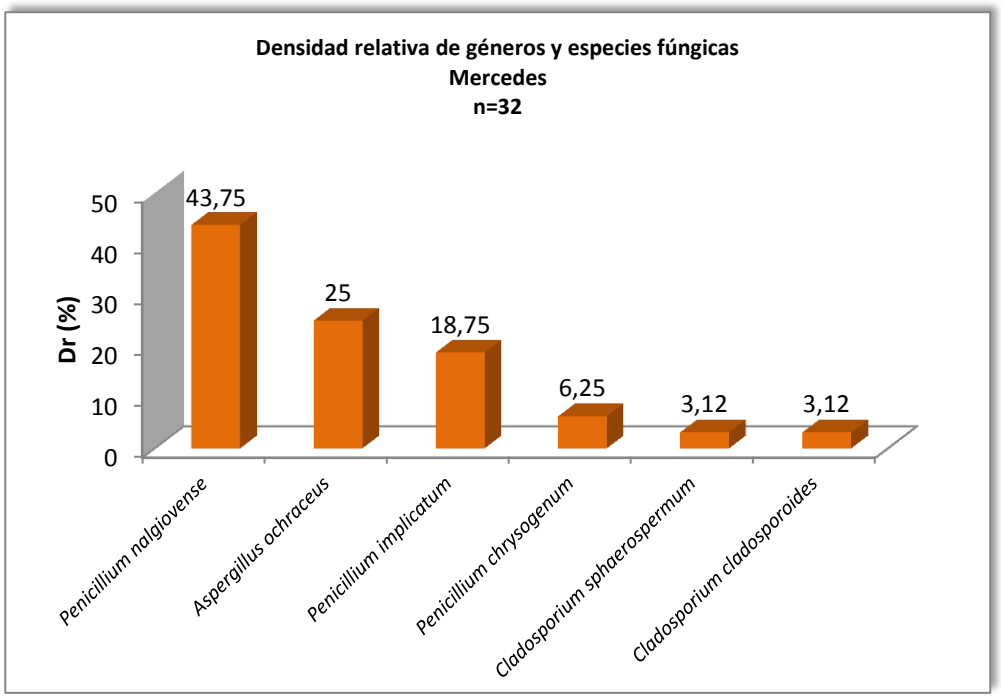
Las frecuencias relativas (Fr) y densidad relativa (Dr) distribuidas por Provincia y localidad se detallan en los siguientes gráficos:

Provincia de Buenos Aires

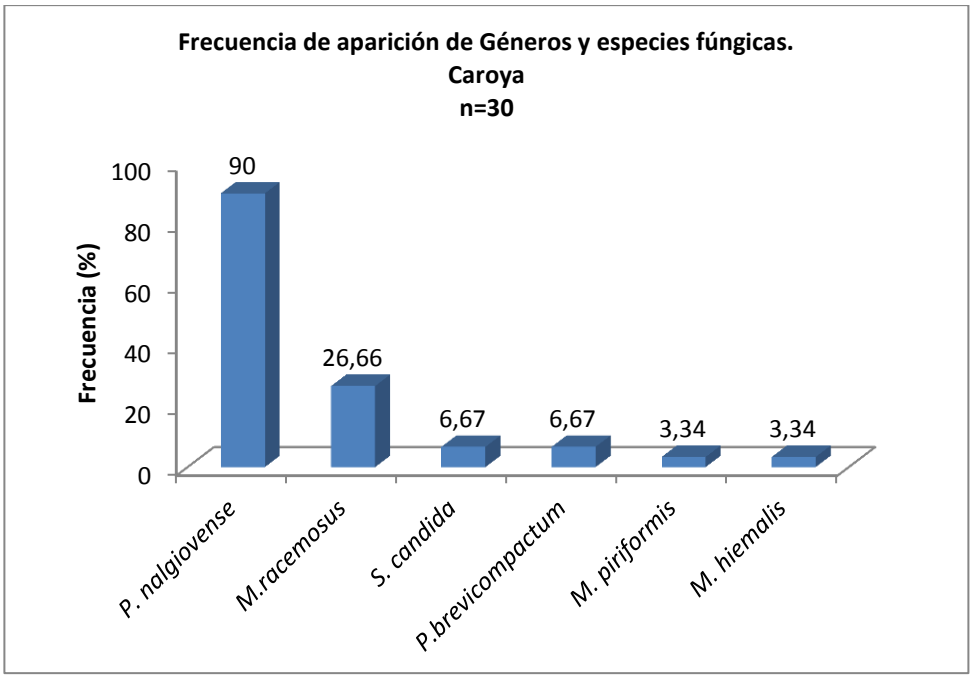


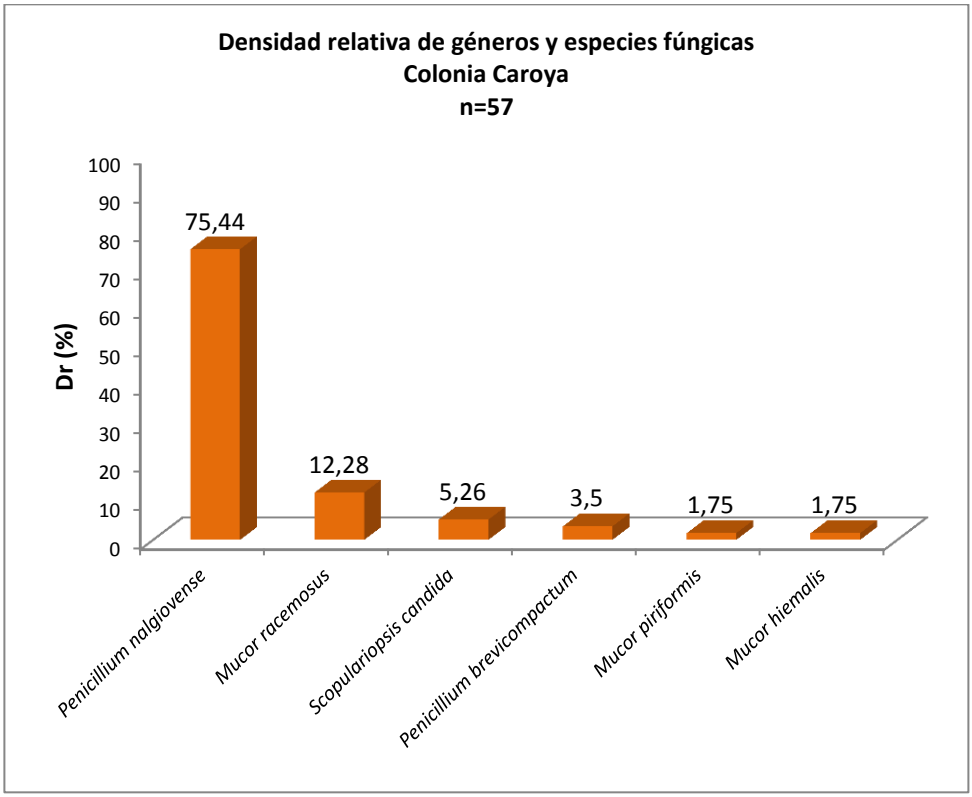


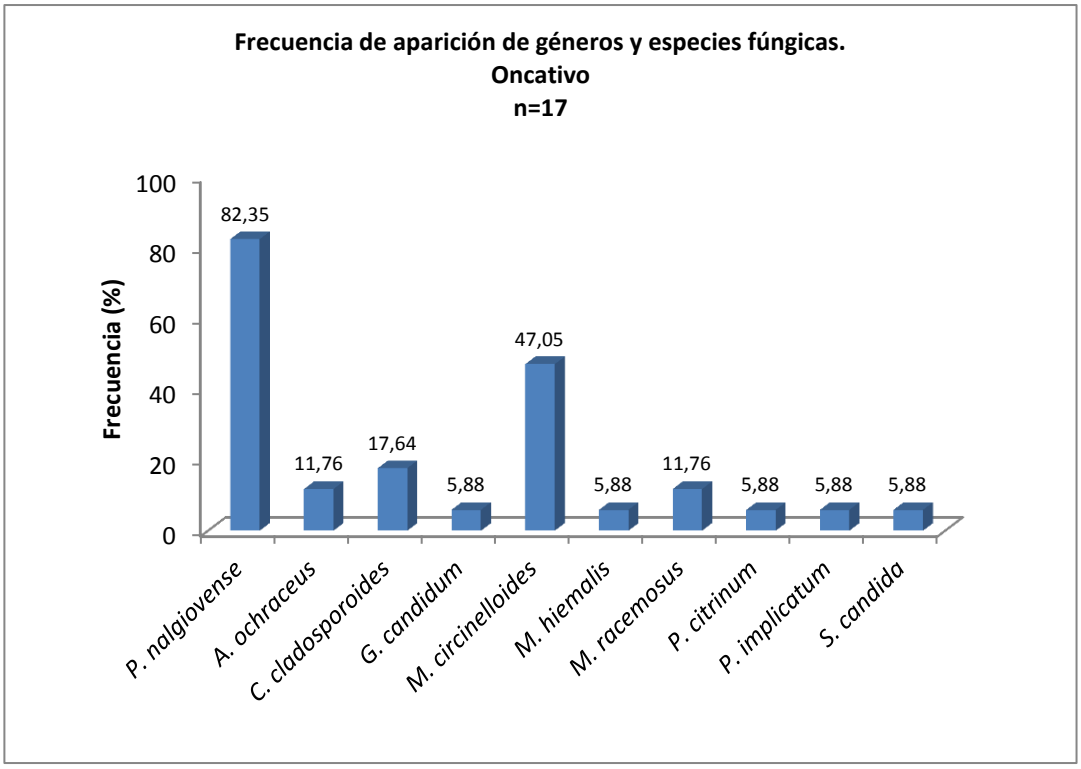

Frecuencia de aparición de géneros y especies fúngicas.
Mercedes
n= 8
Frecuencia (%)
100
80
60
40
20
0
75
62,5
50
12,5
12,5
12,5
P. nalgiovense
A. ochraceus
P. implicatum
P. chrysogenum
C. sphaerospermum
C. cladosporoides

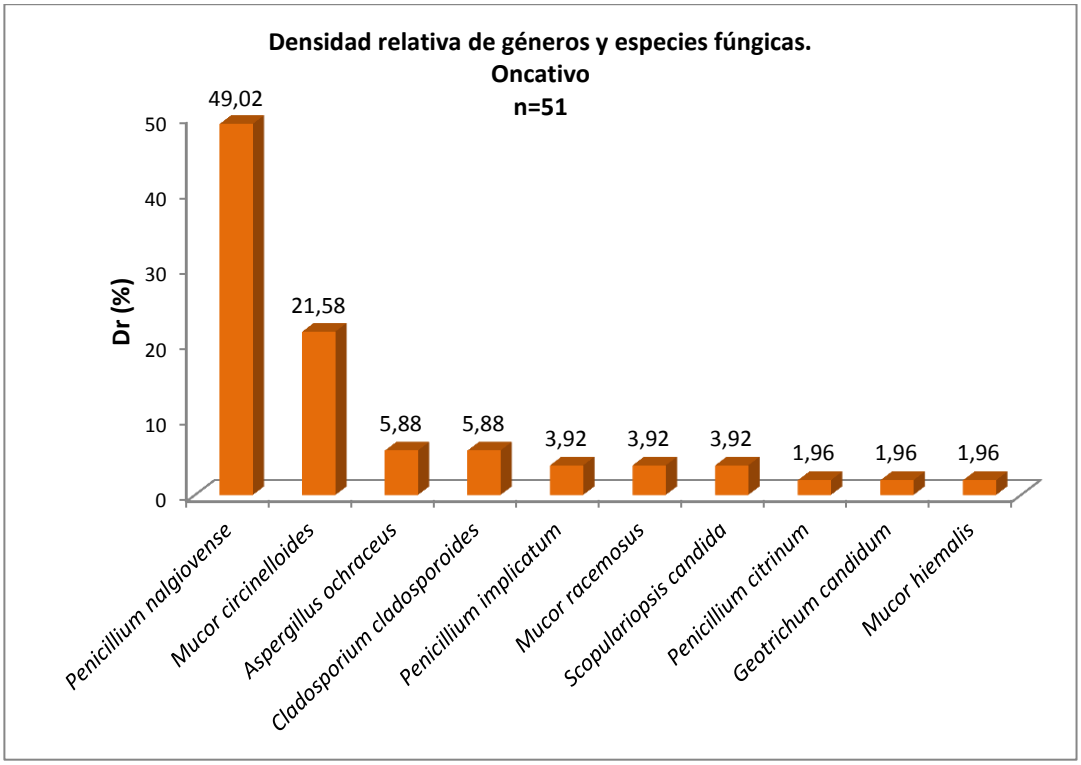

Densidad relativa de géneros y especies fúngicas
Mercedes
n=32
Dr (%)
50
40
30
20
10
0
43,75
25
18,75
6,25
3,12
3,12
Penicillium nalgiovense
Aspergillus ochraceus
Penicillium implicatum
Penicillium chrysogenum
Cladosporium sphaerospermum
Cladosporium cladosporoides

Provincia de Córdoba

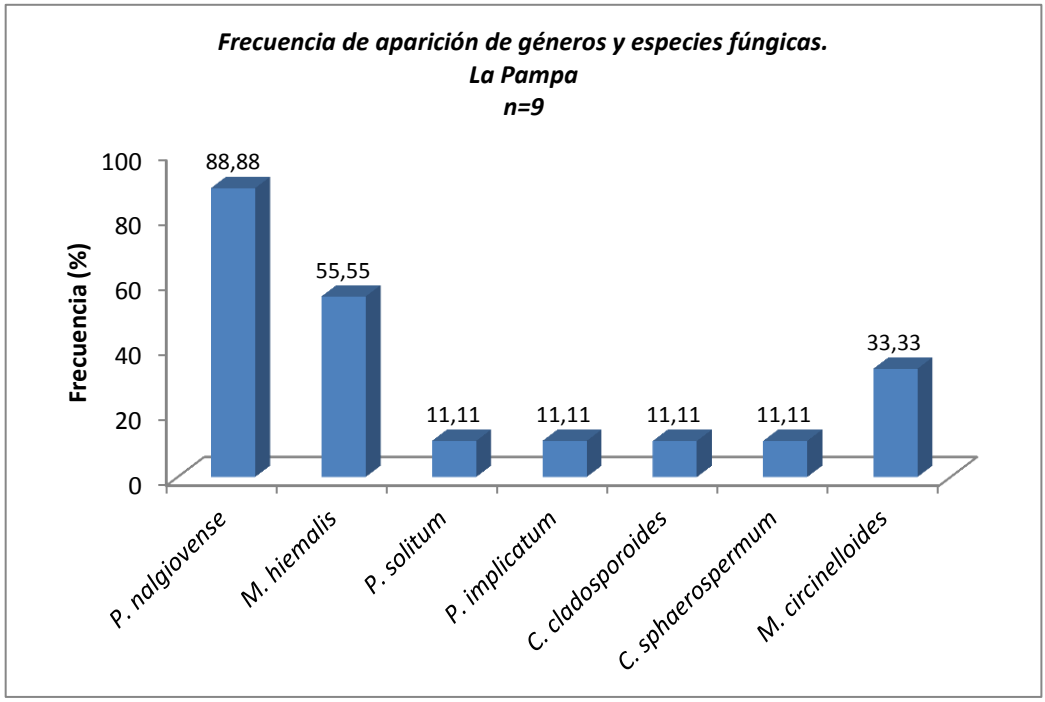


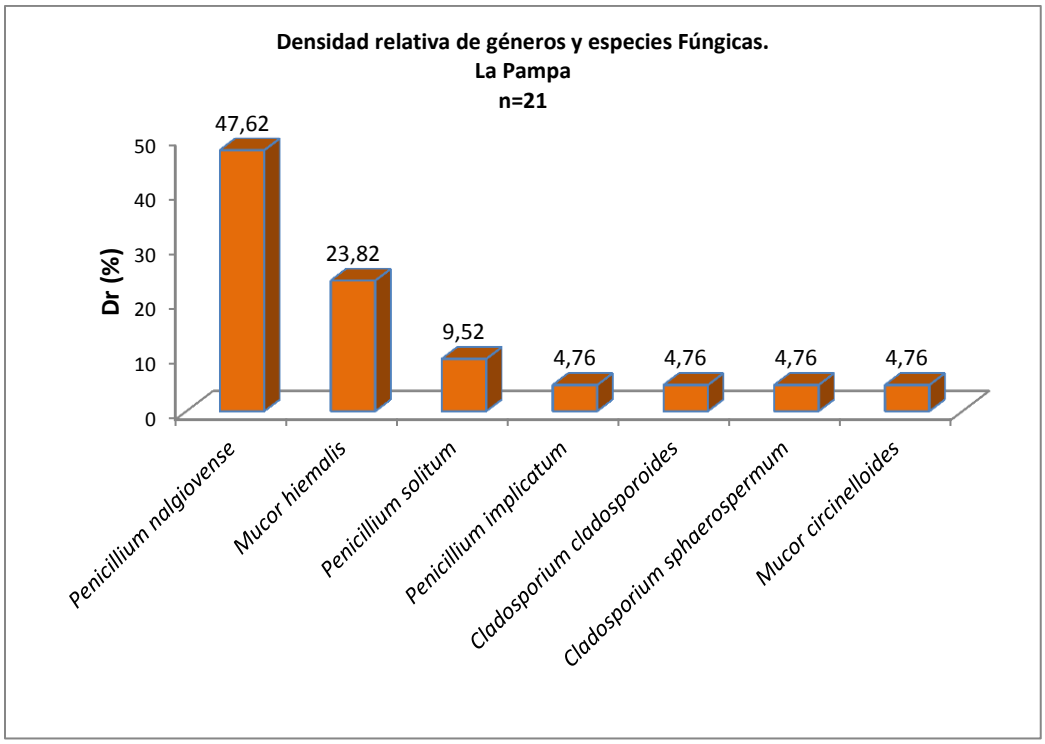



Frecuencia de aparición de géneros y especies fúngicas.
Oncativo
n=17
Frecuencia (%)
100
80
60
40
20
0
82,35
11,76
17,64
5,88
47,05
5,88
11,76
5,88
5,88
5,88
P. nalgiovense
A. ochraceus
C. cladosporoides
G. candidum
M. circinelloides
M. hiemalis
M. racemosus
P. citrinum
P. implicatum
S. candida


Densidad relativa de géneros y especies fúngicas.
Oncativo
n=51
Dr (%)
50
40
30
20
10
0
49,02
21,58
5,88
5,88
3,92
3,92
3,92
1,96
1,96
1,96
Penicillium nalgiovense
Mucor circinelloides
Aspergillus ochraceus
Cladosporium cladosporoides
Penicillium implicatum
Mucor racemosus
Scopulariopsis candida
Penicillium citrinum
Geotrichum candidum
Mucor hiemalis

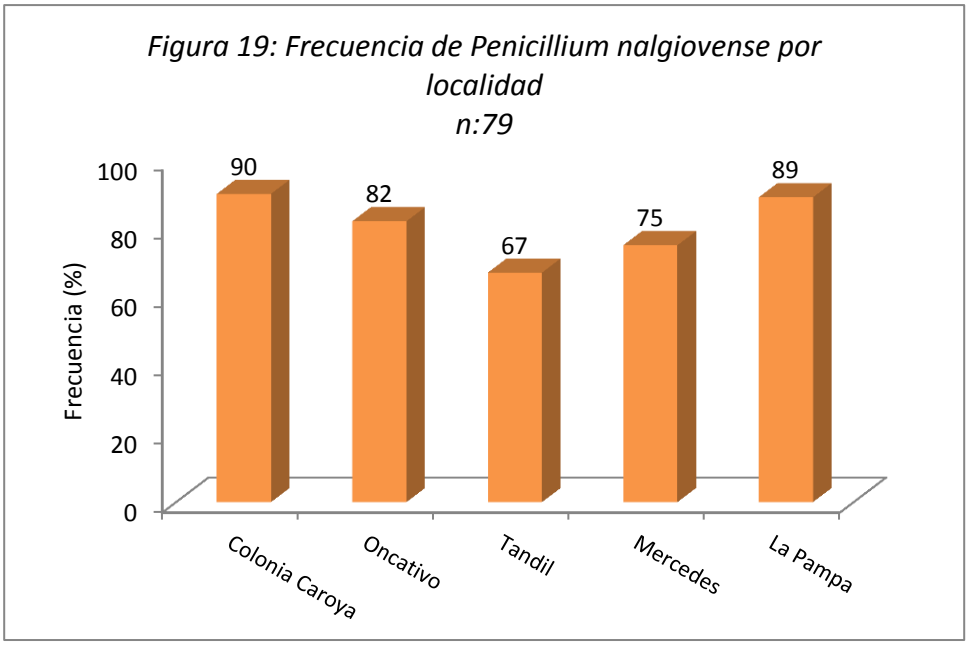
Provincia de La Pampa





Del análisis de los resultados obtenidos en nuestro trabajo se deriva que la especie más frecuente dentro del género *Penicillium es Penicillium nalgiovense*: 90% en la localidad de Colonia Caroya, 89% en las localidades de La Pampa, 82% en la localidad de Oncativo, 75% en la localidad de Mercedes y 67% en Tandil (Figura 19)

Figura 19: Frecuencia de Penicillium nalgiovense por localidad
n:79



La presencia de *Penicillium nalgiovense* como especie predominante en embutidos secos fermentados con una densidad relativa (Dr) del 75% de los aislamientos de Colonia Caroya, 50% de los aislamientos de Tandil, Oncativo, Mercedes y La Pampa es una de las características propias de los productos artesanales de la república Argentina.

La cubierta de emplume parejo otorgada por *Penicillium nalgiovense*, con colores que varían entre el blanco y el turquesa, pasando por el verde azulado proporciona no sólo un aspecto agradable a la vista sino que también contribuye a definir con precisión cualidades sensoriales distintivas según la localidad

de dónde provienen los embutidos muestreados. Otras especies del género *Penicillium* aisladas con menor frecuencia fueron: *P. chrysogenum, P.implicatum P. solitum, P.brevicompactum y P. griseofulvum.*

Estos resultados son similares a los obtenidos en la región de Tandilia en la Provincia de Buenos Aires donde Castellari y col. (2010) aislaron dicha especie con una frecuencia del 100% de las muestras en verano, junto con *P.solitum, P.chrysogenum, P. brevicompactum y P. nordicum*. En Colonia Caroya en la provincia de Buenos Aires, Canel y col (2013) aislaron *P.nalgiovense* con una densidad relativa de 47% según las estaciones del año. Similares resultados fueron reportados por Ludemann (2004) en estudios realizados en embutidos secos fermentados de la República Argentina.

Investigaciones realizadas en distintas partes del mundo en productos embutidos secos fermentados indican que los géneros y especies son los mismos a los aislados en el presente trabajo, lo que varía es la dominancia y proporción de las especies de *Penicillium* en la superficie de los embutidos.

Andersen (1995) reportó en la micoflora superficial de embutidos de Italia que el género *Penicillium* predomina en el 96% de los aislamientos siendo 50% de los aislamientos correspondientes a *P. nalgiovense y P. chrysogenum* y 15% de los aislamientos *P.olsoni*. En Grecia las especies aisladas con más frecuencia (60,6%) en salames ahumados y no ahumados fueron *P.solitum, P.nalgiovense y P.olsonii* (Papagianni M.y col.(2007). En Noruega, Asefa. D y col. (2009), aislaron a partir de 161 muestras de salame*, P. nalgiovense* con una frecuencia del 38%, *P. solitum y P. commune* con 13% y 10% respectivamente. En Eslovenia se reportó *P. nalgiovense* con una densidad relativa de 51% (Sonjak S, 2010) en productos curados fermentados. Mientras que en la República Oriental del Uruguay se encontró *P.nalgiovense* con una densidad relativa del 96% seguido por *P. minioluteum* con un 81%, en salames artesanales de tipo italiano (Galvalisi. U.y col, 2012).

Otro hecho que debe ser tenido en cuenta cuando se caracteriza la micoflora de embutidos elaborados artesanalmente es la producción de metabolitos secundarios que pueden afectar la salud humana. (Tabla 13)

Tabla 13: Aislamientos por provincia y localidad de estudio con capacidad de producir metabolitos secundarios de importancia en la salud humana

Provincia	Localidad	Género y especie del aislamiento	Potencial productor de:	referencia
Córdoba	*Colonia Caroya*	*P. nalgiovense*	Penicilina [(a)]	Rapela M (2005)
		P. brevicompactum	Acido Micofenólico [(b)]	Pitt (1997)
	Oncativo	*P. nalgiovense*	Penicilina [(a)]	Rapela, M. (2005)
		P. citrinum	Citrinina[(C)]	Comerio, R. (2000); Pitt (1997)
		A.ochraceus	Ochratoxina A	Hocking (1997); Pitt (1998)
Buenos Aires	*Tandil*	*P. nalgiovense*	Penicilina[(a)]	Rapela, M. (2005)
		P. chrysogenum	Roquefortina C[(c)] Penicilina[(a)] Toxina PR[(c)]	Frisvand (2004); Rapela, M. (2005)
		P. citrinum	Citrinina[(c)]	Frisvand (2004); Comerio, R. (2000); Pitt (1997)
		P. griseofulvum	Griseofulvina[(c)] Patulina[(c)] Roquefortina C[(c)] Acido Ciclopiazónico[(c)] Penicilina[(a)]	Frisvand (2004); Rapela, M.(2005); Pitt (1997)
	Mercedes	*P. nalgiovense*	Penicilina[(a)]	Rapela, M. (2005)
		P. chrysogenum	Roquefortina C[(c)]	Frisvand (2004); Pitt (1997)
		A. ochraceus	Ochratoxina A	Hocking (1997); Pitt (1998)
La Pampa	*La Pampa*	*P.nalgiovense*	Penicilina[(a)]	Rapela, M. (2005)
		P.solitum	Solistatina[(d)]	Frisvand (2004)

[(a)] Bactericida, [(b)]Inmunosupresor, [(c)]Micotoxina, [(d)]Inhibidor enzimático

Diversos estudios han demostrado que muchos aislamientos de la micoflora superficial de embutidos fermentados son indeseables por su producción de toxinas (Preda y col, 1978; Gracia y col, 1986; López Diaz y col, 2001).(Tabla 13)

En el presente trabajo se aislaron especies de los géneros *Penicillium y Aspergillus* reportados como potencialmente peligrosos para la salud humana. En el caso del género *Penicillium* que fue el de mayor frecuencia en nuestro trabajo, es considerado uno de los géneros cuyas especies sintetizan un amplio espectro de micotoxinas , así como también un alto número de compuestos antibióticos y antifúngicos. Frisvand y col. (2004) reportaron la presencia de por lo menos 132 familias de extrolitos producidas por 58 especies del género *Penicillium* subgénero *Penicillium*.

En Argentina, Pose y col. (2004) indicaron que 12 de las 17 especies de *Penicillium* identificadas en la superficie de embutidos cárnicos elaborados en la provincia de Buenos Aires, fueron reportadas como toxicogénicas

De todas las especies consideradas como toxicogénicas la de mayor porcentaje de aislamiento fue *Penicillium chrysogenum*. Se realizaron aislamientos en la localidad de Tandil con una frecuencia del 40 % de las muestras y en la localidad de Mercedes con una frecuencia del 12,5% de las muestras. Ambas localidades se encuentran ubicadas en la provincia de Buenos Aires. La presencia de ésta especie sólo en la provincia de Buenos Aires sugiere que las condiciones geográficas y climáticas (clima templado-húmedo y temperatura media anual de 23°C) pueden favorecer su desarrollo por ser una especie mesófila. Su presencia en la micoflora de embutidos secos fermentados artesanales resulta indeseable debido a que produce Roquefortina C un potente neurotóxico en humanos y animales (Frisvand y col, 2004). Similares resultados fueron reportados por Castellari y col. (2010) en muestras de salames de elaboración artesanal de la región de Tandilia en la Provincia de Buenos Aires donde el 50% de los aislamientos obtenidos en verano presentaron *P. chrysogenum* en su superficie. Andersen (1995) aisló

P.chrysogenum y P.nalgiovense en el 50% de muestras de salames de Italia. Por otra parte Ludemann y col. (2004) al evaluar la toxicidad de aislamientos del género *Penicillium* provenientes de la superficie de embutidos secos fermentados de Argentina reportaron que *P.chrysogenum* resultó significativamente tóxico en ensayos de mortalidad con Artemia Salina.

En España investigaciones llevadas a cabo para determinar la presencia de especies toxicogénicas de *Penicillium* en jamones curados fermentados se encontró que el 33,7% de los aislamientos de *P. commune, P. chrysogenum y P. polonicum* fueron productores de Ácido Ciclopiazónico y el 9,5% productores de OTA (Alapont C. y col.; 2014, López y col.,2001) corroboraron la producción de Ácido ciclopiazónico por cepas de *P.commune* en aislamientos de salames de tipo "chorizo Cantimpalos" en España.

Otras especies del género *Penicillium* productoras de micotoxinas fueron aisladas con una frecuencia mucho menor siendo la localidad de Tandil la que presenta la mayor cantidad de especies potencialmente tóxicas, además de *P. chrysogenum*, mencionado anteriormente en ésta localidad se aisló: *P. griseofulvum y P.citrinum* ambos con una frecuencia de 6,67%, el primero potencial productor de Griseofulvina, patulina, roquefortina C y ácido ciclopiazónico y el segundo potencial productor de citrinina.

En las localidades de la Provincia de Córdoba sólo fueron aisladas dos especies potencialmente productoras de micotoxinas: en Colonia Caroya se aisló *P. brevicompactum* con una frecuencia de 6,67% y en Oncativo se aisló *P.citrinum* con una frecuencia del 6%.

Otro de los problemas asociados a la presencia del género *Penicillium* es la producción de Penicilina como metabolito secundario de muchas de sus especies. *Penicillium nalgiovense*, la especie predominante en todas las localidades de nuestro trabajo, es preferida tanto en productos artesanales como en aquellos que utilizan iniciadores por su escasa capacidad de producir toxinas, pero existen

trabajos que demuestran su producción de Penicilina que puede causar alergias en los consumidores. Estudios de actividad antibacteriana realizados en muestras de embutidos de la provincia de Santa Fe en la república Argentina demostró que el 73% de las cepas del género *Penicillium* poseen actividad antibacteriana incluyendo 50% de los aislamientos de *P. nalgiovense* (Rapela, L.; 2005, Farber, P. y col. 1994) analizaron la capacidad de cepas de *P. nalgiovense* provenientes de diferentes alimentos, de inhibir el crecimiento de *Micrococcus luteus*, todos los aislamientos presentaron actividad inhibitoria que se anulaba en presencia de antibióticos β-lactámicos, comprobaron también la presencia de genes que codifican para Penicilina. Aislamientos del género *Penicillium* obtenidos a partir de muestras de salames de varias ciudades de Europa resultaron ser productores de Penicilina además de otras nueve micotoxinas analizadas entre ella Ochratoxina A, Patulina y Citrinina (Mintzlaff, J. 1972).

En lo que se refiere al género *Aspergillus* hemos encontrado una única especie *Aspergillus ochraceus*. La misma fue encontrada en la localidad de Mercedes en la provincia de Buenos Aires con una frecuencia de 62,5% y en la localidad de Oncativo en la provincia de Córdoba con una frecuencia de 11,56%. No encontramos en éste caso ninguna correlación entre las características geográficas y climáticas y la frecuencia de aparición de éste género. Su presencia parece estar relacionada con el tiempo de maduración del embutido y las condiciones de temperatura, humedad y actividad de agua en las que la maduración de lleva a cabo. La elevada temperatura provoca un descenso en la aw lo cual favorece el desarrollo de especies xerófilas (Canel y col., 2013). Diversos estudios reportan los efectos de la aw y la temperatura en el crecimiento de *Aspergillus ochraceus* (García y col., 2011; Pardo y col., 2004).

La presencia de *A. ochraceus* en los salames es indeseable no solo porque confiere al producto apariencia desagradable debido al color amarillento y al aspecto untuoso que otorga al emplume, sino también por su capacidad de producir Ochratoxinas, metabolitos secundarios con actividad nefrotóxica y carcinogénica.

Numerosos trabajos comprueban la presencia de diferentes especies del género *Aspergillu*s en embutidos secos fermentados y crudos curados y su potencial producción de metabolitos tóxicos (Asefa, D. y col,2010; Brr, A.y col., 2004; Monaci, L.y col., 2005; Mintzlaff . y col, 1972; Iacumin y col (2008 a; 2011b). En estudios realizados en salames tradicionales del norte de Italia se con la finalidad de encontrar un método para prevenir el crecimiento de mohos ochratoxicogénicos determinaron la presencia de 24% de las muestras de salames OTA positivas siendo *P. verrucosum*, *P.nordicum y A. ochraceus* los principales productores.

I.2 c) (V) Determinación de Biotipos de *Penicillium nalgiovense.*

Fink-Gremmels & Leitsner (1990) dividen a *Penicillium nalgiovense* en seis Biotipos basándose en el diámetro de las colonias luego de 7 días de crecimiento en MEA (Agar extracto de Malta), el color de los conidios y el grado de desarrollo de los conidios en MEA y CYA (Agar Czapek Extracto de Levadura).

Estas características fueron analizadas para cada uno de los 108 aislamientos de *P. nalgiovense* obtenidos a partir de las 79 muestras de embutidos secos fermentados, obteniéndose los siguientes datos de predominancia por Biotipo y localidad (Tabla 14).

Tabla 14: Predominancia de Biotipos de *Penicillium nalgiovense*						
Provincia		*Córdoba*		*Buenos Aires*		*La Pampa*
Localidad		*Colonia Caroya*	*Oncativo*	*Tandil*	*Mercedes*	*La Pampa*
N° total de aislamientos		57	51	35	32	21
N° de aislamientos de *P.nalgiovense*		43	25	16	14	10
Biotipos (% de predominancia)	1	2,33	-	-	64,28	40
	2	-	-	-	-	-
	3	2,33	-	-	21,42	20
	4	67,44	88	68,75	7,14	2.20
	5	6,97	-	-	7,14	20
	6	20,93	12	31,25	-	-

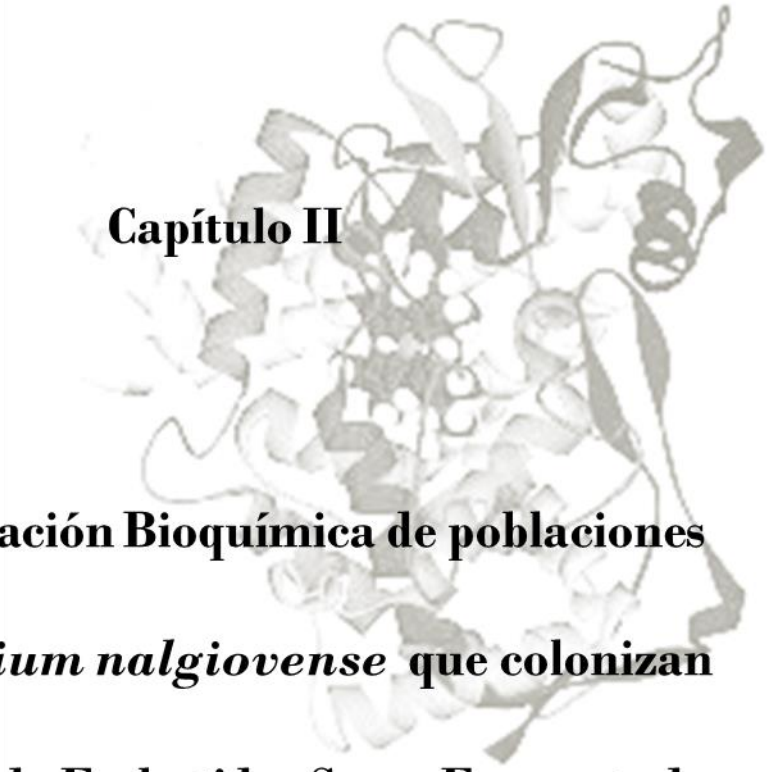
-Los valores resaltados corresponden a los biotipos cuyo valor de predominancia es el más elevado, por localidad

A partir de los resultados obtenidos se observa que el biotipo 4 es el que posee una mayor predominancia en las localidades de Colonia Caroya y Oncativo, ambas en la provincia de Córdoba, y en la localidad de Tandil, en la provincia de Buenos Aires.

En la localidad de Mercedes, en la provincia de Buenos Aires y las localidades de la Provincia de La Pampa predomina el biotipo 1.

Emplume característico de salames con predominancia de Biotipo 4

La predominancia tanto el biotipo 1 como el biotipo 4, en la superficie de nuestros salames artesanales confieren al emplume una coloración verde pareja que es típica de los embutidos elaborados artesanalmente en Argentina, si bien es deseable la apariencia blanca del emplume, ésta se logra en la mayoría de los productos elaborados industrialmente y en los cuales se utilizan iniciadores constituidos por *P. nalgiovense* del Biotipo 6. En el caso de los salames que se analizaron en nuestro trabajo se aisló el biotipo 6 en muestras de Colonia Caroya (21%), Oncativo (12%) y en Tandil (31,25%).



Capítulo II

"Caracterización Bioquímica de poblaciones de *Penicillium nalgiovense* que colonizan la superficie de Embutidos Secos Fermentados Artesanales"

Objetivo

El objetivo de ésta segunda etapa fue:

"Caracterizar bioquímicamente los aislamientos de *Penicillium nalgiovense* obtenidos a partir de la micobiota superficial de Embutidos Secos fermentados Artesanales de diferentes localidades productoras del país utilizando patrones de isoenzimas."

II. 1 Materiales y Métodos

II. 1 a) Crecimiento y recuperación de Micelios.

Un total de 65 aislamientos de *Penicillium nalgiovense* representativos de las tres zonas productoras estudiadas fueron seleccionados al azar a fin de realizar posteriormente la extracción de proteínas totales. Dichos aislamientos se distribuyeron por localidad de la siguiente manera: 19 de Colonia Caroya, 19 de Oncativo, 9 de La Pampa, 8 de la localidad de Mercedes y 10 de Tandil.

II. 1 b) Obtención del extracto proteico y determinación de la concentración de proteínas.

Para cada aislamiento las esporas fueron extraídas con ansa ojal, en condiciones estériles, a partir de los aislamientos conservados en crioviales a -20°C y sembradas en estrías cubriendo la superficie del medio. Los cultivos se incubaron durante 7 días a 25°C en bolsas de polietileno para evitar la desecación.

Una vez obtenidos los cultivos por observación macroscópica y microscópica, se realizó a partir de los mismos una suspensión de conidios según el siguiente protocolo:

1. tomar los conidios (en condiciones estériles) con ansa ojal de la superficie de las placas de cultivo.
2. Colocar en tubos conteniendo 10 ml de agua de peptona al 0,1% p/v estéril.
3. Homogeneizar la suspensión de conidios obtenidas en vórtex.
4. Estimar la concentración de conidios en la suspensión por recuento en cámara de Neubauer (1/10 mm) hasta obtener una concentración final de 1.10^6 conidios/ml.

Una vez obtenida la suspensión de esporas con una concentración de 1.10^6 UFC/ml se inoculó 1 ml en Erlenmeyers conteniendo 250 ml de medio de desarrollo de micelios estéril (según Banke y col.1997) (Anexo I).

Los erlenmeyers inoculados se incubaron durante 7 días a 25°C, en agitación constante a 150 RPM. (Figura 20)

Figura 20: Micelios de *P.nalgiovense*

Los micelios crecidos en éstas condiciones fueron recolectados por filtración en vacío de acuerdo al siguiente protocolo:

Figura 21: Sistma de filtración de

1- Trasvasar el contenido de los Erlenmeyers, con ayuda de una espátula, a un embudo Büchner-Kitasato conteniendo papel de filtro Whatman N°1.

2- Conectar al vacío, con el fin de eliminar el medio de cultivo de los micelios hasta secarlos.

3-Repetir la filtración al vacío varias veces con agua bi-destidada con el fin de eliminar impurezas provenientes del medio de cultivo. (Figura 21)

4- Los micelios obtenidos se conservaron envueltos en papel de aluminio a -20 °C hasta su utilización.

Los micelios de *P. nalgiovense* recolectados fueron tratados con la finalidad de extraer a partir de los mismos las proteínas totales. Considerando que la mayoría de las enzimas celulares son proteínas solubles, lo cual incluye a las isoenzimas, se utilizó solución Buffer Bifosfato de Potasio (BPP) 0,1 M para la extracción (Anexo I), manteniendo el pH~ 7 para evitar la desnaturalización proteica al mantener estable el punto isoeléctrico de las mismas. De ésta manera se obtuvo el extracto proteico a partir del cual se analizó el perfil de isoenzimas

El protocolo utilizado se desarrolló de la siguiente manera:

1. Colocar en un mortero 1 g de micelio y agregar 2 ml de Buffer de extracción BPP.
2. Moler durante 2 minutos, manteniendo la temperatura de extracción a 4°C. De ésta manera se logra romper las membranas celulares y liberar las proteínas solubles.
3. Trasvasar alícuotas del homogenato obtenido a tubos eppendorf de 1 ml.
4. Centrifugar durante 20 minutos a 15000 rpm, lo que permite la sedimentación de los restos de membranas celulares quedando en el sobrenadante las proteínas solubles.
5. Trasvasar el sobrenadante a crioviales.
6. Conservar a -80°C hasta su uso.

La cuantificación de proteínas del extracto obtenido se llevó a cabo mediante el método descrito por Bradford. Particularmente se utilizó el kit Bio-Rad Protein Assay . El mismo tiene como principio el cambio de absorción de 465 nm a 595 nm del azul de Coomassie en respuesta a las distintas concentraciones de proteínas.

La concentración de la muestra se determinó por comparación con una curva de calibración realizada con seroalbúmina bovina (Protein Standard II).

Para ello se realizó una solución madre de seroalbúmina bovina (BSA) con una concentración de 1,44 mg/ml, a partir de la cual se obtuvieron las concentraciones de referencia para elaborar la curva (Tabla 15).

mg/ml de proteínas	**0**	**0,1**	**0,2**	**0,3**	**0,4**	**0,5**	**0,6**	**0,7**	**0,8**	**0,9**
***u*l de BSA Standard**	0	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	22,5
***u*l de agua bidestilada**	36	33,5	31	28,5	26	23,5	21	18,5	16	13,5

Tabla 15: concentración de BSA para elaborar la Curva Patrón

El protocolo llevado a cabo fue tal como describe el procedimiento del kit (Figura 22), que es el siguiente:

Figura 22: Determinación de la concentración de proteínas

1- Preparar la solución madre de BSA con una concentración de 1,44 mg/ml y guardar alícuotas de 400 *ul.*

2- Distribuir por duplicado en cada pocillo, la solución de BSA y agua destilada, teniendo en cuenta las concentraciones indicadas para la curva patrón.

3- Distribuir por duplicado en cada pocillo de una microplaca, 10 *u*l del extracto de proteínas obtenido a partir de los micelios.

4- Añadir 200 *u*l de solución de Bradford (1 parte de Dye Reagent Concentrate y 4 partes de agua bidestilada) en los pocillo de la curva patrón y luego en los correspondientes a las muestras cuya concentración se quiere calcular. Agitar y dejar reposar durante 5 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

5- Medir la absorbancia a 595 nm.

6- Elaborar la curva de calibración y calcular la concentración de proteínas de la muestra problema.

II. 1 c) Obtención de perfiles de isoenzimas

Las enzimas son clasificadas y codificadas por el comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) de acuerdo con la reacción catalizada. La nomenclatura utiliza una abreviación E.C (Enzyme Comision) seguido de hasta cuatro dígitos referentes a la clase y subclase a la que pertenece la enzima (Bornscheuer U., 2002) En el presente trabajo de tesis de analizaron las isoenzimas: α-Esterasa (EST: EC:3.1.1.1), Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT: EC 2.6.1.1), Malato Deshidrogenasa (MDHP: EC.1.1.1.40), Superóxido Dismutasa (SOD: EC 1.15.1.1) y Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH EC 1.1.1.49). (Murphy R col., 1996)

Una vez obtenidos los extractos proteicos, se utilizó electroforesis en geles de poliacrilamida para separar las proteínas contenidas en los mismos. Los geles fueron sometidos a diferentes estrategias de tinción específicas con la finalidad de detectar los diferentes sistemas isoenzimáticos que se utilizaron luego para caracterizar aislamientos de *Penicillium nalgiovense* según la localidad de origen de los mismos.

Electroforesis de proteínas en condiciones no desnaturalizantes (PAGE)

La electroforesis en geles no desnaturalizantes (PAGE) se realizó según el método descrito por Laemmli (1970). Los geles de poliacrilamida utilizados constan de dos zonas, una superior concentradora y una inferior separadora. La parte superior permite concentrar la muestra en el límite de separación de ambas fases posibilitando la entrada homogénea de las proteínas en la siguiente fase del gel. La parte inferior del gel permite la separación de las proteínas según su peso molecular (Smith J. y col,2003).

El protocolo de preparación de los geles es el siguiente:

1- Armar la cubeta para la polimerización de los geles usando el sistema OmniPAGE Gel Casting System (Cleaver Scientific) para geles de 80 mm x 96 mm según las indicaciones del fabricante. El grosor del gel utilizado fue de 1 mm.

2- Preparar la mezcla para el gel separador según (anexo I).

3- Agregar 10 *ul* de TEMED y 50 *u*l de Persulfato de amonio (anexo I).

4-Una vez añadidos los catalizadores de la reacción, mezclar ligeramente, evitando la formación de burbujas y eliminando el oxígeno de la mezcla. Depositar la mezcla entre los cristales de la cubeta hasta la altura deseada. Cubrir inmediatamente con agua bidestilada, para evitar el contacto con el oxígeno del aire (lo que impediría la polimerización).

5- Dejar polimerizar a temperatura ambiente por 30 minutos.

6- Preparar la solución del gel concentrador (anexo I), y agregar 10 *u*l de TEMED y 50 *u*l de APS.

7- Descartar el agua bidestilada que cubre el gel separador e inmediatamente cubrir con el gel concentrador. Colocar rápidamente el peine, evitando la formación de burbujas.

8- Dejar polimerizar a temperatura ambiente por 15 minutos.

La concentración de poliacrilamida del gel de separación depende del sistema de isoenzimas que se pretende separar y en particular del tamaño de la proteína expresado en kilodaltons (KDa).

Teniendo en cuenta éstas consideraciones y al carecer de información exacta con respecto al Peso Molecular de las proteínas por separar, se realizaron geles de prueba de diferentes concentraciones a fin de obtener una buena resolución.

Así se determinaron para éste ensayo

- ✓ Para los sistemas de Isoenzimas α-Esterasas (EST) y Malato deshidrogenasas (MDH), Superóxido dismutasa (SOD) y Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) geles separadores con una concentración de poliacrilamida de 10%.

- ✓ Para el sistema de Isoenzimas Aspartato Aminotransferasas (AAT) geles separadores con una concentración de poliacrilamida de 8%.

En todos los sistemas de isoenzimas se utilizaron geles de apilamiento con una concentración de poliacrilamida de 5%. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

Preparación y siembra de las muestras

Una vez polimerizado el gel se siguió el siguiente protocolo:

1- Colocar la cuba en el tanque de electroforesis y agregar 500 ml de Buffer de Tris-Glicina, de corrida (Anexo I.)

2- Quitar los peines, asegurándose que queden cubiertos por el buffer.

3- Preparar las muestras proteicas Se incorporan 20 *u*g de proteína, para lo cual se toman 80 *u*l de extracto proteico de cada muestra y se diluye en 20 *u*l de buffer de muestra (Anexo I)

4-Sembrar 25 ul de cada una de las muestras diluidas por pocillo, utilizando una pipeta Hamilton.

5-Las muestras se mantuvieron durante el desarrollo del protocolo en hielo y los buffers a 4°C, para evitar la desnaturalización de las proteínas.

Corrida del gel:

La corrida se llevó a cabo a una tensión constante de 120V y 30 mA, a una temperatura de 4°C. El tiempo de corrida utilizado fue según el sistema de Isoenzimas por separar:

- ✓ Para los sistemas de Isoenzimas α-Esterasas (EST), Malato deshidrogenasas (MDH), Superóxido dismutasa (SOD) y Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) el tiempo de corrida fue de 90 minutos.
- ✓ Para el sistema de Isoenzimas Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT) el tiempo de corrida fue de 120 minutos.

Cálculo del PM de los sistemas de Isoenzimas

Para estimar el peso molecular de las bandas de proteínas obtenidas se empleó el marcador: PageRuler^{TM}Prestained Protein Ladder (Fermentas), constituido por una mezcla de 10 proteínas recombinantes coloreadas con un rango de peso molecular de 10 kDa a 170 kDa.

Se utilizaron 10 ul de marcador por pocillo. El marcador fue corrido junto con las muestras. Luego de concluída la corrida electroforética se cortó el gel separando la zona de corrida del marcador de peso molecular de la zona del gel donde se corrieron las muestras. Luego ambas porciones del gel se tiñeron de manera diferencial.

La parte del gel correspondiente al marcador de peso molecular fue teñida con Coomasie Blue . La parte del gel correspondiente a las isoenzimas fue teñido con la tinción específica para cada enzima.

Con los resultados de PM obtenidos a partir del marcador se elaboró una curva de calibración de Log de PM vs Rf. A partir de la curva de calibración se obtiene la ecuación lineal: log(PM)= m*RF+b (m:pendiente; b:ordenada de origen). Una vez determinado el Rf de las isoenzimas, se calculó su PM con la ecuación lineal obtenida

Interpretación de los resultados

Al interpretar un gel isoenzimático se debe tener en cuenta que el conjunto de bandas resueltas que constituyen el patrón son debidas a una serie de circunstancias:

a) representan la visualización directa de productos génicos, por lo que pueden detectarse variaciones como consecuencia de adaptaciones a cambios ambientales.

b) al tratarse de moléculas concretas poseen mayor especificidad que en el caso de proteínas totales.

c) El patrón de cada sistema enzimático en particular depende del control genético de dicho sistema, así como de la estructura cuaternaria de la proteína.

Una de las primeras apreciaciones que se pueden observar en un zimograma es que las bandas aparecen distribuidas por zonas, en cada una de ellas el número de bandas dependerá del control genético de la enzima. Si en una zona de actividad enzimática todos los individuos presentan enzimas que migran a la misma distancia en el gel, indica que el gen implicado es

monomórfico. Si el número de bandas varía en una misma zona de actividad enzimática, el gen es polimórfico y las variantes se denominan aloenzimas, debido a que son codificadas por un único locus (Carrillo J., y otros. 2000).

Teniendo en cuenta los zimogramas obtenidos para cada una de las enzimas analizadas se realizó la lectura de los perfiles de bandas obtenidos, de acuerdo a los siguientes criterios:

1- ***Movilidad relativa (Rf) de la banda*** (Gottlieb y Hepben, 1966), ésta ultima determinada como el cociente entre la distancia de migración de la banda de proteínas en el gel y la distancia de migración del frente de corrida. Responde al siguiente cálculo:

Rf: bc /bf

Donde:

bc: distancia de migración de la banda

bf: distancia de migración del frente de corrida

Se puede estimar que bandas con distinta movilidad representan alelos distintos del mismo locus, el gen implicado es por lo tanto puede ser considerado polimórfico. (Micales J. y otros, 1986).

En el presente trabajo el término electroforma fué usado para designar los diferentes patrones de bandas obtenidos para cada isoenzima. La combinación de electroformas de distintas isoenzimas fue denominado Tipo de electroforma y se refiere a los fenotipos multienzimáticos observados para cada aislamiento (Raynaud-Faure M. y col., 1991; Gardes M. y col., 1987). La presencia de diferentes tipos de electroformas por localidad permitirá estimar la variabilidad de las poblaciones de estudio.

2- ***Por técnicas numéricas aplicadas a la taxonomía***: estas técnicas permiten, utilizando cualquier tipo de marcador (morfológico o molecular), cuantificar la afinidad entre unidades taxonómicas basándose en el estado de los caracteres elegidos (Crisci J., 1983)

Para el análisis de isoenzimas como marcadores bioquímicos los caracteres están representados por bandas electroforéticas. Se asume que cada banda se corresponde con un alelo con un locus determinado y por lo tanto sólo pueden detectarse dos condiciones: la presencia de la banda (que representa la presencia del alelo) o la ausencia de la banda (que representa la ausencia del alelo).

Teniendo en cuenta las bandas electroforéticas obtenidas a partir de los zimogramas de cada una de las localidades de estudio y considerándolos datos doble estado (presencia/ausencia) se elaboró una matriz básica de datos (MBD). El valor 0 se asignó a los casos en los que no hubo presencia de bandas y el valor 1 para indicar la presencia de una banda.

Una vez obtenida la MBD, es posible cuantificar el parecido o similitud (o sus diferencias) entre un par de datos de dicha matriz por medio de Coeficientes de Asociación.

En el presente trabajo se aplicó el Coeficiente de Asociación de Jaccard (CAJ). Los valores de similitud obtenidos a partir de éste coeficiente varían entre 0 (mínima similitud) y 1 (máxima similitud). Se expresa como:

$$CAJ: \quad a/(a+b+c)$$

dónde:

a (1,1): carácter presente en ambos organismos.

b (1,0): el primer organismo presenta el carácter y el segundo no lo posee.

c (0,0): carácter ausente en ambos organismos

Los resultados obtenidos a partir del Coeficiente de asociación de Jaccard, fueron utilizados para obtener una Matriz de Similitud entre pares de organismos (Sneath y Sokal, 1973). Esta matriz de similitud se utilizó para evaluar las relaciones entre la totalidad de los organismos estudiados por medio del análisis de agrupamientos. En el presente trabajo se utilizó para el

agrupamiento la media aritmética no ponderada (UPGMA, "Ligamiento Promedio no ponderado) (Castilla L., 2007)

Se utilizó el programa NTSYS-pc para el procesamiento estadístico de los datos obtenidos y la construcción del Fenograma correspondiente.

II. 1 c) (I) Perfil de α-Esterasa (α-EST. EC: 3.1.1)

Las enzimas Esterasas fueron detectadas utilizando una versión modificada del método de tinción de Brewer (1970). Este método permite resolver productos no específicos considerados genéricamente como Carboxil Ester Hidrolasas (EC 3.1.1.-; IUBCN, 1984).

El protocolo de tinción utilizado es el siguiente:

1- Pesar 0,05 g de Fast Blue RR Salt (SIGMA).

2- Adicionar 50 ml de 0,2 M Tris- HCl, pH 7.0 (Anexo I)

3- Disolver con agitación. A temperatura ambiente.

4- Agregar 3 ml de solución de α-naftil acetato. (Anexo I) y homogeneizar.

5- Colocar previamente los geles en un recipiente plástico y agregar la mezcla de tinción.

6- Incubar a 37°C por aproximadamente una hora y media hasta que aparezcan las bandas oscuras sobre fondo claro.

Una vez realizada la tinción se midió el Rf de cada banda considerando el cociente entre la distancia de migración de la banda y la distancia de migración del frente de corrida.

II. 1 c) (II) Perfil de Malato deshidrogenasa dependiente de NADP+ (MADPH. EC: 1.1.1.40)

La enzima Malato Deshidrogenasa (EC:1.1.1.40), cataliza la reacción de oxidación del malato al oxalacetato utilizando NAD+ como aceptor final de electrones. Esta enzima participa en el ciclo del ácido cítrico, en organismos eucariotas se localiza en la matriz mitocondrial y en el citoplasma. Los hongos y las plantas también poseen una forma glioxisomal que es usada en el Ciclo del Glioxilato.

Esta enzima fue detectada utilizando una versión modificada del método de Ayala y col., (1972) y Cross y col., (1979). Este método permite detectar la enzima malato deshidrogenasa NADP dependiente, conocida también como Enzima Málico (ME).

El protocolo de tinción utilizado fue el siguiente:

1-Preparar buffer 0,2M Tris-HCl .Corroborar que el pH de la solución se encuentre en 8 y si fuera necesario ajustarlo con NaOH. (Anexo I)

2- Agregar 5 mg/ml de cada una las soluciones de tinción NBT (Azul de Nitrotetrazolium) y PMS (Fenacina Metasulfato).

3- Agregar 0,02 g de NADP.

4-Disolver con agitación, a temperatura ambiente.

5- Colocar previamente los geles en un recipiente plástico y agregar la mezcla de tinción.

6- Incubar a 37°C por aproximadamente una hora, hasta que aparezcan bandas azules sobre fondo claro.

II. 1 c) (III) Perfil de Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT. EC 2.6.1.1)

Esta enzima se conoce formalmente con el nombre de Glutamato-Oxalacetato Transaminasa (EC 2.6.1.1). Para su tinción se utilizó el método propuesto por Bogart, según el siguiente protocolo:

1- Pesar 0,05 g de Fast Blue RR salt.

2-Adicionar 25 ml de solución sustrato (Anexo I)

3-Adicionar 25 ml Buffer 0,2M Tris/HCl, pH:8

4-Disolver con agitación, a temperatura ambiente.

5- Colocar previamente los geles en un recipiente plástico y agregar la mezcla de tinción.

6-Incubar a 37°C por aproximadamente 2 horas, hasta que aparezcan bandas bordó sobre fondo claro. Es importante que la tinción se lleve a cabo a pH: 8.0 para que aparezcan las bandas, así como también que los micelios utilizados sean frescos.

II. 1 c) (IV) Perfil de Superóxido Dismutasa (SOD. EC 1.15.1.1)

Para su tinción se siguió el protocolo propuesto y modificado por Johnson A. y col (1970) y Siciliano y Shaw (1976)

1-Preparar 50 ml de Buffer Tris HCl pH: 9 (Anexo I)

2-Agregar 1 ml de $MgCl_2$ 0,1M.

3-Agregar 0,5 ml de las soluciones de NBT (Azul de Nitrotetrazolium) y 1 ml de PMS (Fenacina Metasulfato) y 0,5 ml de MTT.

4- Agregar 10 ml de solución conteniendo 10 mg/ml de NADP.

5- -Disolver con agitación, a temperatura ambiente.

6- Colocar previamente los geles en un recipiente plástico y agregar la mezcla de tinción.

7-Incubar a 37°C por aproximadamente 2 horas, hasta que aparezcan bandas claras sobre fondo oscuro.

II. 1 c) (V) Perfil de Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH) EC 1.1.1.49

Se utilizó el siguiente protocolo de tinción fue modificado por Brewer (1970):

1-Adicionar a 50 ml de Buffer de tinción, 3 ml de $MgCl_2$ 0.1 M, 0.3 g de D-glucosa-6-fosfato, 1 ml de solución de NBT y PMS. (Anexo I)

2- Adicionar 0,03 g de NADP y disolver.

3-Colocar previamente los geles en un recipiente plástico y agregar la mezcla de tinción.

4-Incubar a 37°C por aproximadamente 2 horas, hasta que aparezcan las bandas.

II. 1 e) Comparación de perfiles de isoenzimas por localidad

Se compararon las electroformas y tipos electromórficos para cada una de las localidades estudiadas.

Se seleccionaron 5 aislamientos de cada una de las localidades y con los perfiles de bandas de las tres isoenzimas estudiadas se elaboró un dendrograma con el método descripto en el ítem **II. 1 c)**

II. 2 Resultados y discusión

II. 2 a) Crecimiento y recuperación de Micelios

Se seleccionaron 48 aislamientos de *P. nalgiovense* de los que se recuperó aproximadamente 20 g de micelio.

II.2 b) Obtención del extracto proteico y determinación de la concentración de proteínas.

La evaluación por el método de Bradford de los extractos proteicos obtenidos a partir de los micelios dio por resultado una concentración de proteínas en el rango de 0,50 mg/ml a 1,20 mg/ml. Anexo III

II. 2 c) Obtención de perfiles de Isoenzimas

II. 2 c) (I) Perfiles de α-Esterasa:

El perfil de α-Esterasas de los 48 aislamientos de *P. nalgiovense* seleccionados permitió detectar un total de 19 bandas cuyos valores se presentan en un intervalo de movilidad anódica (Rf) que varía entre 0,43 a 0,94

El peso molecular de las mismas se encuentra en el rango de 13 a 68 kDa (Tabla16)

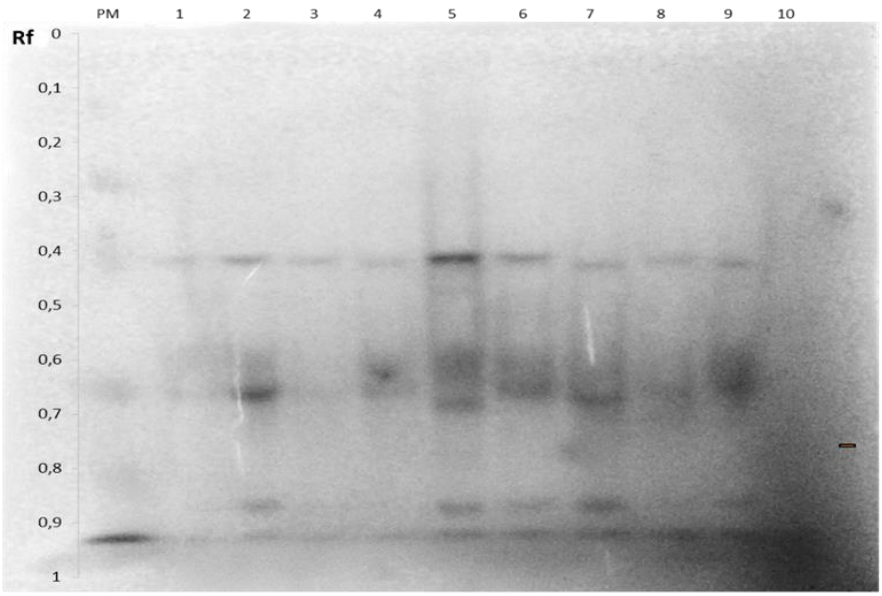


Figura 23: Gel de α-Esterasas comparativo entre las localidades de estudio. Los valores verticales corresponden al Rf (movilidad relativa). Los aislamientos del 1 al 10 indicados en el encabezado son: 1 y 2 (Colonia Caroya), 3 y 4 (Mercedes), 5 y 6 (La Pampa), 7 y 8 (Tandil), 9 y 10 (Oncativo) .PM: peso molecular.

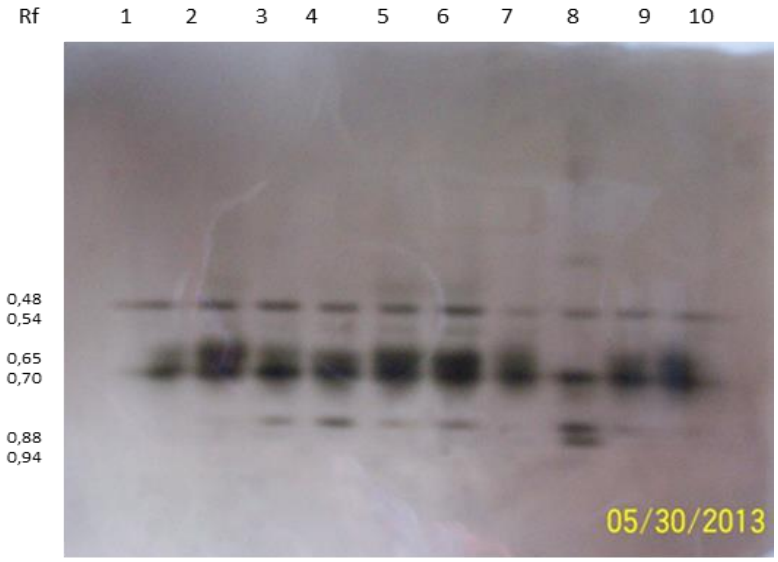
Peso Molecular de α-Esterasas		
Rf	***logPM***	***PM***
0,43	1,84	68,5
0,47	1,78	60,1
0,49	1,75	56,2
0,45	1,81	63,1
0,53	1,69	50,0
0,55	1,66	46,0
0,58	1,62	41,7
0,6	1,59	39,0
0,62	1,56	36,5
0,65	1,52	35,0
0,66	1,50	32,0
0,68	1,48	30,0
0,72	1,42	27,5
0,75	1,37	26,2
0,82	1,27	19,0
0,84	1,24	17,6
0,88	1,19	15,4
0,91	1,14	14,2
0,94	1,10	13,5

Tabla 16 :Peso molecular de bandas de α-EST estimado por el Método de Bradford

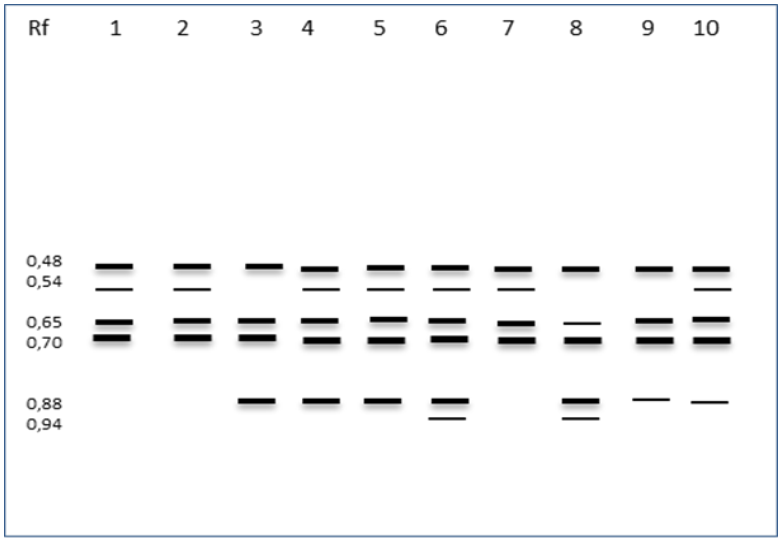
Perfiles de α-Esterasa por localidad:

Provincia de Córdoba

Colonia Caroya

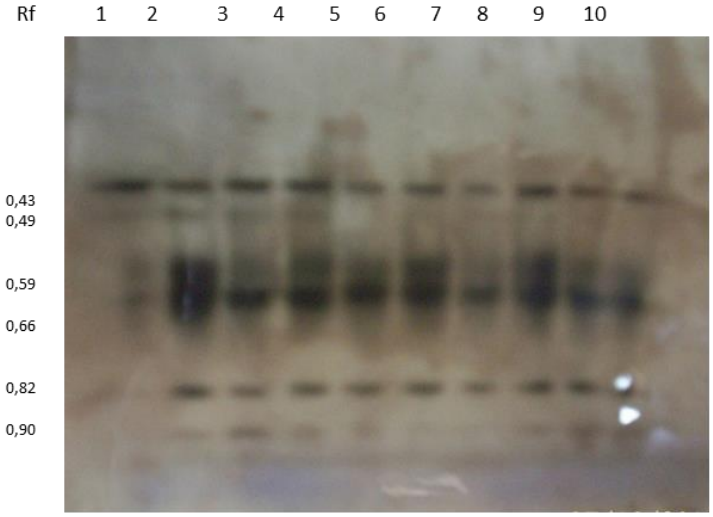


Gel de α-Esterasas correspondiente a la localidad de Colonia Caroya. Los aislamientos del 1 al 10 son: SCF31, SCV21, SCV31, SCSU12, SCSU23, SCR34, SCCEN12, SCCEN21, SCCEN22, SCSU32

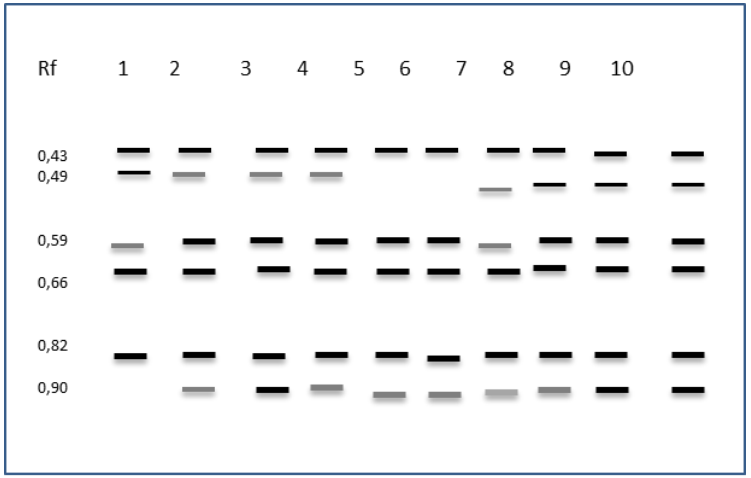


Perfil de bandas de α-Esterasas correspondiente a la localidad de Colonia Caroya. Los aislamientos del 1 al 10 son: SCF31, SCV21, SCV31, SCSU12, SCSU23, SCR34, SCCEN12, SCCEN21, SCCEN22, SCSU32

Oncativo



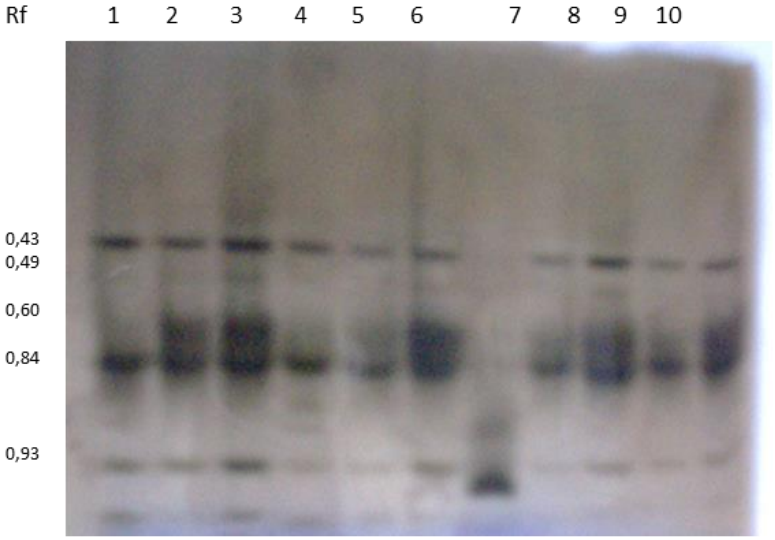
Gel de α-Esterasa correspondiente a la localidad de Oncativo. Los aislamientos del 1 al 10 son: SODH21, SOEF13, SOMA11, SONN11, SOPPM3, SOMA12, SOPI25, SODH25, SOPI11, SOPI11dupli



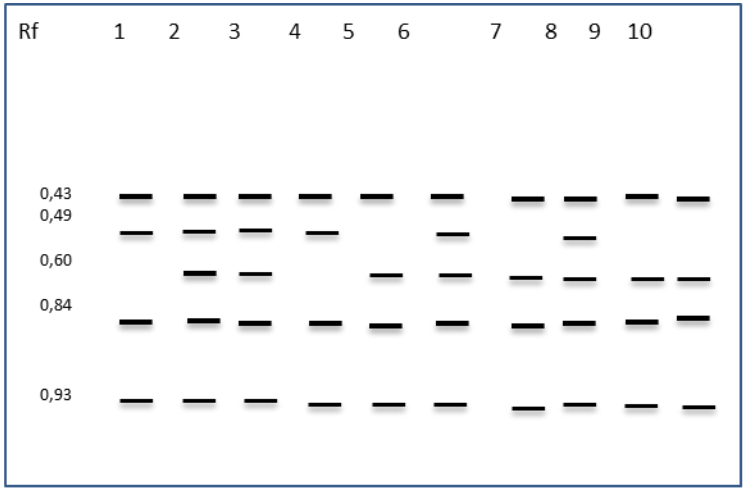
Perfil de α- Esterasas correspondiente a la localidad de Oncativo. Los aislamientos del 1 al 10 son: SODH21, SOEF13, SOMA11, SONN11, SOPPM3, SOMA12, SOPI25, DODH25, SOPI11, SOPI11dupli.

Provincia de Buenos Aires

Tandil

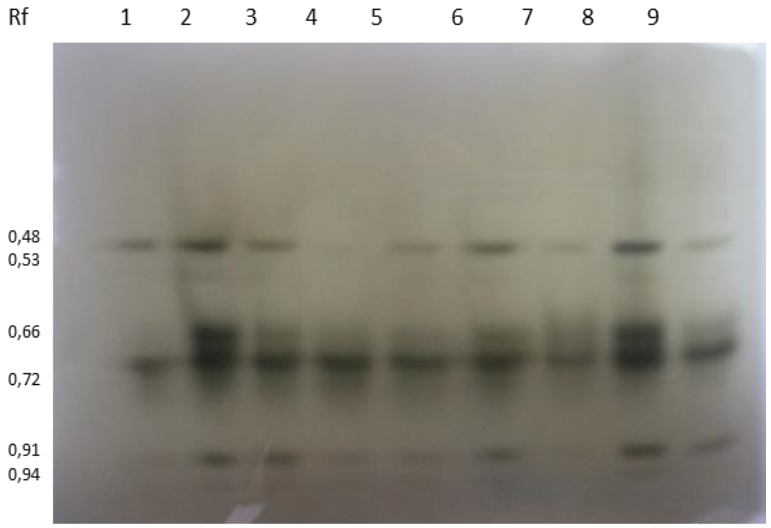


Gel de α-Esterasa correspondiente a la localidad de Tandil. Los aislamientos del 1 al 10 son: STEI11, STDPG14, STTC21, STDPF13, STPPG22, STDPF21, STEI13, STEI23, STMSF21, STPPF11

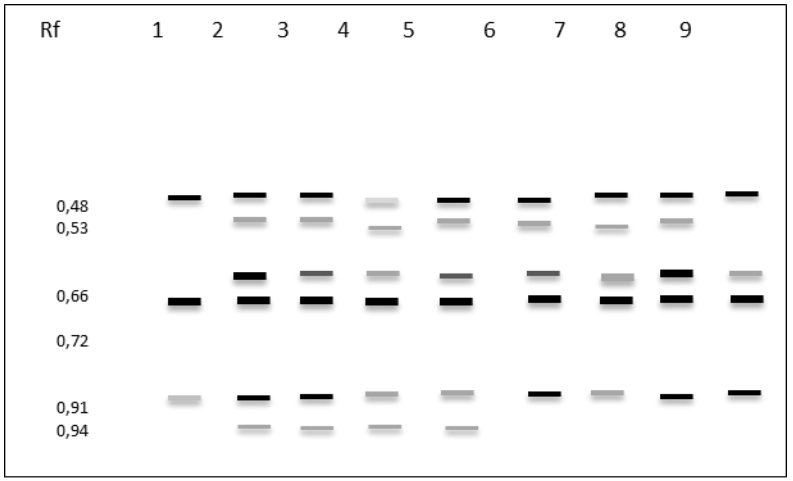


Perfil de α-Esterasas correspondiente a la localidad de Tandil. Los aislamientos del 1 al 10 son: STEI11, STDPG14, STTC21, STDPF13, STPPG22, STDPF21, STEI13, STEI23, STMSF21, STPF11

Mercedes



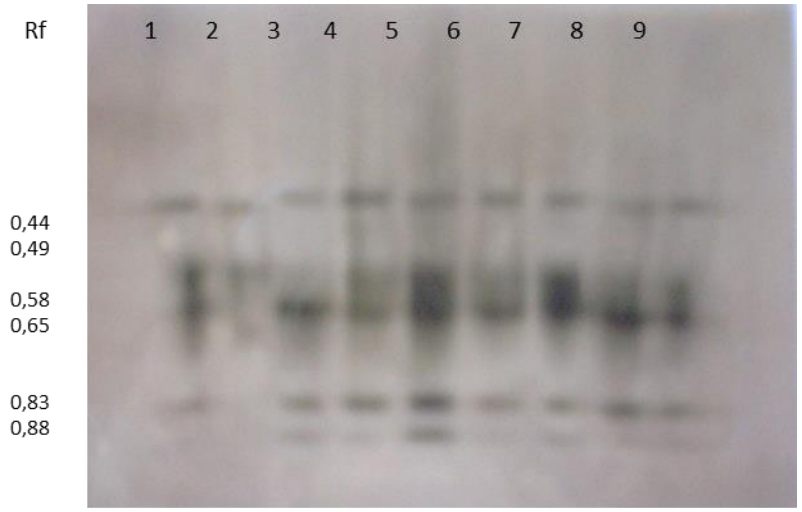
Gel de α-Esterasa de la localidad de Mercedes. Los aislamientos del 1 al 9 son: SMQC12, SMM14, SMLC23, SMLC22, SMLC12, SMQL22, SMM22, SMM23, SMM12,



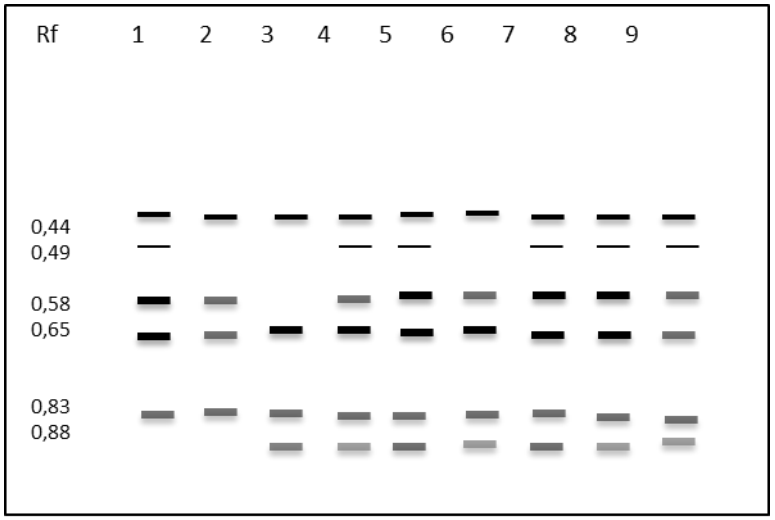
Perfil de α-Esterasa de la localidad de Mercedes. Los aislamientos del 1 al 9 son: SMQC12, SMM14, SMLC23, SMLC22, SMLC12, SMQL22, SMM22, SMM23, SMM12,

Provincia de La Pampa

La Pampa



Gel de α-Esterasa correspondiente a las localidades de La Pampa. Los aislamientos del 1 al 9 son: SPG22, SPLEM13, SPPAM11, SPPAM13, SPG11, SPPAM21, SPPAM12, SPEP11, SPLEM12.



Perfil de α-Esterasa correspondiente a las localidades de La Pampa. Los aislamientos del 1 al 9 son: SPG22, SPLEM13, SPPAM11, SPPAM13, SPG11, SPPAM21, SPPAM12, SPEP11, SPLEM12.

De la observación de los perfiles de bandas de α-EST para cada localidad surgen 17 electroformas, cada una presenta de 3 a 6 bandas con diferente movilidad electroforética:

- Las localidades de la Provincia de Córdoba presentan 7/17 electroformas de α-EST: 4 en Colonia Caroya y 3 en Oncativo.
- Las localidades de Buenos Aires presentan 6/17 electroformas de la misma enzima: 3 en Tandil y 3 Mercedes.
- En las localidades de La Pampa se presentan 4/17 electroformas.

Los resultados se resúmen en la tabla 16.

Si consideramos a cada electroforma como una variante fenotípica, resultante de la expresión de un gen (Fauré-raynaud M y col., 1991, Gardes M. y col., 1987), existe variabilidad entre las poblaciones de *P. nalgiovense* provenientes de cada localidad .Teniendo en cuenta éstas consideraciones, en nuestro estudio pudimos observar una mayor variabilidad en las localidades de la Provincia de Córdoba y Buenos Aires siendo menor la variación observada en las localidades de la provincia de La Pampa.

Las bandas obtenidas a partir de cada uno de los zimogramas de α-Esterasas fueron utilizadas para elaborar una matriz de datos en la cual se tomó como valor 1: presencia de la banda y valor 0: ausencia de la banda. A partir de ésta matriz de datos presencia-ausencia se obtuvo una matriz de similitud por Coeficiente de Jaccard, que fue utilizada para establecer las relaciones entre los 48 aislamientos para los cuales se realizaron los zimogramas.
Del análisis de agrupamiento por UPGMA, media aritmética no ponderada, Sneath P., Sokal R. (1973). de dicha matriz surge el siguiente dendrograma (Figura 24)

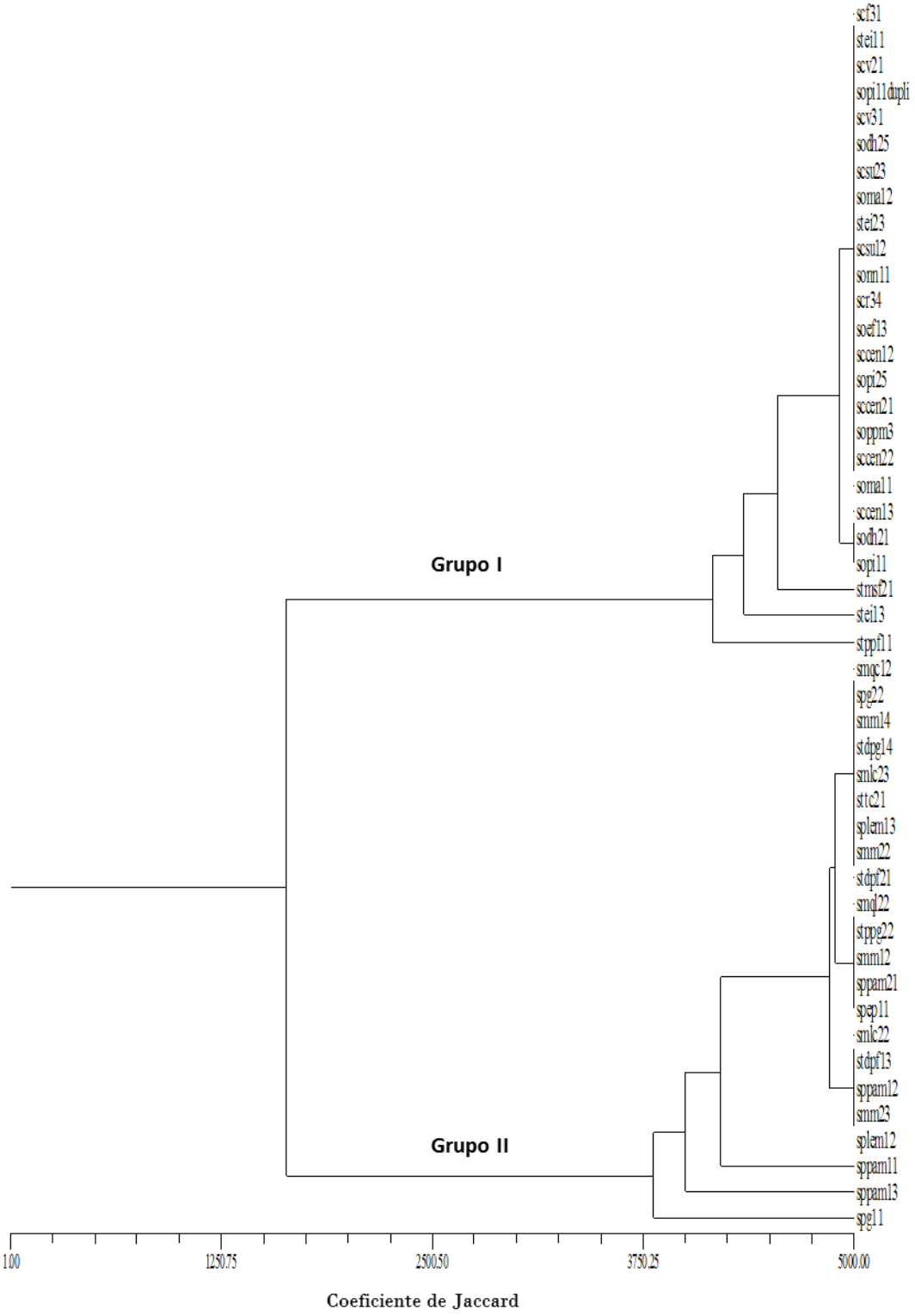


Figura 24 :Dendrograma del análisis de agrupamiento UPGMA efectuado a partir de los datos obtenidos de los perfiles de α-Esterasas de las localidades de estudio.

De acuerdo con el dendrograma obtenido se observan dos grupos: el Grupo I conformado por los aislamientos de las localidades de Colonia Caroya y Oncativo, ambas de la provincia de Córdoba, con excepción de los aislamientos STEI11 y STMSF21 correspondientes a la localidad de Tandil en la provincia de Buenos Aires.

En el Grupo II se encuentran los aislamientos correspondientes a las localidades de Tandil y Mercedes en la provincia de Buenos Aires y los aislamientos de las localidades de la provincia de La Pampa.

II. 2 c) (II) Perfil de Malato dehidrogenasa dependiente de NADP+ (MADPH. EC: 1.1.1.40)

Los resultados del análisis de las bandas obtenidas por electroforesis permitieron detectar un total de 9 bandas cuyos valores de Rf se presentan en un intervalo de movilidad anódica que varía entre 0,39 a 0,74 (Figura 25). El PM de las mismas se encuentra en el rango de 24-78 kDa (Tabla 17)

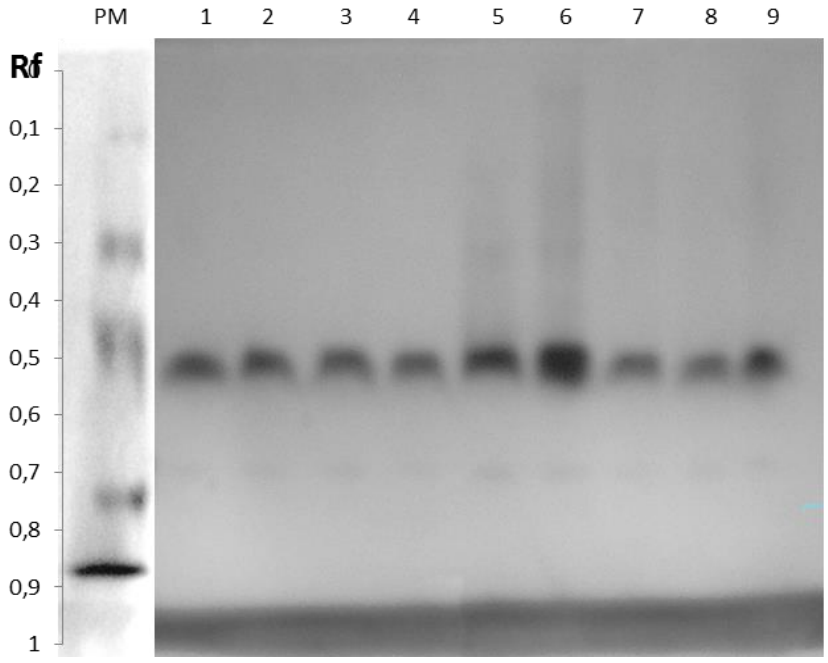


Figura 25 :Patrón de bandas representativo MDH para las localidades de estudio. Los valores verticales corresponden al Rf (movilidad relativa). Los aislamientos del 1 al 10 indicados en el encabezado son: 1 y 2 (Colonia Caroya), 3 (Oncativo), 4 y 5 (Mercedes), 6 y 7 (Tandil), 8 y 9 (La Pampa).

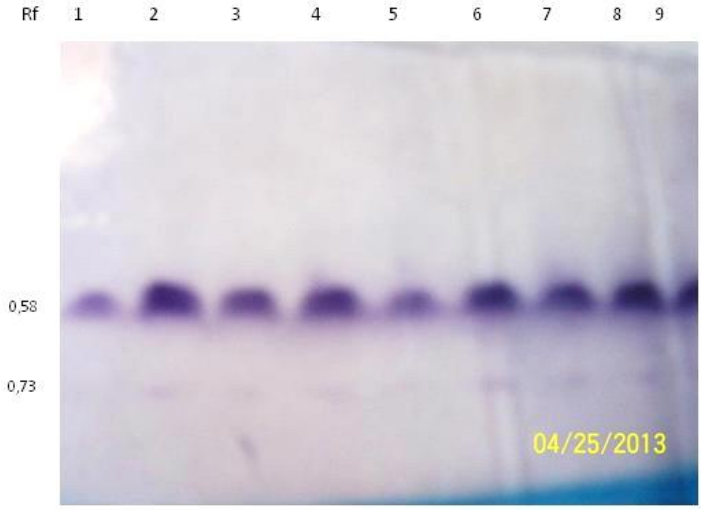
Peso Molecular de Malato deshidrogenasa		
Rf	**Log PM**	**PM**
0,39	1,89	78,4
0,5	1,74	54,4
0,54	1,68	47,6
0,58	1,62	41,4
0,61	1,58	37,8
0,64	1,53	34,2
0,69	1,46	28,4
0,71	1,43	27,1
0,74	1,39	24,5

Tabla 17 :Peso molecular de bandas de MDH estimado por el Método de Bradford

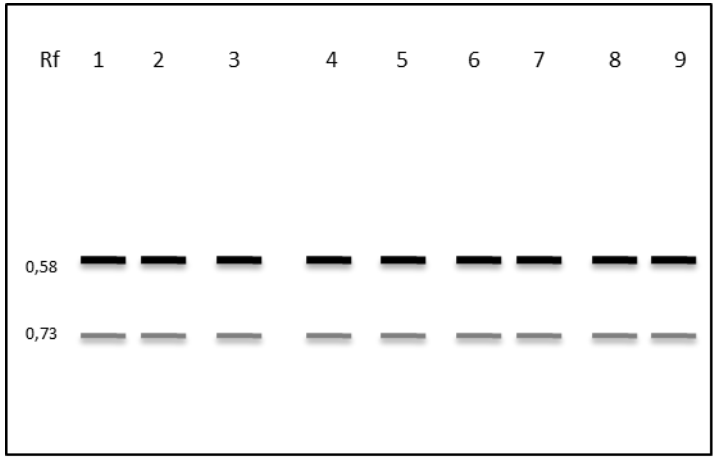
Perfiles de MDH por Provincia y localidad:

Provincia de Córdoba

Colonia Caroya

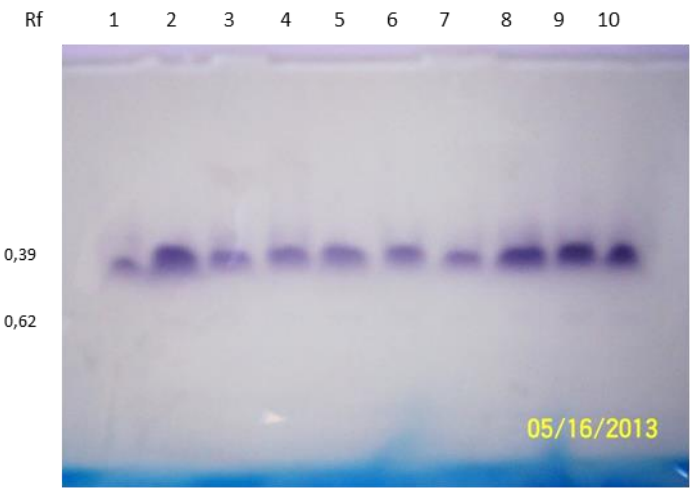


Gel de Malato deshidrogenasa correspondiente a la localidad de Colonia Caroya. Los aislamientos del 1 al 9 son: SCV11, SCG13, SCR32, SCF11, SCLC12, SCR13,SCLC32, SCG21, SCR22

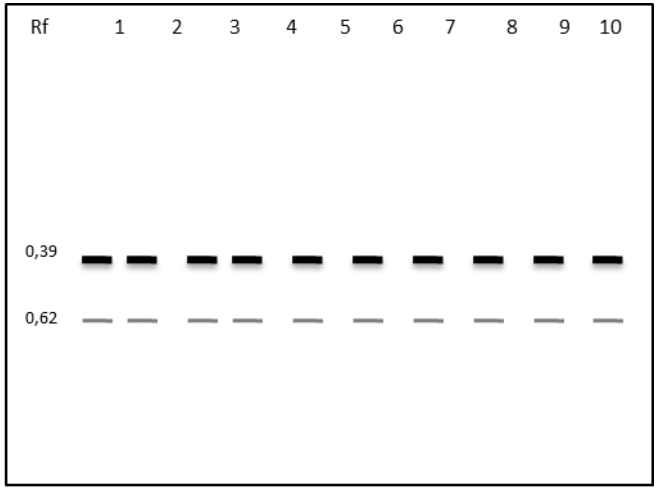


Perfil de Malato deshidrogenasa correspondiente a la localidad de Colonia Caroya. Los aislamientos del 1 al 9 son: SCV11, SCG13, SCR32, SCF11, SCLC12, SCR13,SCLC32, SCG21, SCR22

Oncativo



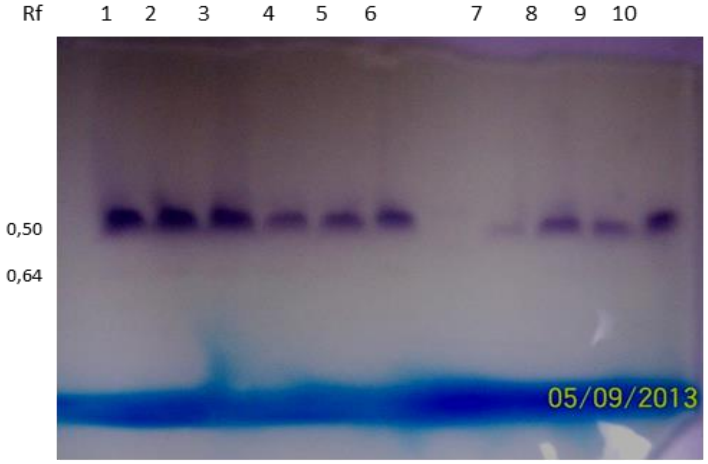
Gel de Malato Deshiddrogenasa correspondiente a la localidad de Oncativo. Del 1 al 9 los aislamientos son: SODH21, SOEF13, SOMA11, SONN11, SOPPm3, SOMA12, SOPI25, SODH25, SOPI11



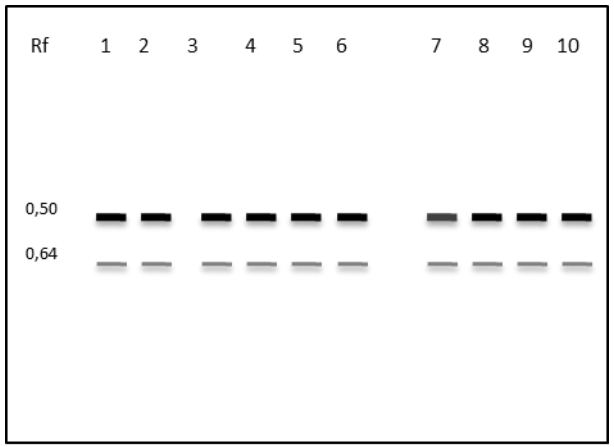
Perfil de Malato Deshiddrogenasa correspondiente a la localidad de Oncativo. Del 1 al 9 los aislamientos son: SODH21, SOEF13, SOMA11, SONN11, SOPPm3, SOMA12, SOPI25, SODH25, SOPI11

Provincia de Buenos Aires

Tandil

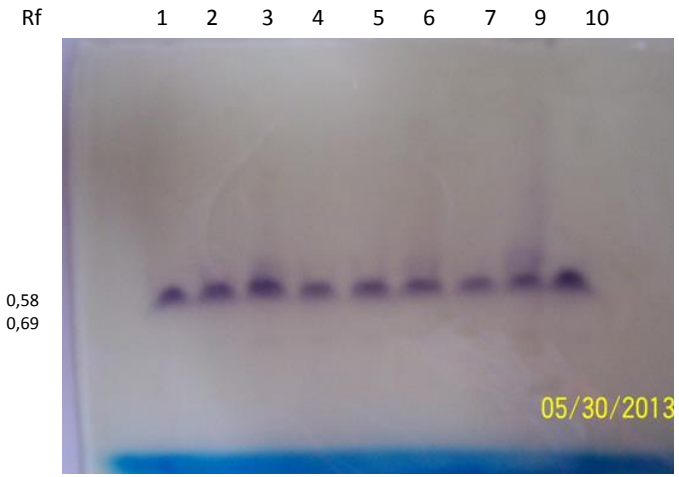


Gel de Malato Deshidrogenasa correpondiente a la localidad de Tandil. Del 1 al 9 los aislamientos son: STEI11, STDPG14, STTC21, STDPF13, STPPG22, STDPF21, STEI13, STEI23, STMSF21, STPPF11

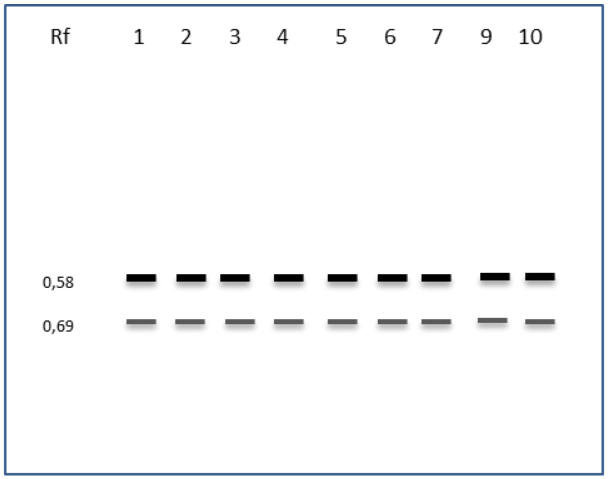


Perfil de Malato Deshidrogenasa correpondiente a la localidad de Tandil. Del 1 al 9 los aislamientos son: STEI11, STDPG14, STTC21, STDPF13, STPPG22, STDPF21 STEI13, STEI23, STMSF21, STPPF11

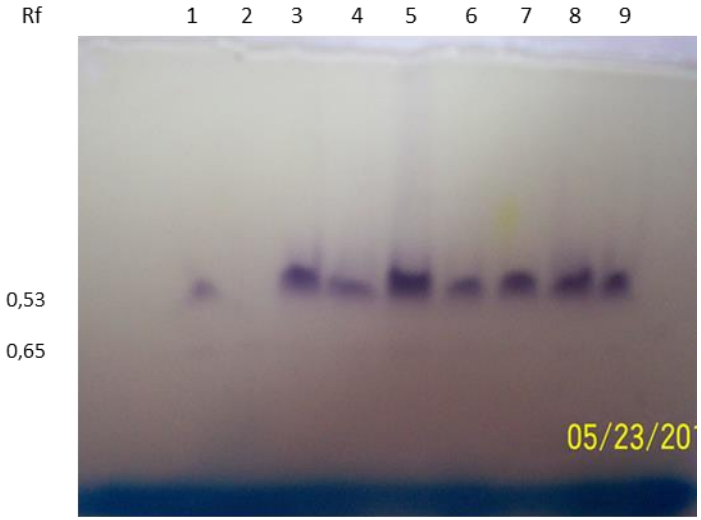
Mercedes



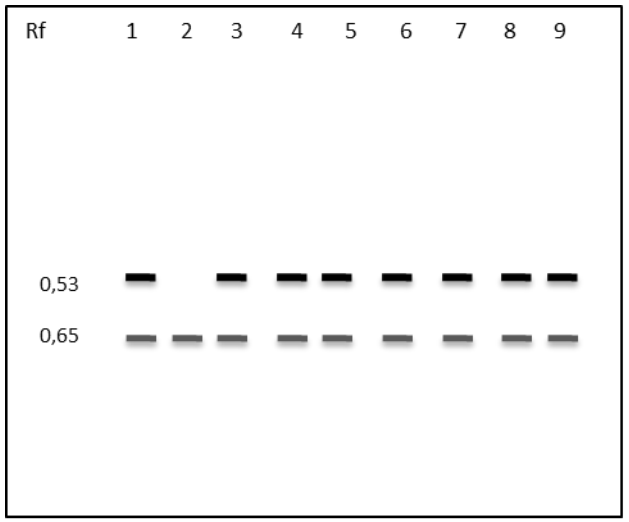
Gel de Malato Deshidrogenasa correspondiente a la localidad de Mercedes. Los aislamientos del 1 al 9 son: SMQC12, SMM14, SMLC22, SMLC12, SMQL22, SMM22, SMM23, SMM12



Provincia de La Pampa



Gel de Malato Deshidrogenasa correspondiente a las localidades de La Pampa. Los aislamientos del 1 al 9 son: SPG22, SPLEM13, SPPAM11, SPPAM13, SPG11, SPPAM21, SPPAM12, SPEP11, SPLEM12



Perfil de Malato Deshidrogenasa correspondiente a las localidades de La Pampa. Los aislamientos del 1 al 9 son: SPG22, SPLEM13, SPPAM11, SPPAM13, SPG11, SPPAM21, SPPAM12, SPEP11, SPLEM12

La isoenzima MDH en los aislamientos de cada una de las localidades de estudio, no presenta variaciones significativas en el patrón de bandas. Fueron reveladas 5 electroformas constituidas por dos bandas de diferente movilidad electroforética. Cada localidad revela una única electroforma. (Tabla 16).

Las bandas obtenidas a partir de cada uno de los zimogramas de Malato Deshidrogenasa fueron además utilizadas para elaborar una matriz de datos en la cual se tomó como valor 1: presencia de la banda y valor 0: ausencia de la banda. A partir de ésta matriz de datos presencia-ausencia se obtuvo una matriz de similitud por Coeficiente de Jaccard, que fue utilizada para establecer las relaciones entre los 48 aislamientos para los cuales se realizaron los zimogramas.

El dendrograma muestra un grupo que incluye los aislamientos de todas las localidades, a excepción del aislamiento SMLC12 de Mercedes (Figura 26), lo que puede deberse a la ausencia de polimorfismo en los patrones de bandas.

La escasa variabilidad indica que MDH no resulta una enzima adecuada para ser utilizada como marcador bioquímico que permita caracterizar las poblaciones *de P. nalgiovense* aisladas a partir de las muestras, estos resultados son consistentes con el sistema enzimático elegido que es específico de sustrato y por lo tanto sólo se revelan enzimas codificadas por alelos simples.

Similares resultados fueron obtenidos por Banke y col. (1997) quien encontró que los patrones de MDH en *P. chrysogenum* y especies relacionadas, entre ellas *P. nalgiovense* presentan sólo dos bandas de diferente movilidad y por lo tanto escasa variabilidad entre especies.

.

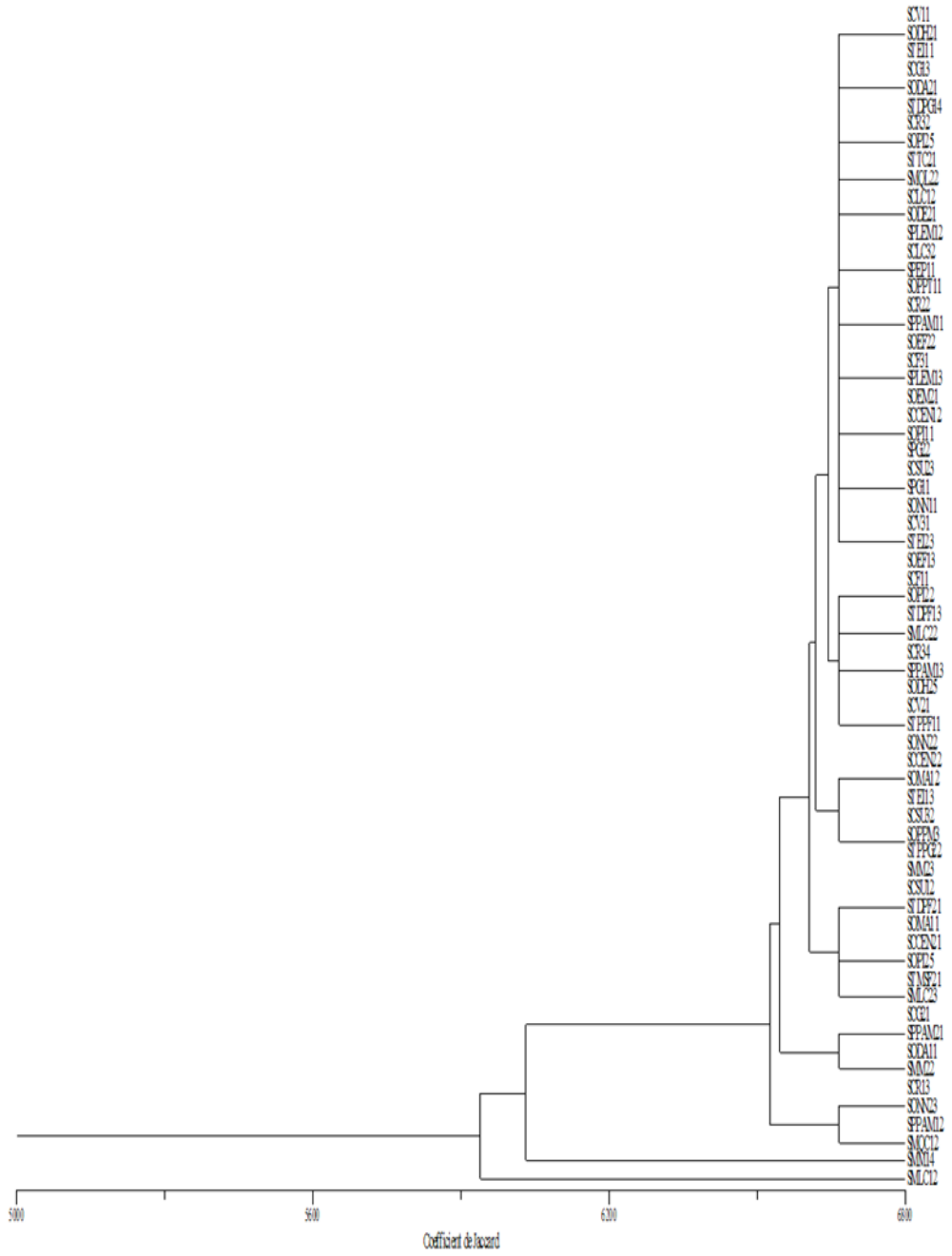


Figura 26: Dendrograma del análisis de agrupamiento UPGMA efectuado a partir de los datos obtenidos de los perfiles de Malato Deshidrogenasa de las localidades de estudio

II. 2 c) (III) Perfil de Glutamato Oxalacetato Transaminasa

Los resultados del análisis de las bandas obtenidas por electroforesis permitieron detectar una única banda en los geles correspondientes a cada una de las localidades de estudio cuyo valor de Rf se presenta en un intervalo de movilidad anódica que varía entre 0.12 a 0.22, según la localidad de estudio (Figura 27)

El peso molecular de las bandas obtenidas varía en un intervalo de 138 a 190 KDa. (Tabla 18).

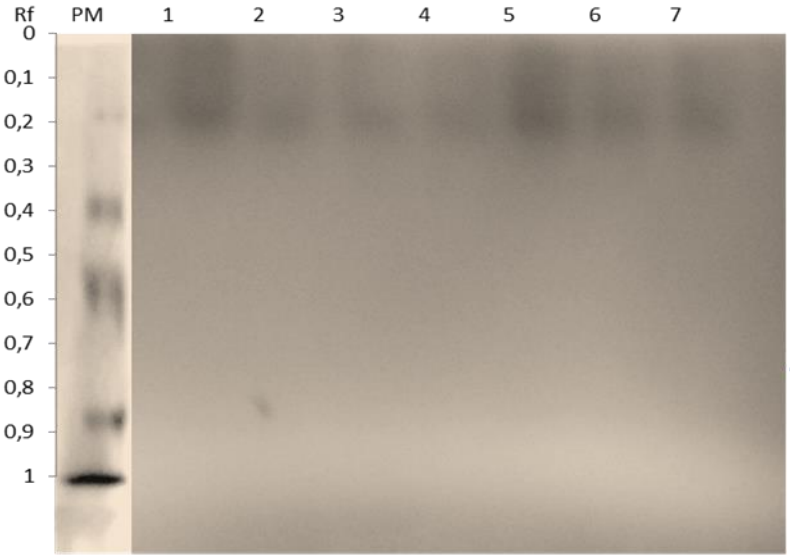


Figura 27: patrón de bandas de Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT) para las localidades de estudio. Los valores verticales corresponden al Rf(movilidad relativa). Los aislamientos del 1 al 7 son: 1 y2 (Oncativo), 3 y 4 (Mercedes), 5 (Colonia Caroya), 6 (Tandil) y 7 (La pampa). PM:Peso Molecular

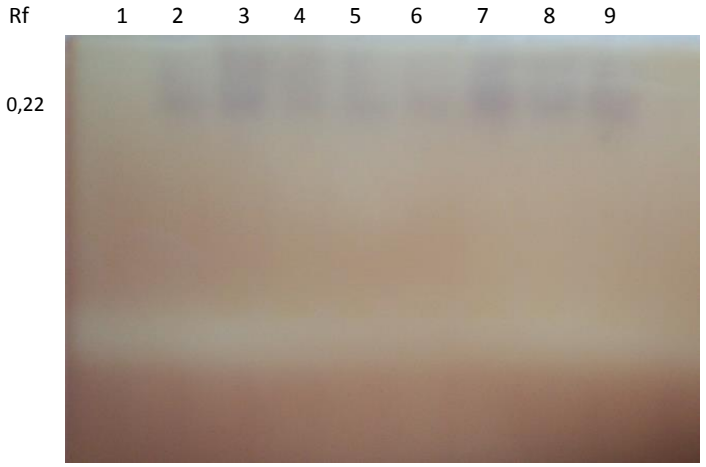
Peso Molecular de Glutamato Oxalacetato Deshidrogenasa		
Rf	***Log PM***	***PM***
0,12	2,28	192,11
0,14	2,25	179,77
0,17	2,21	162,73
0,2	2,17	147,30
0,22	2,14	138,03

Tabla 18 :Peso molecular de bandas de GOT estimado por el Método de Bradford

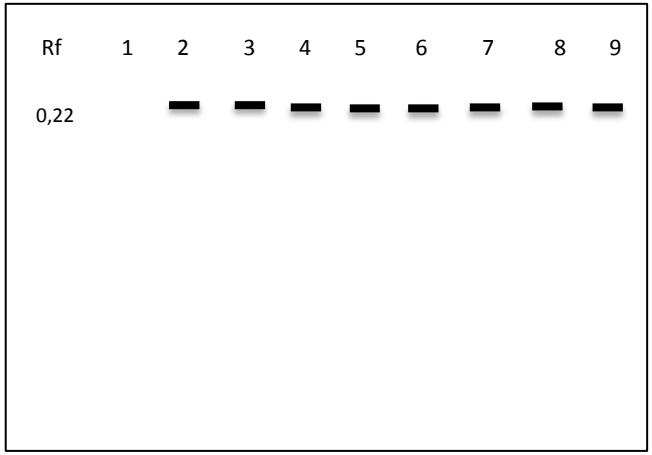
Perfiles de Glutamato Oxalacetato Transaminasa (GOT) por Provincia y Localidad

Provincia de Córdoba

Colonia Caroya

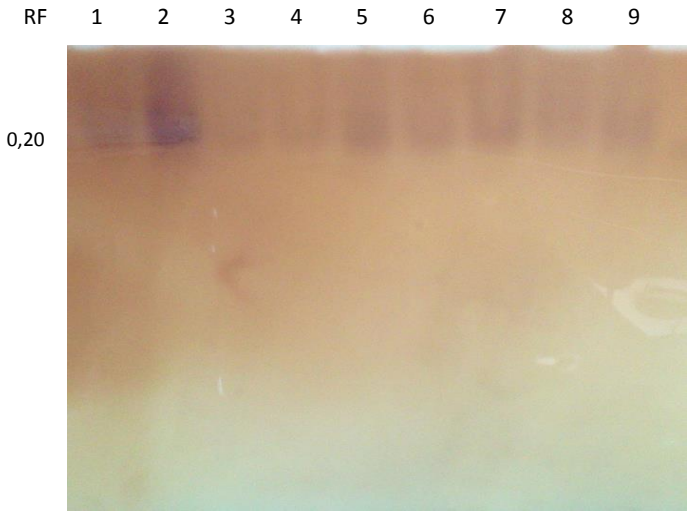


Gel de Glutamato Oxalacetato Transaminasa correspondiente a la localidad de Colonia Caroya. Los aislamientos del 1 al 10 son: SCF31, SCV21, SCV31, SCSU12, SCSU23, SCR34, SCCEN12, SCCEN21, SCCEN22, SCSU32

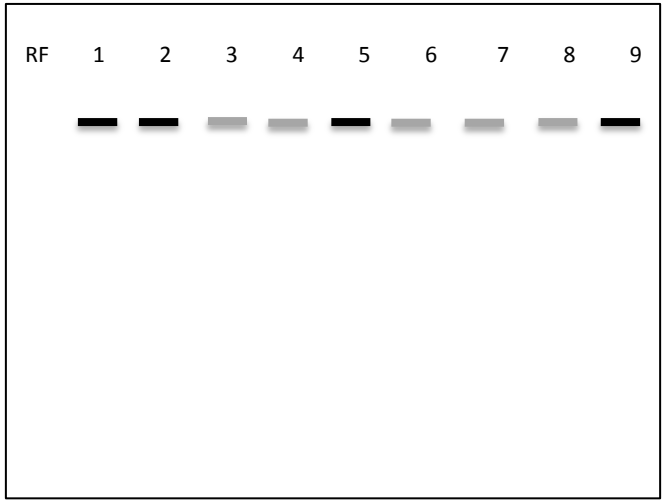


Perfil de bandas de Glutamato Oxalacetato Transaminasa correspondiente a la localidad de Colonia Caroya. Los aislamientos del 1 al 10 son: SCF31, SCV21, SCV31, SCSU12, SCSU23, SCR34, SCCEN12, SCCEN21, SCCEN22, SCSU32

Oncativo



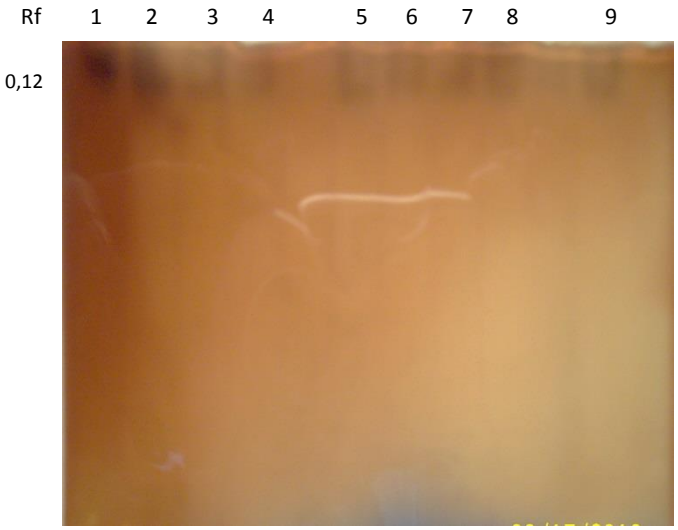
Gel de Glutamato Oxalacetato Transaminasa correspondiente a la localidad de Oncativo. Los aislamientos del 1 al 9 son: S0DH21, S0EF13, S0MA11, S0NN11, S0PPm3, S0MA12, S0PI25, S0DH25, S0PI11



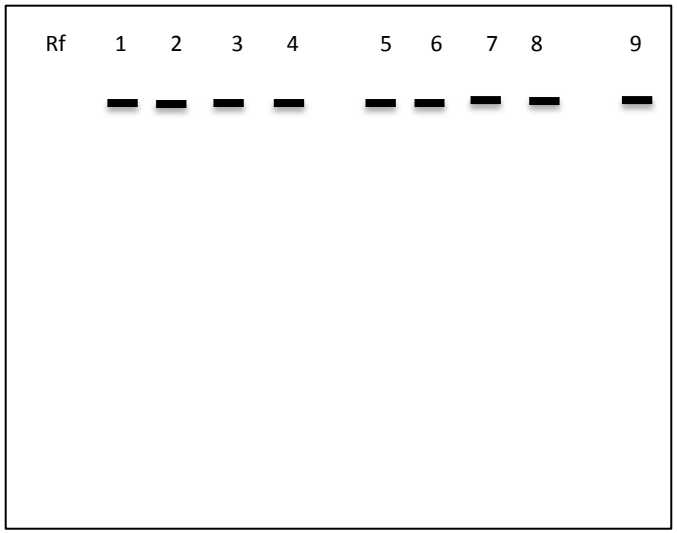
Perfil de bandas de Glutamato Oxalacetato Transaminasa correspondiente a la localidad de Oncativo. Los aislamientos del 1 al 9 son: S0DH21, S0EF13, S0MA11, S0NN11, S0PPm3, S0MA12, S0PI25, S0DH25, S0PI11

Provincia de Buenos Aires

Tandil

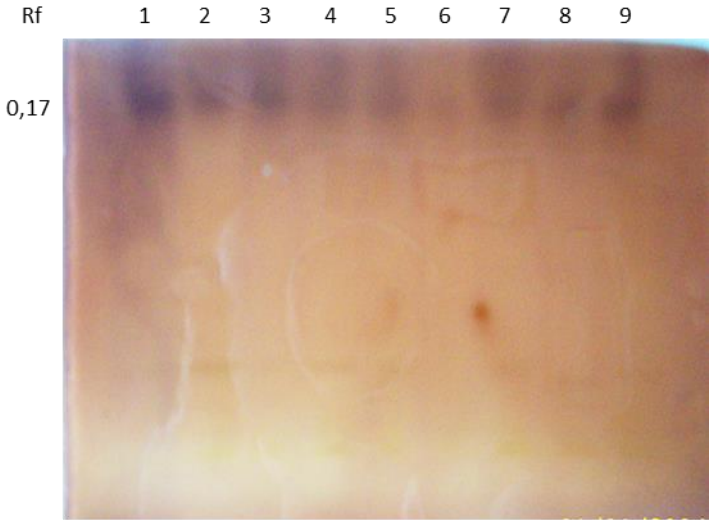


Gel de Glutamato Oxalacetato Transaminasa correspondiente a la localidad de Tandil. Los aislamientos del 1 al 10 son: STEI11, STDPG14, STTC21, STDPF13, STPPG22, STDPF21, STEI13, STEI23, STMSF21, STPF11



Perfil de bandas Glutamato Oxalacetato Transaminasa correspondiente a la localidad de Tandil. Los aislamientos del 1 al 10 son: STEI11, STDPG14, STTC21, STDPF13, STPPG22, STDPF21, STEI13, STEI23, STMSF21, STPF11

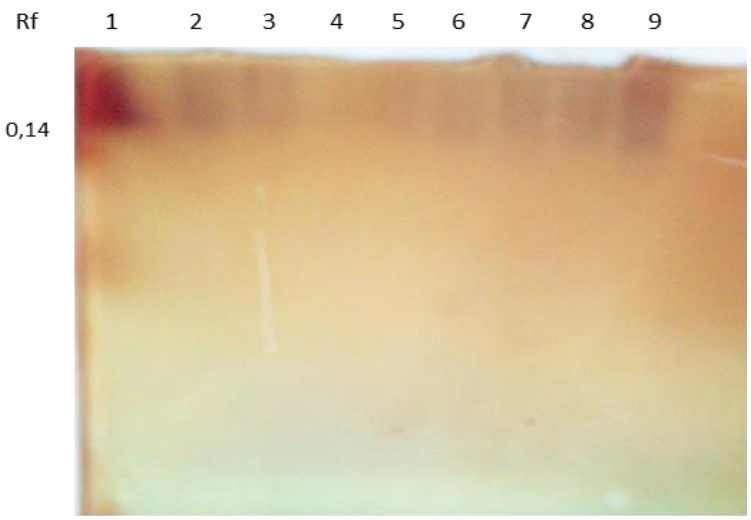
Mercedes



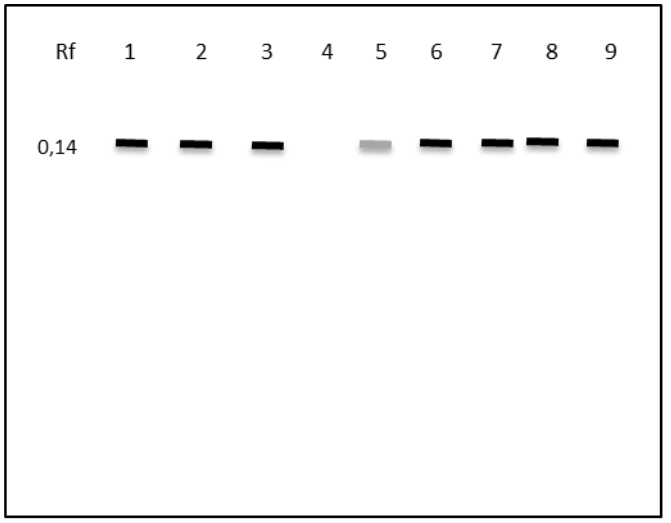
Gel de Glutamato Oxalacetato Transaminasa correpondiente a la localidad de Mercedes. Los aislamientos del 1 al 9 son: SMQC12, SMM14, SMLC23, SMLC22, SMLC12, SMQL22, SMM22, SMM23, SMM12,

Perfil de Glutamato Oxalacetato Transaminasa ccorrespondiente a la localidad de Mercedes. Los aislamientos del 1 al 9 son: SMQC12, SMM14, SMLC23, SMLC22, SMLC12, SMQL22, SMM22, SMM23, SMM12,

Provincia de La Pampa



Gel de Glutamato Oxalacetato Transaminasa correspondiente a las localidades de La Pampa. Los aislamientos del 1 al 9 son: SPG22, SPLEM13, SPPAM11, SPPAM13, SPG11, SPPAM21, SPPAM12, SPEP11, SPLEM12.



Perfil de Glutamato Oxalacetato Transaminasa correspondiente a las localidades de La Pampa. Los aislamientos del 1 al 9 son: SPG22, SPLEM13, SPPAM11, SPPAM13, SPG11, SPPAM21, SPPAM12, SPEP11, SPLEM12.

En el caso de la isoenzima GOT se observan 5 electroformas constituidas por una banda de diferente movilidad electroforética. Cada localidad revela una unica electroforma (Tabla 16).

El dendrograma correspondiente a esta enzima no arroja resultados que indiquen variabilidad entre los aislamientos.

Esta enzima no resulta adecuada para ser utilizada como marcador bioquímico que permita caracterizar las poblaciones de *P. nalgiovense* aisladas a partir de las muestras. Estos resultados concuerdan con la función que cumplen las Transaminasas en el metabolismo primario de los aminoácidos, por lo que son específicas de un unico sustrato y muestran un número de loci predecible y por lo tanto escasa variabilidad genética (Schmidt A. y col. 2007).

II. 2 c) (IV) Perfil de Superóxido Dismutasa (SOD. EC 1.15.1.1)

No se revelaron bandas para ésta enzima.

II. 2 c) (V) Perfil de Glucosa 6-Fosfato Deshidrogenasa (G6PDH) EC 1.1.1.49

No se revelaron bandas para ésta enzima

II. 2 e) Comparación de perfiles de isoenzimas por localidad

Los tipos electromórficos revelan una considerable variabilidad entre los 48 aislamientos de *P. nalgiovense* y entre las localidades de procedencia de dichos aislamientos. Sobre un total de 17 tipos electromórficos.

Encontramos 7 tipos electromórficos en localidades de la Provincia de Córdoba, 6 en la provincia de Buenos Aires y 4 en la provincia de La Pampa.

Provincia	*Localidad*	Aislamiento	Electroformas para las siguientes enzimas			*Tipos de Electroformas*
			α- EST	MDH	GOT	
Córdoba	Colonia Caroya	SCF31	1	1	1	A
		SCV21	1	1	1	A
		SCV31	2	1	1	B
		SCSU12	3	1	1	C
		SCSU23	3	1	1	C
		SCR34	3	1	1	C
		SCCEN12	1	1	1	A
		SCCEN21	4	1	1	D
		SCCEN22	2	1	1	B
		SCSU32	2	1	1	B
	Oncativo	SODH21	5	2	2	E
		SOEF13	6	2	2	F
		SOMA11	6	2	2	F
		SONN11	6	2	2	F
		SOPPM	7	2	2	G
		SOMA12	7	2	2	G
		SOPI25	6	2	2	F
		SODH25	6	2	2	F
		SOPI11	6	2	2	F
		SOPI11DUPLI	6	2	2	F
Buenos Aires	Tandil	STEI11	8	3	3	H
		STDPG14	9	3	3	I
		STTC21	9	3	3	I
		STDPF13	8	3	3	H
		STPPG22	10	3	3	J
		STDPF21	9	3	3	I
		STEI13	10	3	3	J
		STEI23	9	3	3	I
		STMSF21	10	3	3	J
		STPF11	10	3	3	J
	Mercedes	SMQC12	11	4	4	K
		SMM14	12	4	4	L
		SMLC23	12	4	4	L
		SMLC22	12	4	4	L
		SMLC12	12	4	4	L
		SMQL22	13	4	4	M
		SMM22	13	4	4	M
		SMM23	13	4	4	M
		SMM12	11	4	4	K
La Pampa		SPG22	14	5	5	N
		SPLEM13	14	5	5	N
		SPPAM11	15	5	5	O
		SPPAM13	16	5	5	P
		SPG11	16	5	5	P
		SPPAM21	17	5	5	Q
		SPPAM12	16	5	5	P
		SPEP11	16	5	5	P
		SPLEM12	16	5	5	P
N° de electroformas			17	5	5	17

Tabla: 16 Electroformas y tipos electromórficos detectados por provincia y localidad.

Se elaboró una matriz básica de datos para 5 aislamientos provenientes de las localidades muestreadas donde se incluyeron las bandas obtenidas para las tres enzimas. Se realizó el agrupamiento de los datos obtenidos (Figura 28)

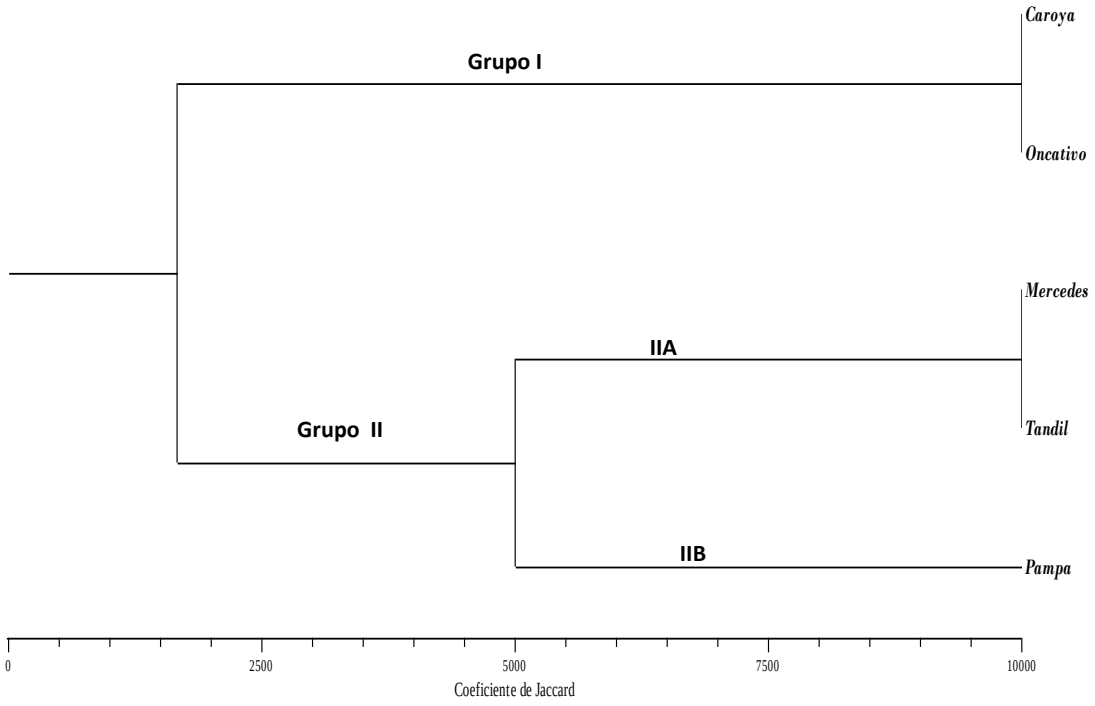


Figura: 28 Dendrograma del análisis de agrupamiento UPGMA de un aislamiento de cada localidad de estudio basado en los patrones de enzimas: α-EST, MDH y GOT.

El dendrograma obtenido se divide en dos grupos:

Grupo I: correspondiente a las localidades de Colonia Caroya y Oncativo (Provincia de Córdoba)

Grupo II: correspondiente a las localidades de Mercedes, Tandil (Provincia de Buenos Aires) y La Pampa (Provincia de La Pampa).

El grupo II se subdivide en un Subgrupo IIA cuyos aislamientos (Tandil y Mercedes) pertenecen a la provincia de Buenos Aires. Y el Subgrupo IIB que incluye los aislamientos de la Provincia de La Pampa.

Podemos inferir que los aislamientos se agrupan de acuerdo a su ubicación geográfica, independientemente de sus características morfológicas y que ambos grupos surgieron como resultado de la migración regional de individuos a partir de una población originaria y su posterior adaptación a las condiciones ambientales (Planter E.y col., 2007).

Estas observaciones son congruentes con datos históricos relacionados con los orígenes de los embutidos secos fermentados artesanales en el país, los primeros registros que se tienen de la elaboración artesanal de embutidos secos fermentados surgen en la localidad de Colonia Caroya en la Provincia de Córdoba donde se obtienen referencias del comienzo de su elaboración a partir del año 1876 (Donadoni M., 2010). Al mismo tiempo los primeros indicios de su elaboración en Tandil se remontan al año 1880, en ambos casos a partir de inmigración Italiana (Revista alimentos argentinos) Si bien no podemos afirmar sólo a partir de la observación de éstos datos, el origen de los aislamientos de *P. nalgiovense* que forman parte de la micobiota regional actual, podemos suponer un origen común que nos permita caracterizar las poblaciones.

Capítulo III

"Caracterización genética de poblaciones de *Penicillium nalgiovense* que colonizan la superficie de Embutidos Secos Fermentados Artesanales"

Objetivo

El objetivo de ésta tercer etapa fue:

"Caracterizar genéticamente los aislamientos de *Penicillium nalgiovense* obtenidos a partir de la micoflora superficial de Embutidos Secos Fermentados Artesanales de diferentes localidades productoras del país utilizando marcadores genéticos"

III. 1 Materiales y métodos

III. 1 a) Crecimiento y Obtención de micelios

Para realizar la extracción de ADN a partir de los aislamientos de *P. nalgiovense* se inocularon, por duplicado, placas de 90 mm conteniendo Agar Extracto de Malta (MEA) a partir de los aislamientos conservados en freezer a -80 °C. La inoculación se realizó con ansa aguja en dos puntos de la placa.

Los cultivos fueron incubados durante 7 días a 25°C. Luego de transcurrido el tiempo de incubación se recolectaron los micelios de las colonias en condiciones estériles: bajo campana, con un bisturí previamente flameado en alcohol 90° se raspó la superficie de la colonia con espátula metálica estéril para retirar el micelio (teniendo cuidado de no arrastrar medio de cultivo). Se pesaron ≤100 mg de micelio de cada aislamiento que se colocó en tubos eppendorf de 1 ml e inmediatamente se guardaron a -80°C.

III. 1 b) Extracción de ADN genómico

Para la extracción se utilizó el siguiente protocolo correspondiente al kit DNAeasy Plant Mini (QIAGEN), teniendo en cuenta que los Buffers se deben resuspender y permanecer a temperatura ambiente:

1-Colocar en un mortero previamente esterilizado, < 100mg del micelio que fue conservado a -80°C, agregar N2 líquido e inmediatamente moler hasta obtener un fino polvo. Traspasar el micelio molido a eppendorf.

2- Agregar 400 ul de Buffer AP1 y 4 ul de RNAsa. Mezclar en incubar por 10 min a 65°C en bloque seco.

3- Adicionar 130 ul de Buffer P3. Mezclar e incubar por 5 minutos en hielo.

4- Centrifugar el lisado por 5 min a 14000 rpm (20000 x g).

5- Pipetear el lisado en la columna QIAshredder spin (sobre tubos de colección de 2 ml). Centrifugar por 2 min a 14000 rpm (20000 x g).

6- Transferir lo que escurre dentro de un nuevo eppendorf, sin romper el pellet. Agregar 1,5 volúmenes de Buffer AW1 y mezclar por pipeteo.

7- Transferir 650 ul de la mezcla en las columnas DNeasy Mini spin en tubos colectores de 2 ml. Centrifugar por 1 min a ≥ 8000 rpm (≥6000 x g). Descartar lo que escurre. Repetir éste paso con la muestra remanente.

8- Pasar la columna en un nuevo tubo de colección de 2 ml. Adicionar 500 ul de Buffer AW2 y centrifugar por 1 minuto a ≥8000 rpm. Descartar el sobrenadante.

9- Agregar otros 500 ul de Buffer AW2. Centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm.

10- Transferir la columna a un eppendorf de 2 ml.

11- Agregar 100 ul de Buffer AE para elución. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente (15-25°C). Centrifugar por 1 minuto a ≥ 8000 rpm.

12- Repetir el paso anterior.

III. 1 c) Calidad del ADN extraído

La misma fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, de acuerdo al protocolo que se describe a continuación:

1- Preparar la solución para el gel de corrida al 0,8% (Anexo I)

2-Armar el soporte para la cuba horizontal, colocar los peines y cubrir con el gel. Dejar solidificar.

3-Armar la cuba.

4- Paralelamente sobre parafilm colocar aproximadamente 1,5 ul de buffer de carga (0,25% azul de bromofenol, 40% de sacarosa) por cada muestra a correr.

5- Tomar 5 ul de muestra y mezclar con el colorante.

6- Sembrar los 6,5 ul totales en cada una de las calles del gel.

7- Dejar una calle para sembrar el marcador.

8- Realizar la corrida por 1 hora, a 80 volts.

Los fragmentos, tenidos con Gel Red, se visualizaron con un transiluminador de luz UV

III. 1 d) Cuantificación del DNA extraído

La cuantificación del DNA extraído se llevó a cabo en un fluorómetro QUBIT 2.0 (Invitrogen), utilizando el kit para tal fin Quant-iT TM Assay de acuerdo al protocolo suministrado por el proveedor (figura 29), presentado a continuación:

1-Preparar 2 tubos de PCR para los standard y un tubo para cada muestra.

2- preparar la solución de trabajo en una dilución 1:200 de Qubit*reagent en Qubit*buffer.

3-Preparar los tubos con los siguientes volúmenes de la solución de trabajo: 190 ul en los tubos del standard (Volúmen final 200 ul) y 199 ul en los tubos correspondientes a las muestras (Volúmen final 200 ul).

4- Vortexear los tubos por 2-3 segundos.

5- Incubar los tubos a temperatura ambiente.

6- Insertar los tubos en el fluorómetro Qubit*2.0 y tomar la lectura correspondiente, en ng/ml de concentración.

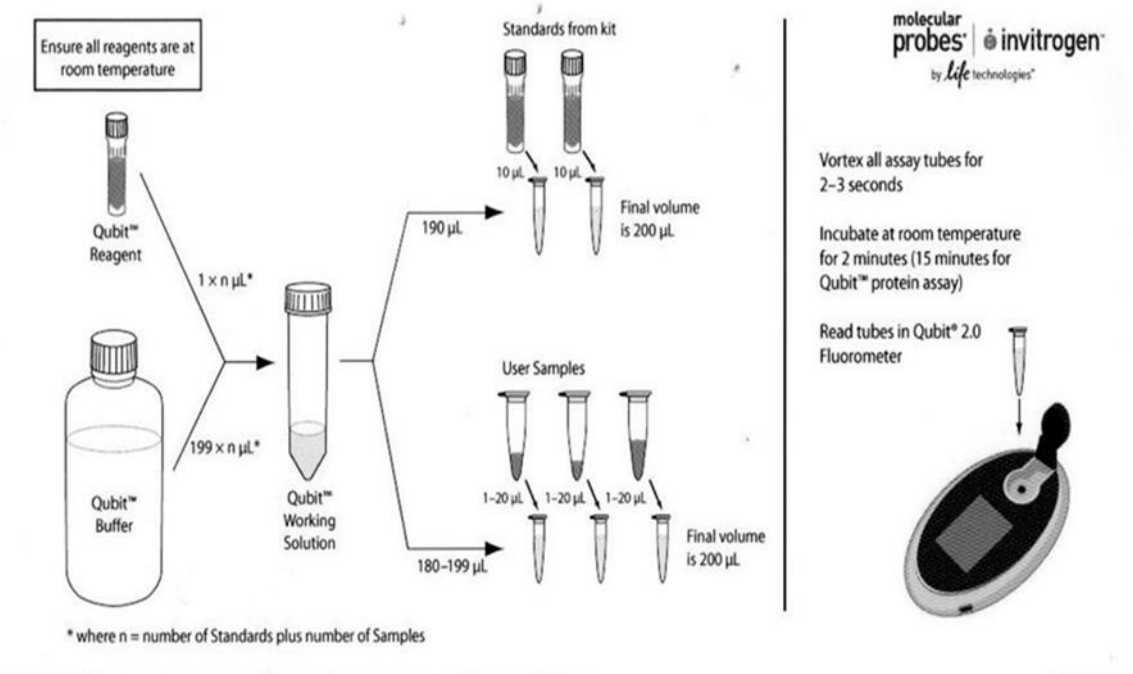


Figura 28: Protocolo de cuantificación de ADN

III.1 e) Conservación del ADN

El ADN extraído fue alicuotado y conservado en freezer a -20°C y hasta su uso.

III. 1 f) Confirmación de Identidad de los aislamientos de *P. nalgiovense*

Amplificación por PCR de la secuencia de ADN 5,8 S a partir de primers de ITS 1 e ITS 4

Se estudiaron secuencias de nucleótidos que incluían una sección del ADN ribosomal que comprende el gen que codifica para 5,8S y las secuencias de los espaciadores intergénicos ITS1 e ITS4 (ITS – Internal Trascribed Spacers).

Las regiones ITS de un total de 33 aislamientos de *P.nalgiovense*, identificados de acuerdo a sus caracteres morfológicos, fueron amplificadas y secuenciadas, y las secuencias determinadas utilizadas para confirmar la identidad de la especie. La región 5,8S del ADN ribosomal y los fragmentos ITS 1 y 4 se amplificaron según el método descrito por White y col.(1990).

La secuencia de los primers utilizados fue:

ITS1 -5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3'

ITS4 -5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

descritos por White *y col.* (1990).

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20 *u*l de la siguiente mezcla de reacción:

Mezcla de reacción para PCR

Componentes de la reacción	Concentración inicial de los reactivos	Concentración final de los reactivos	Volumen para una reacción (*u*l)
Buffer de reacción	10X	1X	2,0
Primer Forward(ITS1)	10*u*M	1*u*M	2,0
Primer Reverse (ITS4)	10*u*M	1*u*M	2,0

Mix dNTPs	2,5 mM c/u	200 *u*M c/u	1,6
MgCl2	25mM	1,5mM	1,2
Taq polimerasa	5 U/*u*l	1 U	0,2

El volumen total de la mezcla de reacción se calculó de acuerdo a la cantidad de muestras a amplificar, teniendo en cuenta que se agrega un control negativo en el que el ADN se reemplazó por agua MilliQ estéril. A continuación se prepararon los tubos para amplificar cada una de las muestras, de acuerdo al siguiente protocolo:

1- Agregar en cada tubo de PCR el volumen de agua MilliQ estéril, teniendo en cuenta el volumen de la muestra. (Volúmen final: 11*u*l)

2- Agregar 9 ul de la mezcla de reacción en los tubos de PCR.

3- Agregar 25 ng de ADN genómico en cada tubo.

4- Para el control negativo agregar 1 ul de agua MilliQ

5- Vortexear los tubos y colocar en el termociclador.

(Modificado de Alghami et.al, 2012; Mishra et al, 2011)

El proceso de amplificación se llevó a cabo teniendo en cuenta el siguiente programa:

1. Desnaturalización inicial: 94°C durante 3 minutos.
2. Desnaturalización: 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos.
3. Alineamiento: 55 °C durante 30 segundos.
4. Extensión: 72°C durante 1 minuto.
5. Extensión final: 72°C durante 5 minutos.

El mismo se llevó a cabo en un termociclador Labnet MultiGene PCR.

Análisis de secuencias de los fragmentos amplificados

Los productos de amplificación fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc. Seul (República de Corea).

Los productos se analizaron mediante secuenciación de cadena simple. La reacción de secuenciación permitió obtener fragmentos de 500 a 600 nucleótidos. La secuencia de datos fue proporcionada en formato alfabético como archivo ABI, mostrando la secuencia completa y como electroferograma. (Figura 29).

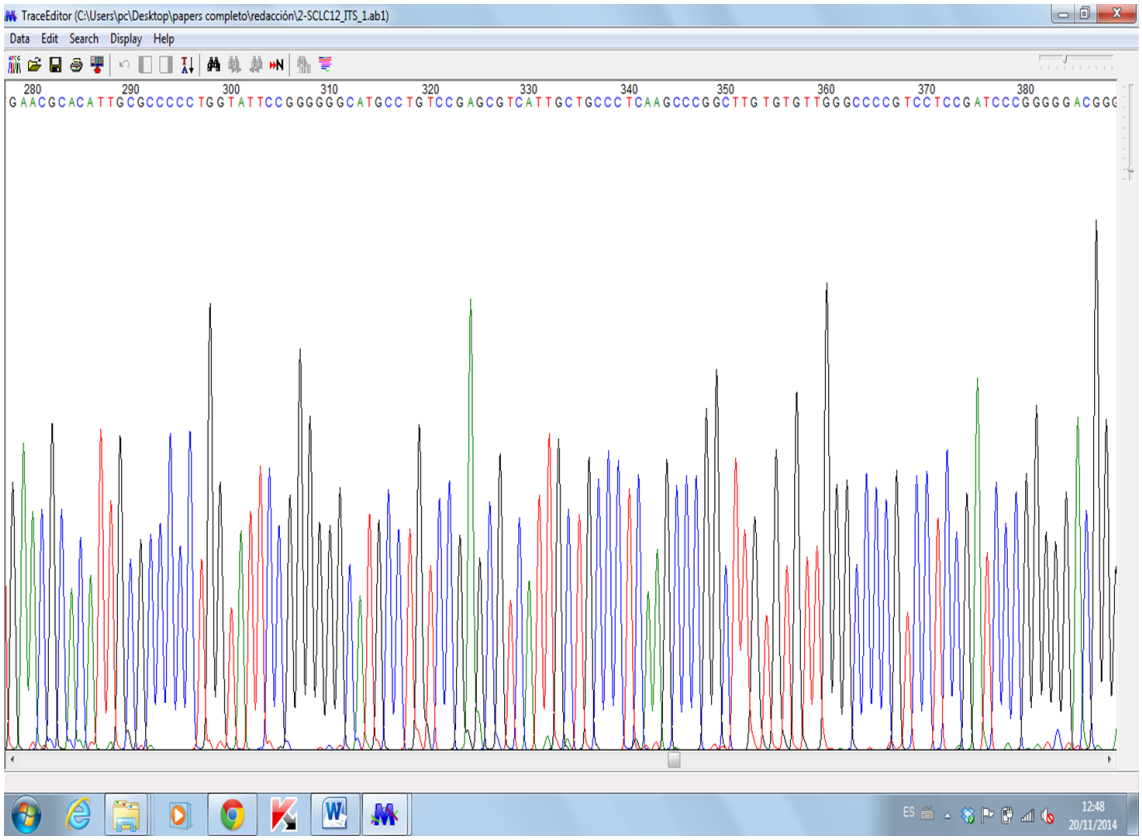


Figura 29: Sección de un Electroferograma correspondiente al aislamiento SCLC12 de *Penicillium nalgiovense* (Macrogen Inc)

Las secuencias obtenidas a partir de los electroferogramas resultantes de la amplificación fueron utilizados para llevar a cabo el alineamiento por el método MUSCLE del programa MEGA 6.0.

Previo al alineamiento las secuencias fueron controladas manualmente para evitar errores de lectura y luego comparadas, para obtener la identificación más probable, utilizando el programa BLAST (Basic local alignment Search Tool), de la base de datos del Centro Nacional de Biotecnología.

Las secuencias alineadas fueron utilizadas para elaborar un árbol filogenético utilizando el método estadístico UPGMA (Ligamiento promedio no ponderado) usando el programa MEGA 6.0

III. 1 g) Caracterización Genética de aislamientos de *P. nalgiovense* por SRAP-PCR

La técnica de SRAP-PCR fué originalmente propuesta por para evaluar la diversidad genética en plantas (Li G y col., 2001; Li J y co, 2014). Debido a que no es necesario conocer la secuencia del genoma y a que permite la detección de multiples loci actualmente se lo utiliza como marcador genético en una amplia gama de organismos (Ahmad R.y col., 2004; Rahman M. y col., 2007; Feng F. y col.,2009; Martin E. y col., 2008; Espósito M y col., 2011; Mishra M y col.,2011, Alghami y col 2012). En hongos fué utilizado para evaluar la generación de polimorfismos en Puccinia striiformis, patógeno del trigo (Pasquali M y col., 2010) y la diversidad genética de Ganoderma (Sun S.y col.,2005).

Teniendo en cuenta los primers reportados en los trabajos mencionados previamente, hemos seleccionado un total de 11 (5 Forward y 6 Reverse) en un primer intento por verificar la aplicabilidad de ésta técnica en la evaluación de la variabilidad genética de los aislamientos de *P. nalgiovense* de las localidades de estudio (Tabla 19)

Tabla 19: Primers Seleccionados para SRAP

Primers Forward	**Primers reverse**
Me1: TGAGTCCAAACCGGATA	em1:GACTGCGTACGAATTAAT
Me2: TGAGTCCAAACCCCAGC	em2 GACTGCGTACGAATTAAC
Me3: TGAGTCCAAACCGGAAT	em3:GACTGCGTACGAATTGAC
Me4: TGAGTCCAAACCGGACC	em4:GACTGCGTACGAATTTGA
Me6:TGAGTCCAAACCGGACA	em4:GACTGCGTACGAATTTGA
	em16:GACTGCGTACGAATTGTC

(Alghami et.al, 2012; Mishra et al, 2011)

Un total de 17 combinaciones de estos primers fueron testeadas para evaluar su capacidad de brindar productos de amplificación por PCR. Dichas combinaciones se muestran en la tabla 20

Tabla 20: Combinaciones de Primers usadas para SRAP

	Forward	Reverse
1	Me1: TGAGTCCAAACCGGATA	em1:GACTGCGTACGAATTAAT
2	Me1: TGAGTCCAAACCGGATA	em2:GACTGCGTACGAATTAAC
3	Me1: TGAGTCCAAACCGGATA	em3:GACTGCGTACGAATTGAC
4	Me2: TGAGTCCAAACCCCAGC	em1: GACTGCGTACGAATTAAT
5	Me2: TGAGTCCAAACCCCAGC	em2 GACTGCGTACGAATTAAC:
6	Me3: TGAGTCCAAACCGGAAT	em1: GACTGCGTACGAATTAAT
7	Me3: TGAGTCCAAACCGGAAT	em2: GACTGCGTACGAATTAAC
8	Me4: TGAGTCCAAACCGGACC	em2: GACTGCGTACGAATTAAC
9	Me4: TGAGTCCAAACCGGACC	em3: GACTGCGTACGAATTGAC
10	Me3:TGAGTCCAAACCGGAAT:	em3: GACTGCGTACGAATTGAC
11	Me2: TGAGTCCAAACCCCAGC	em2: GACTGCGTACGAATTAAC
12	Me1: TGAGTCCAAACCGGATA	em16:GACTGCGTACGAATTGTC
13	Me2: TGAGTCCAAACCCCAGC:	em16::GACTGCGTACGAATTGTC
14	Me2: TGAGTCCAAACCCCAGC:	em4:GACTGCGTACGAATTTGA
15	Me4: TGAGTCCAAACCGGACC	em16:GACTGCGTACGAATTGTC
16	Me6:TGAGTCCAAACCGGACA	em3: GACTGCGTACGAATTGAC
17	Me1:TGAGTCCAAACCGGATA:	em6:GACTGCGTACGAATTGCA

Estos 17 pares de primers fueron probados en 4 aislamientos de *P. nalgiovense*, seleccionados azar de cada una de las localidades de estudio:

1- *P. nalgiovense.* Biotipo 4 (SPPAM21). Provincia de La Pampa

2- *P. nalgiovense*. Biotipo 4 (STTC21). Localidad de Tandil. Provincia de Buenos Aires.

3- *P. nalgiovense.* Biotipo 4 (SOPPm3). Localidad de Oncativo. Provincia de Córdoba.

4- *P. nalgiovense*. Biotipo 4 (SCSU32). Localidad de Caroya. Provincia de Córdoba.

De las 17 combinaciones de primers aquellas que mostraron amplificación de bandas fueron seleccionadas y utilizadas para analizar 22 aislamientos de *P. nalgiovense* de las 5 diferentes localidades productoras estudiadas (Tabla 21)

		Aislamiento	Localidad	Provincia
1	SCCEN12	*P. nalgiovense Biotipo 6*	Colonia Caroya	Córdoba
2	SCSU32	*P. nalgiovense Biotipo 4*	Colonia Caroya	Córdoba
3	SCG13	*P. nalgiovense Biotipo 6*	Colonia Caroya	Córdoba
4	SCSU12	*P. nalgiovense Biotipo 4*	Colonia Caroya	Córdoba
5	SOPPT1	*P. nalgiovense Biotipo 4*	Oncativo	Córdoba
6	SOPI11	*P. nalgiovense Biotipo 4*	Oncativo	Córdoba
7	SOEF13	*P. nalgiovense Biotipo 6*	Oncativo	Córdoba
8	SOPPm3	*P. nalgiovense Biotipo 4*	Oncativo	Córdoba
9	SPPAM21	*P. nalgiovense Biotipo 4*	General Campos	La Pampa
10	SPG22	*P. nalgiovense Biotipo 5*	Jacinto Arauz	La Pampa
11	SPPAM13	*P. nalgiovense Biotipo 3*	General Campos	La Pampa
12	SPG11	*P. nalgiovense Biotipo 5*	Jacinto Arauz	La Pampa
13	SPPAM21	*P. nalgiovense Biotipo 4*	General Campos	La Pampa
14	STDPF21	*P. nalgiovense Biotipo 6*	Tandil	Buenos Aires
15	STTC21	*P. nalgiovense Biotipo 4*	Tandil	Buenos Aires
16	STDPG14	*P. nalgiovense Biotipo 4*	Tandil	Buenos Aires
17	STPPG22	*P. nalgiovense Biotipo 4*	Tandil	Buenos Aires
18	STTC21	*P. nalgiovense Biotipo 4*	Tandil	Buenos Aires
19	SMLC12	*P. nalgiovense Biotipo 4*	Mercedes	Buenos Aires
20	SMQL13	*P. nalgiovense Biotipo 3*	Mercedes	Buenos Aires
21	SMLC23	*P. nalgiovense Biotipo 1*	Mercedes	Buenos Aires
22	SMM23	*P. nalgiovense Biotipo 1*	Mercedes	Buenos Aires

Tabla 21: Aislamientos testeados por SRAP-PCR

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 20 *u*l de la siguiente mezcla de reacción:

Mezcla de reacción para SRAP-PCR			
Componentes de la reacción	Concentración inicial de los reactivos	Concentración final de los reactivos	Volumen para una reacción (*u*l)
Buffer de reacción	10X	1X	2,0
Primer Forward	1*u*M	0,1*u*M	2,0
Primer Reverse	1*u*M	0,1*u*M	2,0
Mix dNTPs	2,5 mM c/u	200 *u*M c/u	1,6
MgCl2	25mM	1,5mM	1,2
Taq polimerasa	5 U/*u*l	1 U	0,2

El volumen total de la mezcla de reacción se calculó de acuerdo a la cantidad de muestras a amplificar, teniendo en cuenta que se agrega un control negativo en el que el ADN se reemplazó por agua MilliQ estéril. A continuación se prepararon los tubos para amplificar cada una de las muestras, de acuerdo al siguiente protocolo

1- Agregar en cada tubo de PCR el volumen de agua MilliQ estéril, teniendo en cuenta el volumen de la muestra. (Volúmen final: 11*u*l)

2- Agregar 9 ul de la mezcla de reacción en los tubos de PCR.

3- Agregar 40 ng de ADN genómico en cada tubo.

4- Para el control negativo agregar 1 ul de agua MilliQ

5- Vortexear los tubos y colocar en el termociclador

(Modificado de Alghami et.al, 2012; Mishra et al, 2011)

El proceso de amplificación se llevó a cabo teniendo en cuenta el siguiente programa:

1- Desnaturalización inicial: 94° C durante 5 minutos.
2- Desnaturalización: 5 ciclos a 94° C durante 1 minutos.
3- Alineamiento: 35° C durante 1 minutos.
4- Extensión: 72° C durante 1 minutos.
5- Desnaturalización: 30 ciclos a 94° C durante 1 minuto.
6- Alineamiento: 50° C durante 1 minuto.
7- Extensión: 72° C durante 1 minuto.
8- Extensión final: 72° C durante 7 minutos.

(Adaptado de Alghami et.al, 2012)

La reacción fue llevada a cabo en un Termociclador Labnet MultiGene PCR (Labnet).

Análisis de los fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, siguiendo el protocolo descripto en los ítems III 1 c) El producto de PCR (15ul) se cargó en el gel luego de mezclarlo con 5ul de buffer de carga (0,25% de azul de bromofenol, 40% de sacarosa). El tamaño molecular de los productos fue estimado por comparación visual de la distancia alcanzada con la de un estándar (100kb DNA Ladder, Genbiotech). La corrida electroforética se llevó a cabo por 2 hs aproximadamente. Una vez concluida los fragmentos fueron visualizados con un transilumminador UV. Los geles fueron realizados por duplicado.

Con los fragmentos amplificados para cada una de las localidades de estudio se elaboró una matriz básica de datos (MBD). Fueron considerados datos doble estado (presencia/ausencia).El valor 0 corresponde a la ausencia de fragmentos y el valor 1 a la presencia de fragmentos.

Una vez obtenida la MBD, se cuantificó el parecido o similitud (o sus diferencias) entre un par de datos de dicha matriz por medio de Coeficientes de Asociación de Jaccard (CAJ). Los valores de similitud obtenidos a partir de éste coeficiente varían entre 0 (mínima similitud) y 1 (máxima similitud). Se expresa como:

$$CAJ: \quad a/(a+b+c)$$

dónde:

a (1,1): carácter presente en ambos organismos.

b (1,0): el primer organismo presenta el carácter y el segundo no lo posee.

c (0,0): carácter ausente en ambos organismos

Los resultados obtenidos a partir del Coeficiente de asociación de Jaccard, fueron utilizados para obtener una Matriz de Similitud entre pares de organismos (Sneath y Sokal, 1973). Esta matriz de similitud se utilizó para evaluar las relaciones entre la totalidad de los organismos estudiados por medio del análisis de agrupamientos. En el presente trabajo se utilizó para el agrupamiento la media aritmética no ponderada (UPGMA, "Ligamiento Promedio no ponderado) (Nuñez-Colin C.,2011, Soto A., 2006).

Se utilizó el programa NTSYS-pc para el procesamiento estadístico de los datos obtenidos y la construcción del Fenograma correspondiente.

III. 2 Resultados y discusión

III. 1 f) Confirmación de Identidad de los aislamientos de *P. nalgiovense*

Amplificación por PCR de la secuencia de ADN 5,8 S a partir de primers ITS 1 e ITS 4

La identificación a nivel molecular de los aislamientos de *P. nalgiovense* se llevó a cabo para confirmar la identificación previamente realizada a nivel morfológico, por técnicas tradicionales. Esta secuencia es altamente conservada en género *Penicillium* con sólo 29 posiciones diferentes en los nucleótidos (1,2% de variabilidad) entre diferentes especies (Skouboe J y col. 1999; Dupont J y col., 1998; Tiwari K. y col., 2011). En estudios realizados para re-clasificar *P. roqueforti* y dividirlo en variedades *P.roqueforti var. Roqueforti y P.roqueforti var carneum* se encontraron sólo dos nucleótidos de diferencia en un fragmento de 600pb de la región ITS 1 (Boysen M. y col., 1996), mientras que *P.roqueforti var. Paneum* se diferencia en 12 pb.

Se amplificaron por PCR las regiones del rDNA 5,8S y de los espaciadores intergénicos ITS 1 e ITS 4 de 33 aislamientos de *P. nalgiovense* provenientes de las localidades de estudio (Tabla 19). Los productos de amplificación visualizados por electroforesis en gel de agarosa fueron de aproximadamente 550-600 pb para cada aislamiento (Figura 30)

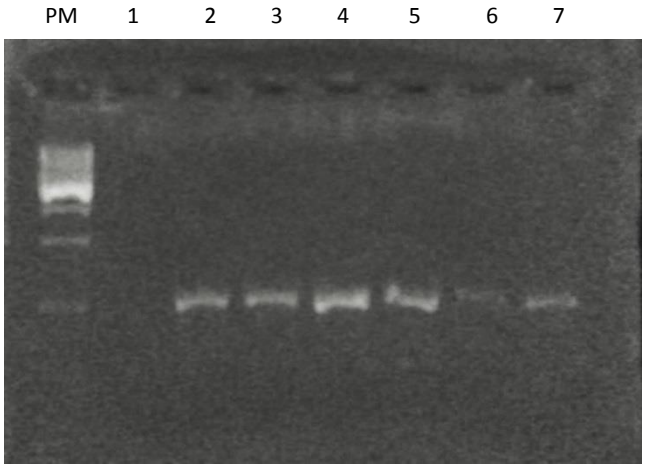


Figura 30: Productos de amplificación de la región 5,8S y los espaciadores intergénicos ITS 1 e ITS 4 de *P. nalgiovense*. Los aislamientos corresponden a: Colonia Caroya (1,2), Oncativo (3), Tandil (4,5), Mercedes (6), La Pampa (7). PM: marcador de peso molecular.

Estos resultados son coincidentes con estudios de caracterización de diferentes especies del género *Penicillium*, realizados por Tiwori K. y col.(2011) quienes amplificaron un fragmento monomórfico de aproximadamente 560 pb a partir de 10 aislamientos del género *Penicillium* de diferentes especies utilizando los primers ITS1 e ITS4 para amplificar la secuencia consenso DNAr 5,8s.

Las secuencias de los distintos aislamientos de *P. nalgiovense* fueron alineadas utilizando el algoritmo de alineamiento múltiple MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation). Al mismo tiempo dichas secuencias fueron utilizadas para corroborar la identidad a nivel especie de cada aislamiento mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que permitió comparar las secuencias consenso con aquellas depositadas en la base de datos del GenBank provista por el NCBI (National Center for Biotechnology Information). Los resultados se observan en la siguiente tabla:

N°	**Código de Aislamiento**	**Especie**	**% de Homología (BLAST)**	**N°de acceso Genbank**
1 1	SCLC12	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
2 2	SCCEN21	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
3.3	STEI13	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
4.5	SPPAM12	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
5.6	SPG11	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
6.7	SOEM21	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
7.8	SMM12	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
8.12	SCR22	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
9.13	SPPAM22	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
10.14	SMM14	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
11.16	SOPI11	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
12.17	SPLEM13	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
13.18	SMLC23	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
14.19	SPPAM21	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
15.20	SMLC12	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
16.21	STDPG14	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
17.22	SCSU32	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
18.23	SCG13	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
19.24	SPG22	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
20.25	SOPPT11	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
21.26	SPPAM13	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
22.27	SMQL13	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
23.28	SODH25	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
24.29	SCF11	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
25.30	STEI11	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
26.31	SCR13	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
27.32	STPPF21	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
28.33	SOEF13	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
29.34	SCV21	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
30.35	SMM23	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
31.37	SCV11	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
32.38	SOMA12	*P.nalgiovense*	100%	Jx997061.1
33.39	SCV31	*P.nalgiovense*	99%	Jx997061.1

Tabla 19: Aislamientos de *P. nalgiovense* seleccionados para verificar identidad por ITS.

Con el alineamiento obtenido se elaboró el siguiente dendrograma por el método de agrupamiento UPGMA. En el mismo se utilizaron como controles externos: *Aspergillus niger* NRRL 62637, *Penicillium glabrum* FJ904924.1 y *Penicillium nalgiovense* CBS 352.48.

El análisis permitió corroborar que los aislamientos caracterizados corresponden a *Penicillium nalgiovense* con un porcentaje de similitud de un 100% en 32 de los 33 aislamientos y 99% en uno de los aislamientos (SCV31).(Figura 31)

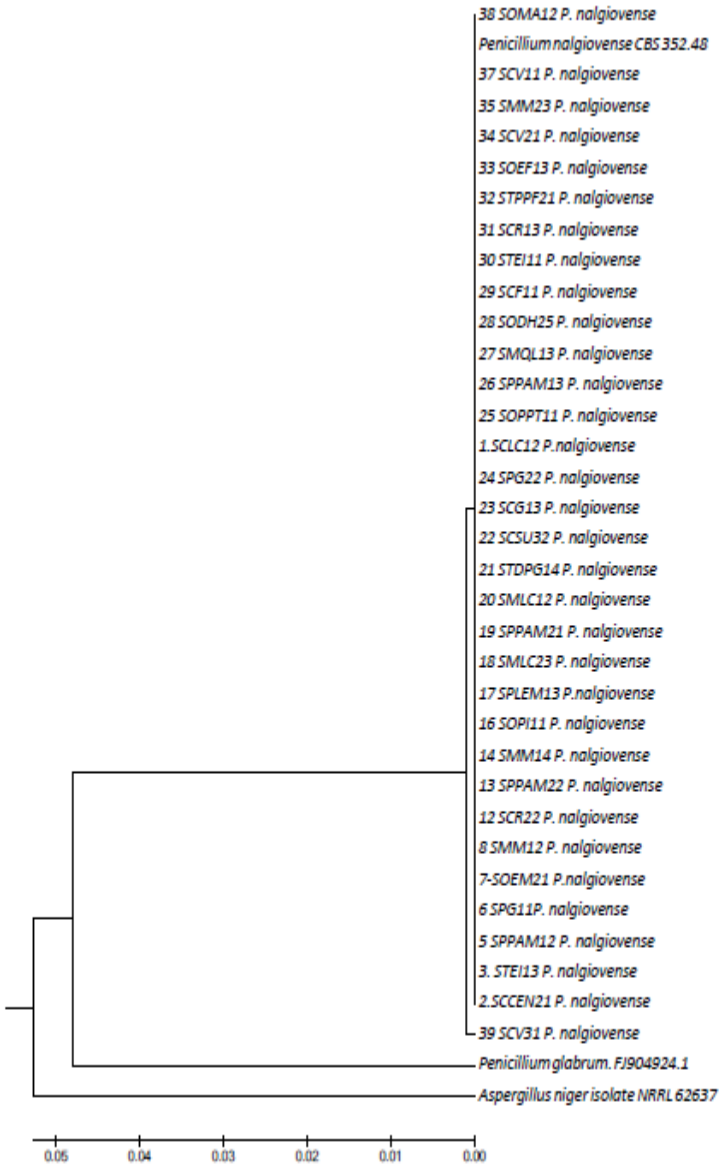


Figura 31: Dendrograma resultante del análisis de amplificación del fragmento de ADN 5,8 S usando los primers ITS1 e ITS-4

III. 2 g) Caracterización Genética de aislamientos de *P. nalgiovense* por SRAP-PCR

Considerando que no es necesaria información sobre la secuencia del genoma y que a diferencia de otros marcadores genéticos se dirige a ORF (marcos abiertos de lectura), estimándose la variación de intrones, exones, promotores y espaciadores con alto grado de polimorfismo (Li X y col., 2014), la técnica SRAP (Polimorfismos de amplificación relacionados a secuencia) puede ser usada para llevar a cabo análisis de la diversidad genética en un amplio rango de organismos (Li y col, 2013), utilizamos ésta técnica para evaluar su aplicabilidad en el estudio de la diversidad genética de las poblaciones de *P. nalgiovense* de las localidades muestreadas. Siendo ésta una primer aproximación para éste estudio seleccionamos 17 combinaciones de primers reportados en estudios previos (**ítem III 1 g**).

De las 17 combinaciones de primers SRAP-PCR se obtuvo amplificación de fragmentos en 4 combinaciones (Tabla 20)

Me1: TGAGTCCAAACCGGATA	**em16:GACTGCGTACGAATTGTC**
Me1: TGAGTCCAAACCGGATA	**em2:GACTGCGTACGAATTAAC**
Me2: TGAGTCCAAACCCCAGC:	**em16::GACTGCGTACGAATTGTC**
Me2: TGAGTCCAAACCCCAGC:	**em4:GACTGCGTACGAATTTGA**

Tabla 20: Combinaciones de Primers SRAP-PCR que presentaron amplificación

Estas combinaciones de primers fueron posteriormente testeadas en los 22 aislamientos seleccionados (Tabla 19). Como resultado se amplificaron un total de 10 fragmentos: 1 fragmento con las combinaciones Me1-em2 y Me1-em16; 2 fragmentos con Me2-em16 y 6 fragmentos con Me2-em4.

Las siguientes figuras corresponden a los fragmentos de amplificación para cada par de primers:

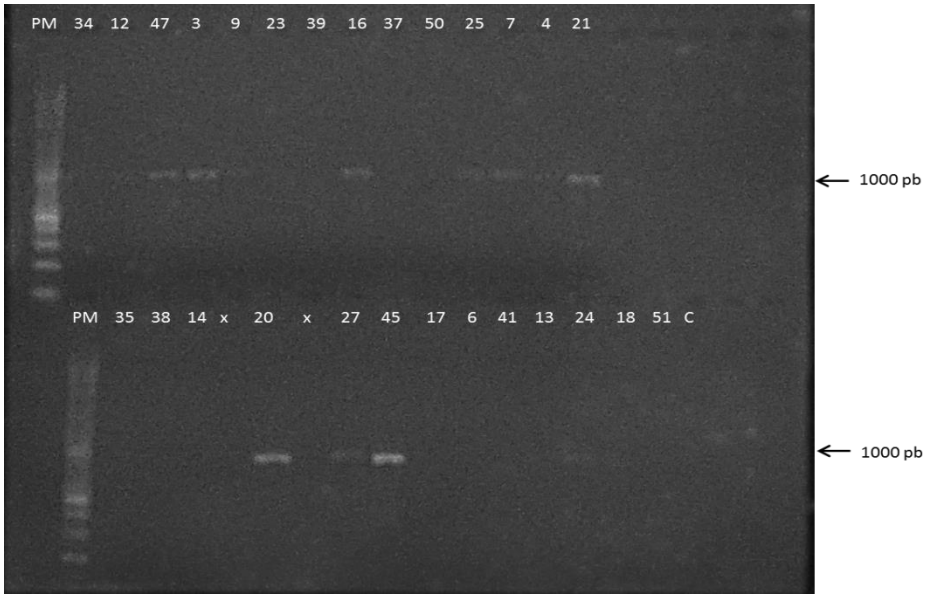


Figura 32: Patrón de amplificación de SRAP-PCR obtenido con el par de primers Me1-em16. Los aislamientos corresponden a: Colonia Caroya (34,12,47,3,9,23,39), Oncativo (16, 37,50,25,7), Tandil (4,21,1,35,38), Mercedes (14,8,20,10,27, 45), La Pampa (17, 6, 41, 13, 24, 18, 51). PM (marcador de peso molecular, 100kB). C(-): control negativo

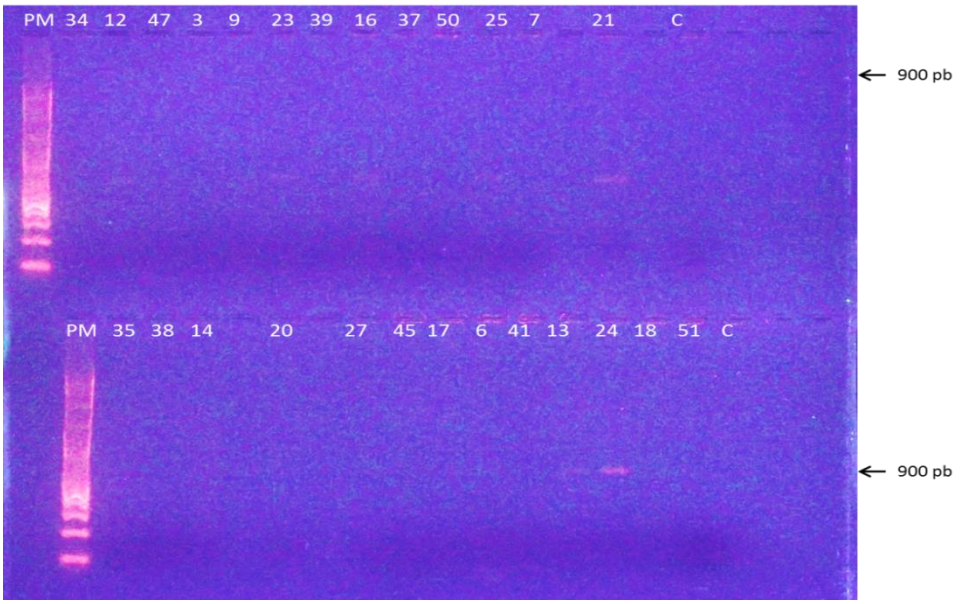


Figura 33: Patrón de amplificación de SRAP-PCR obtenido con el par de primers Me1-em2. Los aislamientos corresponden a: Colonia Caroya (34,12,47,3,9,23,39), Oncativo (16,37,50,25,7), Tandil (21,1,35,38), Mercedes (14,20,10,27, 45), La Pampa (17, 6, 41, 13, 24, 18, 51). PM (marcador de peso molecular, 100kB). C(-):

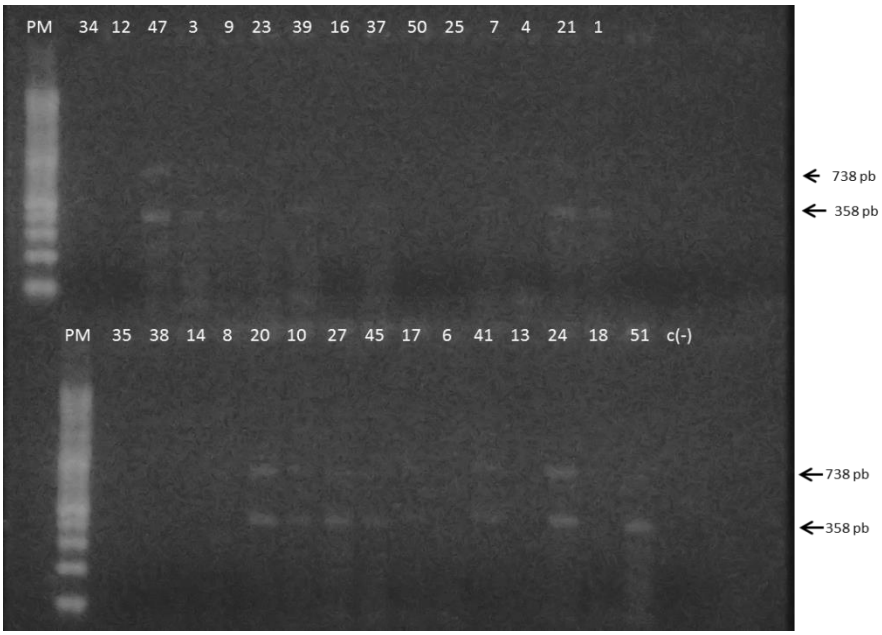


Figura 34: Patrón de amplificación de SRAP-PCR obtenido con el par de primers Me2-em16. Los aislamientos corresponden a: Colonia Caroya (34,12,47,3,9,23,39), Oncativo (16, 37,50,25,7), Tandil (4,21,1,35,38), Mercedes (14,8,20,10,27, 45), La Pampa (17, 6, 41, 13, 24, 18, 51). PM (maracdor de peso molecular, 100kB).C(-): control negativo

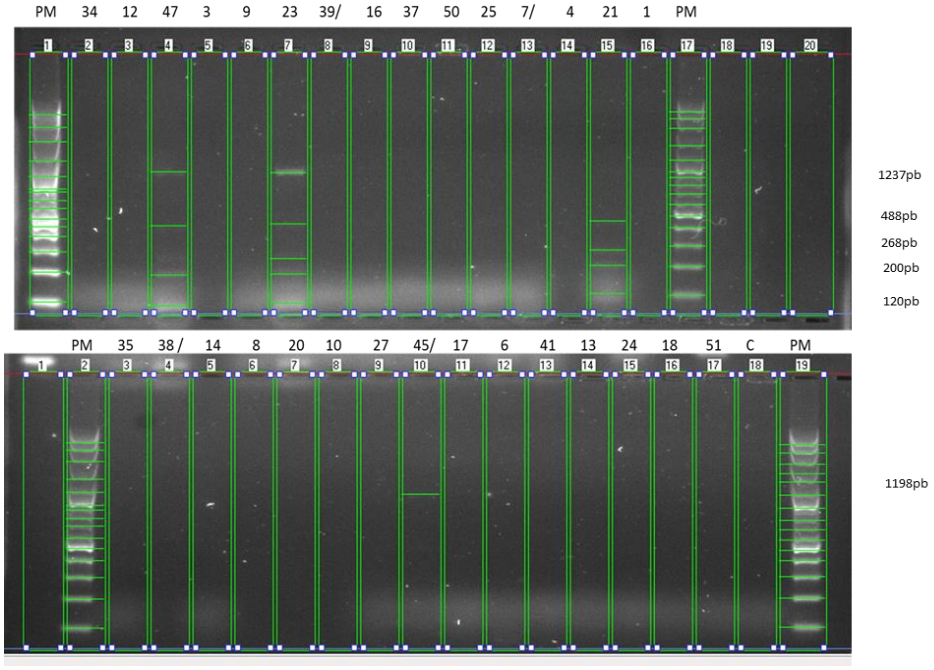


Figura 35: Patrón de amplificación de SRAP-PCR obtenido con el par de primers Me2-em4. Los aislamientos corresponden a: Colonia Caroya (34,12,47,3,9,23,39), Oncativo (16, 37,50,25,7), Tandil (4,21,1,35,38), Mercedes (14,8,20,10,27, 45), La Pampa (17, 6, 41, 13, 24, 18, 51). PM (marcador de peso molecular, 100kB). C(-): control negativo. El análisis de bandas fue realizado con el programa Essential V2.

Los aislamientos correspondientes a la localidad de Colonia Caroya presentaron en total 9 /10 fragmentos. En segundo lugar la localidad de Tandil presentó 7/10 fragmentos amplificados. Siendo éstas localidades las que presentan mayor variabilidad.

Las localidades restantes presentaron: La Pampa 5/10 fragmentos, Mercedes y Oncativo 3/10 fragmentos amplificados.

Considerando los fragmentos obtenidos como datos doble estado (presencia/ausencia) se elaboró una matriz básica de datos (MBD) que se analizó por Coeficiente de Jaccard.

Los aislamientos que no presentaron bandas no fueron incluidos en éste análisis por considerar que la ausencia de los mismos puede deberse a errores en la ejecución de la técnica o escasa concentración de ADN en la muestra. Los resultados se utilizaron para elaborar el siguiente dendrograma con el método de agrupamiento UPGMA (Figura 36).

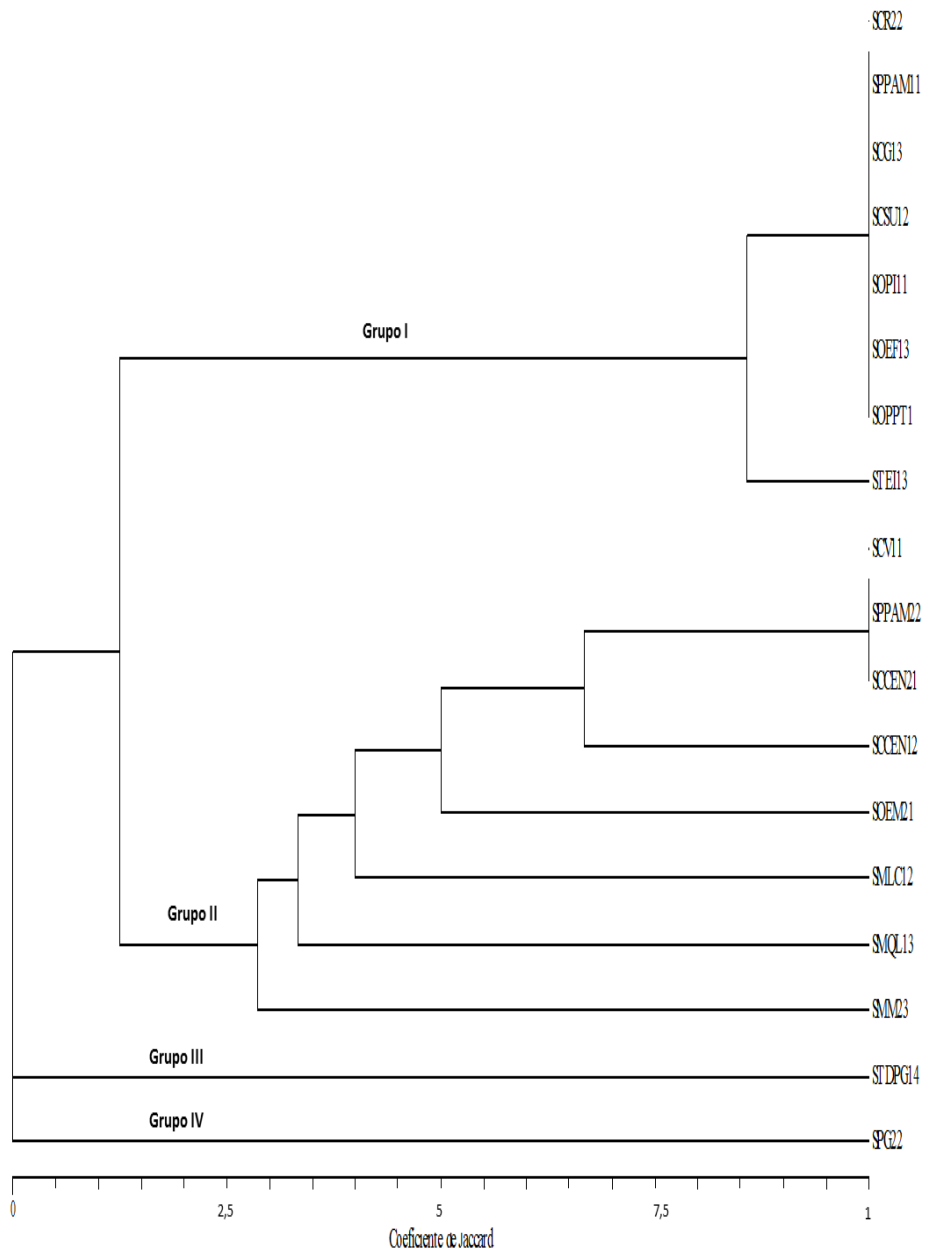


Figura 36: Dendrograma por análisis UPGMA de 18 aislamientos de las localidades de estudio

El dendrograma correspondiente a los 18 aislamientos de las localidades estudiadas se divide en 4 grupos: el grupo I que incluye aislamientos de Colonia Caroya, Oncativo, La Pampa y Tandil y no incluye aislamientos de Mercedes. El grupo II con aislamientos de Colonia Caroya, Oncativo, La Pampa y Mercedes. No incluye aislamientos de Tandil. El grupo III que incluye un

único aislamiento de Tandil. El grupo IV con un aislamiento de La Pampa.

En general los aislamientos de Colonia Caroya, Oncativo y La pampa se distribuyen en todo el dendrograma. Todos los aislamientos de Mercedes se localizan en el Grupo II.

A partir del dendrograma obtenido no surgen diferencias que permitan caracterizar los aislamientos por localidad.

Debido a la heterogeneidad de los fragmentos revelados en cada localidad, seleccionamos aquellos aislamientos con un patrón de bandas consistente y polimórfico: SCG13 (Colonia Caroya), STDPG14 (Tandil), SOPPT1 (Oncativo), SMLC12 (Mercedes) y SPG22 (La Pampa). Los mismos se utilizaron para elaborar el siguiente dendrograma (Figura 37)

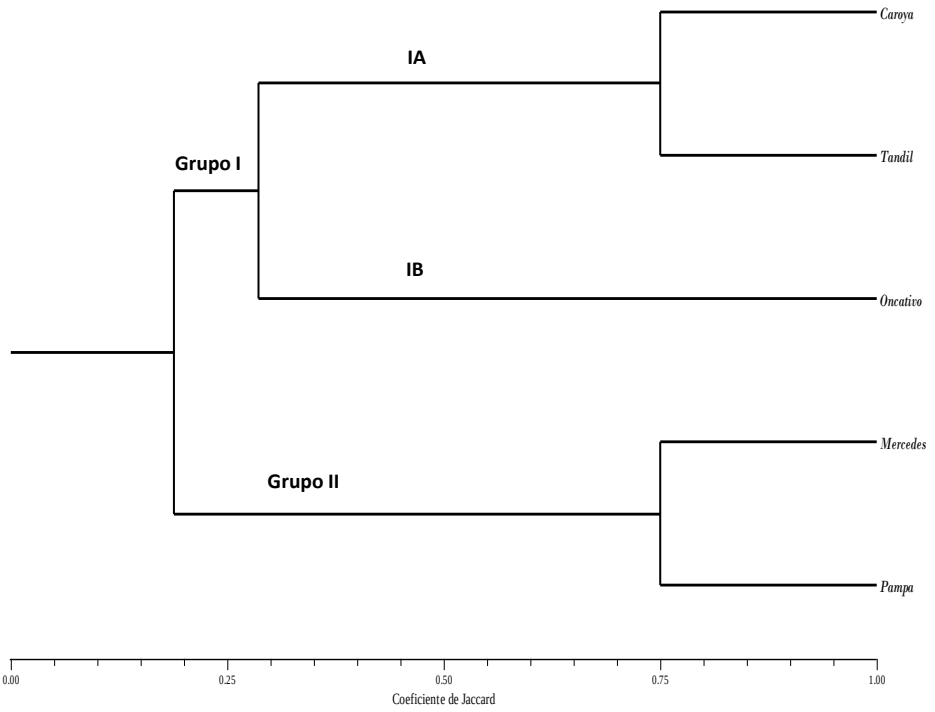


Figura 37: Dendrograma por análisis UPGMA de 5 aislamientos seleccionados de cada localidad de estudio

El análisis de agrupamiento permitió diferenciar dos grupos de aislamientos: el Grupo I constituido por aislamientos provenientes de las localidades de Colonia Caroya y Tandil (conformando el subgrupo IA) y Oncativo (subgrupo IB). El Grupo II formado por aislamientos de Mercedes y La Pampa.

El análisis de ambos dendrogramas indica que si bien podemos diferenciar los aislamientos por localidad cuando tomamos un aislamiento representativo en su patrón de bandas de cada una de ellas, no encontramos diferencias significativas por localidad cuando el análisis se realiza sobre un mayor número de aislamientos.

Las inconsistencias en los resultados obtenidos pueden deberse a que si bien la técnica es muy sensible y permite diferenciar polimorfismos intra e interespecíficos, las condiciones de amplificación deben ser optimizadas para asegurar resultados consistentes. Li X. y col.(2014) indican que la combinación apropiada de primers es fundamental, existen pares de primers que producen una sola banda o bandas débiles que son inadecuadas para ésta técnica, así como también la inadecuada concentración de ADN o que el mismo no sea fresco.

La utilización en el presente trabajo de la técnica SRAP-PCR constituye una primer aproximación a su uso en *Penicillium nalgiovense*, para establecer diferencias intraespecíficas, por lo que en futuros trabajos se profundizará en su aplicación.

Conclusiones

Conclusiones

En el presente trabajo se caracterizó la micobiota superficial de embutidos secos fermentados artesanales producidos en Colonia Caroya y Oncativo (Provincia de Córdoba), Tandil y Mercedes (Provincia de Buenos Aires), Jacinto Arauz, Alpachiri, Colonia Barón, General Campos, Santa Rosa (Provincia de La Pampa) utilizando marcadores morfológicos y moleculares. Como resultado del mismo podemos concluir que:

Desde el punto de vista morfológico

- ✓ Las poblaciones fúngicas que predominan en la superficie de los embutidos presentan una alta diversidad en todas las localidades, y corresponden de manera predominante al género *Penicillium* subgénero *Penicillium*. El resto de los aislamientos pertenecen a los géneros: *Mucor, Escopulariopsis, Cladosporium y Aspergillus*. La especie más frecuente en todas las localidades estudiadas resultó *P. nalgiovense.*
- ✓ Los biotipos de *P. nalgiovense* se distribuyen por localidad: Colonia Caroya, Oncativo y Tandil presentan Biotipo 4, en cambio Mercedes y La Pampa poseen Biotipo 1. Esta distribución parece estar relacionada con las condiciones ambientales, lo cual no pudo ser demostrado. Surge entonces la necesidad de encontrar marcadores que permitan establecer la causa de éstas diferencias morfológicas y de su distribución.
- ✓ Se encontraron especies de los géneros *Penicillium y Aspergillus* reportados como potencialmente peligrosos para la salud humana. Tandil presento la mayor cantidad de éstos aislamientos: *P. chrysogenum, P. griseofulvum y*

P.citrinum. En Colonia Caroya y Oncativo (Córdoba) se identificaron *P.brevicompactum y P.citrinum*.

A. ochraceus fue aislado en las localidades de Mercedes (Buenos Aires) y Oncativo (Córdoba). Las localidades de la provincia de La Pampa no presentaron éste tipo de aislamientos.

Desde el punto de vista bioquímico

- ✓ Los patrones de isoenzimas obtenidos son propios de cada localidad demostrando la existencia de diversidad intraespecífica.
- ✓ No se encontró relación entre los perfiles de α-EST, MDH y GOT y las características morfológicas y biotipos de los aislamientos por localidad.
- ✓ De los tres sistemas de isoenzimas analizados, los patrones de esterasas resultaron ser los más adecuados para la caracterización por localidad, debido a su polimorfismo.
- ✓ el análisis de isoenzimas permitió caracterizar las poblaciones de *P. nalgiovense* de acuerdo a su origen geográfico. agrupando por un lado los aislamientos de las localidades de Colonia Caroya y Oncativo (provincia de Córdoba) y los provenientes de Tandil (Provincia de Buenos Aires) y por otro lado los aislamientos de Mercedes (Provincia de Buenos Aires) y La Pampa

Desde el punto de vista genético

- ✓ Se confirmó la identidad de los aislamientos de *P.nalgiovense* por ITS.
- ✓ Se obtuvo una primer aproximación al estudio de la variabilidad intraespecífica de las poblaciones de *P. nalgiovense*, por SRAP-PCR.

- ✓ No se obtuvieron resultados concluyentes que permitan diferenciar los aislamientos por localidad usando ésta técnica, por lo que se continuaran los ensayos en futuros ensayos.

Este trabajo constituye la primera aplicación de marcadores morfológicos, bioquímicos y genéticos en la caracterización de poblaciones fúngicas de embutidos secos fermentados elaborados artesanalmente.

Contribuye a aportar una visión más amplia con respecto a las técnicas tradicionales de caracterización de poblaciones de hongos en alimentos.

Bibliografía

- Ahmad R., Potter D., Southwick S. (2004). "Genotyping of Peach and Nectarine Cultivars with SSR and SRAP Molecular Markers". Journal American Society Hort. 129.204-210.

- Alapont C., Lopez-Mendoza J., Martinez-Culebras. (2014). "Mycobiota and toxigenic *Penicillium* species on two Spanish cured ham manufacturing plants". Food Additives. Vol 31. Cap 1.93-104.

- Alghami S., Al-Faifi S., Migdadi H., Khan M., Harty E., Ammar M. (2012). "Molecular diversity Assessment Using Sequence Related Ampliefied Polymorphism (SRAP) Markers in *Vicia faba L."* International Journal of Molecular Sciences. 13. 16457-16471.

- Andersen S., Frisvad J. (1994). P*enicillin* production by *Penicillium nalgiovense*. Lett Appl Microbiol. 19 (6) 486-488.

- Andreu L., Rodriguez M.(2008) "Polimorfismo isoenzimático en la población de *Pinus hartwegii* Lindl. Del Cofre de Perote, Ver., México". Ecosistemas. Revista Científica y Técnica de ecología y Medio Ambiente. 17. 115-122.

- Asefa D., Gjerde R., Sidhu M., Langsrud S., Kure C., esbakken T., Skaar I. (2009). "Moulds contaminants on Norwegian dry-cured meat products". International Journal of food Microbiology. 128. 435-439.

- Banke S, Jens C, Frisvad and Rosendahl S. (1997). Taxonomy of *Penicillium chrysogenum* and related xerophilic species, based on isozyme analysis. Mycology. Res. 101 (5), 617±624.

- Berni E., Cacchioli C., Diaferia C. (2012). "Characterization of Surface mycoflora in Nebrodi Hams". Options Mediterraneennes. 101. 438-440.

- Bornscheuer U. (2002). "Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis". FEMS. Mirobiology Reviews. Vol 26. 73-81.

- Boysen M., Skouboe P., Frisvad J., Rossen L. (1996) "Reclassification of the Penicillium roqueforti group into three species on the basis of molecular genetic and biochemical profiles". Microbiology. 142. 541-549.

- Brr A., Moustafá N., Edris A. (2004). " Incidence of Moulds and Aflatoxiins in Some Meat Products". Benha Vet. Med J. 15. 65-75

- CAICHA (Cámara Argentina de la Industria de Chacinados y Afines)(2007) "Industria de Chacinados". Base de datos del SENASA.

- Canel R., Wagner J., Steinglein S., Ludemann V. (2013). "Indigenous filamentous fungi on the Surface of Argentinean dry fermented sausages produced in Colonia Caroya (córdoba)". International Journal of food Microbiology. 164. 81-86

- Carrillo, J; Vazquez, M; Sanchez-Yélamo. (2000)."Marcadores morfológicos y bioquímicos". ISBN 84-7721-945-1. 23-90

- Castellari C. (2006). Caracterización de la micobiota superficial de productos cárnicos embutidos secos y selección de cepas fúngicas para la elaboración de cultivos iniciadores. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina

- Castellari C., Quadrelli A., Laich F. (2010). Surface mycobiota on Argentinian dry fermented sausages. International Journal of Food Miccrobiology. 142. 149-155.

- Castillo L. (2007). "Reconstrucción de la historia de cambio de caracteres". Introducción a la Ecología Molecular. Capítulo 4. Primera parte. Primera edición.

- Champredonde M, Benedetto A, Bustos L (2010). Productos típicos asociados a culturas migrantes: impactos de procesos de valorización sobre la identidad de los actores locales.

- Champredonde M, Perez Centeno, Gonzalez J. (2013). Las denominaciones de origen en la valoración de productos locales. Proyección agroindustrial

- Chavez R, Fierro F, Rico R, Laich F. (2011). "Mold-Fermented Fermented Foods: *Penicillium* spp as Ripening Agents in Elaboration of Cheese and Meat Products". Mycofactories. Cap 5.

- Código Alimentario Argentino (CAA). Ley 18284. Cap VI. Alimentos Cárneos y Afines. Art 247-519. Actualizado 10/2014.

- Colmenero F., Santaolalla J. (1989). "Principios básicos de elaboración de Embutidos". Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. España. Número 4.

- Crisci J., Armengol M. (1983). "Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica". Secretaría General de Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington D.C.

- Cukon N., Fleck C., Bratulic M., Njari B., Kozacinki L. (2012)."Diversity of microflora in meat and meat products". Meso. Vol XIV.

- D´Angelo A. (2012). Utilización de Isoenzimas como marcadores moleculares en el estudio de la variabilidad de frutos nativos. Tesina de Grado. Universidad de la República. Uruguay.

- Dalla Santa O., Alvarez D., Dalla Santa H., Zanette C., Freitas R., Macedo R., Terra N. (2008). "Microbiota of sausages obtained by spontaneus fermentation produced in the South of Brazil". Ciencia y tecnología de los alimentos. 32. 653-660.

- Dávila M, Castillo M, Laurentin H. (2007)."Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífico en Agave". Rev. Fac. Agron. (Maracay) 33:93-111.

- Demeyer D. (2004)."Meat Fermentation: Principles and applications". Handbook of food and beverage fermentation. 20. 365-402.

- Di Conza J, Nepote A, González A, Lurá M. (2007)." (GTG)5´ microsatellite regions in citrinin-producing Penicillium". Rev .Iberoamericana Micologia ; 24: 34-37.

- Dinolfo I., Steinglein S. Moreno m., Nicholson P., Jennings P., Salerno G. (2010). ISSR markers detect high genetic varation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England. European Journal of Plant Pathology. 127. 483-491

- Do salame de Tandil. (2011). Dirección Nacional de Transformación y Comercialización de Productos Agrícolas y Forestales. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Argentina.

- Donadoni M. (2010). "El sistema productivo local chacinador en Colonia Caroya. Un aporte al desarrollo local". Tesis de grado. Instituto de Desarrollo Regional. FCE. UNRC.

- Dupont J., Magnin S., Marti A., Brousse M. (1999). "Molecular tools for identification of *Penicillium* starter cultures used in food industry". Internatinal Journal of Food Microbiology. Vol 49. 109-118.

- Espósito A., Martin E., Cravero V., Cointry E.(2011). "Uso de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares SRAP para diferenciar variedades de *Cynara cardunculus L.* (*Asteraceae*)". FCA INCUYO. 43(2) 35-45.

- Faure-Raynaud M., Daniere C., Moiroud A., Capellano A. (1991) "intraespecific variability of isozymes in *Penicillium nodositatum Valla,* a fungus inducing myconodules on the root-system of Alnus sp". Plant and Soil 137. 285-291.

- Feng F., Chen M., Zhang D., Sui X., Han S. (2009)." Application of SRAP in the genetic diversity of *Pinus koraiensis* of different provenances". African Journal of Biotechnology. 8(6) 1000-1008.

- Fernandez A., Peteira B., Gonzalez C. (2003). "Diferenciación de somaclones y mutantes de arroz mediante isoenzimas de esterasas y superóxido dismutasa". Revista Protección vegetal. 18 Número 1. 67-69.

- Filtenborg O, Frisvand J. C, Thrane U, (1996) "Moulds in food spoilage". International Journal of Food Microbiology 33. 85-102.

- Fink-Gremmels J, Banna A., Leistner I. (1998). "Developing mould starters cultures for meat products". Fleischwirtschaft. 68. 1292-1294.

- Flores M., Durá M., Marco A., Toldrá F. (2004). "Effect of *Debaryomyces spp.* On aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages". Meat Science. 68. 439-446.

- Fontana C, Sandro Cocconcelli P, Vignolo G.(2005) "Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinian sausages". Int J.Food Microbiology. 103 (2) 131-42

- Frisvad J., Smedsgaard J, Larsen T., Samson R. (2004)."Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium subgenus Penicillium".* Studies in Mycology. 49. 201-204.

- Galvalisi U, Lupo S, Piccini J, Bettucci L. (2012) "*Penicillium* species present in Uruguayan salam"i. Revista Argentina de Microbiología. 44: 36-42

- Garcia D., Ramos A., Sanchis V., Marin S. (2011) "Modelling the effect of temperature and water activity in the growth boundaries of *Aspergillus ochraceus and Aspergillus parasiticus"*. Food Microbiology. 28. 406-417.

- García Garibay M, Quintero Ramírez R, López-Munguía Canale A. (1993). "Biotecnología alimentaria".

- Gardes M., Bousquet J., Lalonde M. (1987). "Isozyme Variation among 40 Frankia Strains". Applied and Environmental Microbiology. Vol 53 N°7. 1596-1603.

- Giberti H. (1985) "Historia económica de la ganadería argentina". Hyspamérica. Buenos Aires. Argentina.

- Glenn R, Furnier.(1995). "Métodos para medir variación genética en plantas. Departments of Forest Resources and Plant Biology". University of Minnesota. E.U.A.

- Goicochea A. (2010). Especies fúngicas micotoxigénicas en productos cárnicos embutidos secos. Tesis. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Mar del Plata.

- Gonzalez A., Aguirre X.(2004)" Inter simple sequence repeat (ISSRs)". Capitulo 19.

- Gonzalez H., Resnik S., Boca s., Marasas W. (1995). "Mycoflora of argentinian corn harvested in the main production área in 1990" Mycophatologia 130. 29-36.

- Gottlieb D, Hepden PM (1966). "The electrophoretic movement of proteins from various *Streptomyces* species as taxonomic criterion". J Gen Microbiology 44, 65-104

- Grazia l.; Romano D.; Bagni D.; Roggiani D.; Guglielmi G.(1986). "The role of mulds in the ripening process of salami". Food Microbiology. 3: 19-25

- Griffith S., Vance C. (1989). "Aspartate Aminotransferase in Alfalfa Root Nodules". Plant Physiology. Vol 90. Pp 1622-1629.

- Hepper C, Sen R, Aguilar-Azcon C, Grace C. (1987). "Variation in certain isozymes amongst diffeent geographical isolates of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi Glomus clarum, *Glomus monosporum and Glomus mosseae*". Soil Biol. Biochem. Vol 20. N° 1. 51-59.

- Hernandez D., Andreu L., Mata G. (2005). "Caracterización bioquímica de seis cepas de *Pleurotus*". Revista mexicana de Micología. 21. 71-76.

- Iacumin L., Chiesa L., Boscolo D. Manzano M., Cantoni C., Orlic S., Comi G. (2008). Moulds and ochratoxin A on surfaces of artisanal and industrial dry sausages. Food Midrobiology. 26. 65-70.

- Iacumin L., Milesi S., Pirani S., Comi G., Chiesa L. (2011). "Ochratoxigenic mold and ochratoxin a in fermented sausages from different areas in northern italy: occurrence, reduction or prevention with ozonated air". Food Midrobiology.

- Iglesias L., Rodriguez M. (2008). "Polimorfismo isoenzimático en la población de Pinus hartwegii Lindl. Del Cofre de Peerote, ver., México". Ecosistemas. 17. 115-122

- Jens C. Frisvad and Robert A. Samson (2004)." Polyphasic taxonomy of *Penicillium subgenus Penicillium* a guide to identification of food and air-borne terverticillate penicillia and their mycotoxins"

- Laemmli, U.K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophageT4" Nature 227:680-685.

- Laich F., Fierro F., Cardoza R., Martin J. (1999). "Organization of Gnen Cluster for Biosynthesis of Penicillin in *Penicillium nalgiovense* and Antibiotic Production in Cured Dry Sausages". Applied and Environmental Microbiology . 1236-1240.

- Larsen T., Svendsen A., Smedsgaard J. (2001)." Biochemical Characterization of Ochratoxin A-Producing Strains of the GenusPenicillium". Applied and Environmental Microbiology. 67(8). 3630-3635.

- Li , J. Li, Z. J. Zhao, F. Yang, W. Fu, S. Liu,, Wang1,C. Yang,R. Y. Wang (2014) Sequence-related amplified polymorphism (srap) for studying genetic diversity and population structure of plants and other living organisms: a protocol. The Journal of Animal & Plant Sciences. 24(5). 1478-1486.

- Li G., Peter B., Mcvetty E., Quiros F. (2013) SRAP Molecular Marker Technology in Plant Science. INTECH.

- López-Diaz T., Santos J., García-López M., Otero A. (2001). "Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates". International Journal of Food Microbiology. 68. 69-74.

- Lucke F. (1987). Procesos microbiológicos en la elaboración de embutidos secos .

- Lücke, F.-K. (1998). Fermented sausages. En Microbiology of Food Fermentations. B.J.B.Wood (ed.). Applied Science Pub. Londres

- Ludemann V, Pose G, Pollio M, Segura J. (2004). "Surface mycoflora of Argentinean dry fermented sausages and toxigenicity of Penicillium isolates". International Journal of Food Technology. 2: 288-292

- Ludemann V, Pose G, Pollio ML, Segura J. (2004). Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from argentinean salami. Journal Food Microbiol. 1;96(1):13-8.

- Maciel M., Lins L., Souza-Motta C., Brasileiro B., Fernandes M., Lima D., Carmeiro –Leao M., Batista P., Oliveira N. (2006). "Genetic characterization of *Penicillium* obtained with utilization of ISSR marker". Resumen. Sociedad Brasilera de Bioquímica y Biología Molecular.

- Magan, N.; Caley, G.R. y Lacey, J. (1993). Lipolytic activity and degradation of rapessed oil and rapessed by spolage fungi. *Int. J. Food Microbiol*ogy **19**, 217-227.

- Marker, C. L. F. Moller (1959). "Multiple forms of enzymes: tissue ontogenetic and species specific patterns". Proc. Nat. Acad. Sci. 45: 753-763.

- Martin E., Cravero V., Espósito A., López Anido F., Milanesi L., Cointry E. (2008). Identification of markers linked to agronomic traits in globe artichoke. Australian Journal of Crop Science. 1(2). 43-46.

- Más tandilero que nunca. Revista alimentos argentinos. Número 52.

- Micales J. (1986). The use of isozyme analysis in fugal taxonomy and genetics. Mycotaxon. Vol 27.405-449.

- Mintzlaf H., Ciegler A., Leistner L. (1972). " Potential mycotoxins problems in mould fermented sausage". European Food Research and Technology. Vol 150. 133-137.

- Mishra M, Suresh N, Bhat A, Suryaprakash N, Satheesh S., Kuma A., Jaramaya (2011) " Genetic molecular analysis of Coffea arabica (Rubiaceae) hybrids using SRAP markers". Revista de biología Tropical. 59(2) 607-617

- Monaci L., Palmisano F., Matrella R., Tantillo G (2005) "Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection". Journal of Chromatografy. 30. 1-4

- Moracanin S., Karan D., Milicévic D., Stjepanovic A. (2008). "The presence of undesiderable mould species on the Surface of dry sausages". Matice srpske za prirodne nauke. Número 114. . 97-103.

- Moreno V., Tacalitti A., Castro A., Perelló A.(2008). "Isozyme polymorphisms within *Pyrenophora tritici-repentis* population in Argentina". World J Microbiol Biotech. Vol 24. 849-860.

- Murcia J., (2012) "Sal, aire y humo, la esencia de los embutidos y salazones". Embutidos y salazones. Alimentación en España. .74. 73-79.

- Murphy R., Sites J., Buth D., Haufler C. (1996)." Proteins: Isozyme Electrophoresis". Molecular Systematics. Second Edition. Cap 4. 51-120.

- Nuñez-Colín C., Escobedo-López D. (2011). Uso correcto del análisis de Clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. Agronomía Mesoamericana. 22(2). 415-427.

- Pacin A., González H., Etcheverry M., Resnik S., Vivas L., Espin S. (2003). "Fungi associated with food and feed commodieties from Ecuador. Mycophatologia. 156. 87-92.

- Papagianni M., Ambrosiadis I., Filiousis G. (2007). "Mould growth on traditional greek sausages and penicillin production by Penicillium isolates".

- Pardo A., Marín S., Sanchis V., Ramos A. (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. 79-82

- Pasquali M., Komjati H., Lee D., Bayles R. (2010). "SRAP Technique Efficiently Generates Polymorphisms in *Puccinia striiformis* Isolates". Journal of Phytopatology. 2-4

- Paterson R., Bridge P., Crosswaite M., Hawksworth D. (1989) "A Reappraisal of the Terverticillate Penicillia Using Biochemical, Physiological and Morphological Features". Journal of General Microbiology. 135. 2979-2991.

- Peterson S (2000). Phylogenetic analysis species base don ITS and LSU-rDNA nucleotide sequences. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium and Aspergillus* classification. 163-178.

- Pitt J and Hocking A. (2009) .Fungi and Food Spoilage. 3rd ed. Springer, Germany,

- Pitt J. (2000). "A laboratory guide to common *Penicillium* species". Food Science Australia. Third Edition.

- Planter E. (2007) "Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares". Introducción a la Ecología Molecular. Capítulo 1. Primera parte. Primera edición.

- Pose G, Ludemann V, Pollio M, Segura J.(2004). "Micoflora autóctona de la superficie de embutidos secos fermentados". Mundo lácteo y cárnico 4:12-14.

- Pradeep Reddy M, Sarla N, Siddiq E. (2002) "Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding". Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. Euphytica 128. 9-17

- Preda N, Gabor M, Constantinescu, C. (1978). "Toxicogenic moulds in food products ripened by select strains". Igiena 27: 229-233

- Quirós C., Li G. (2001). "Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system base don a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica". Theor. Appl Genet. 103. 455-461

- Quiroz, C., Roca, W., & Mroginski, L. A. (1991)." Isoenzimas como marcadores genéticos para identificar híbridos en el cultivo de tejidos". Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Cap 37 CIAT, 857-876

- Rahman M., McVetty P., Genyyi L. (2007). "Development of SRAP, SNP and Multiplexed SCAR molecular markers for the major seed coat color gene in *Brassica rapa* L."Theoretical and Applied Genetics. 115. 1101-1107.

- Rapela M., Gonzalez A., Lurá M. (2005). "Determinación de la actividad antibacteriana de hongos del género *Penicillium* presentes en embutidos secos". Revista FACIBIB. 9. 175-180.

- Raynaud Faure M., Daniere C., Moiroud A., Capellano A. (1991). "Intraespecific variability of isozymes in *Penicillium nodositatum Valla*, a fungus inducing myconodules on the root-system of Alnus sp". Plant and Soild. 137: 285-291.

- Reddy Pradeep M., Sarla N., Siddiq E. (2002). "Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding". Euphytica . 128. 9-17.

- Salazar L, Aponte G, Sanabria N, Salazar E , Castro L.(2011). "Caracterización isoenzimática de aislados de *Trichoderma spp*" Agronomía Tropical. 61(3-4). 189-198.

- Saleemi M., Khan M., Javed L. (2010) " Mycoflora of poultry feeds an miccotoxins producing potential of *Aspergillus specie"s* . Pakistan journal of Botany. 42. 427-434

- Samson R., Seife K., Kuiijpers A., Houbraken J., Frisvad J. (2004). "Phylogenetic analysis of *Penicillium subgenus Penicillium* using partial β-tubulin sequences". Studies in Mycology. Vol 49. 175-200.

- Savic Z., Savic I., (2002) "Sausage casings". Victus Lebensmittelindustriebedarf Vertriebsgesellschaft m.b.H, Wiedeń .

- Schmidt A., Fuchs M., Fuentemayor F. (2007) "La electroforesis en isoenzimas: principio y aplicaciones en el cultivo de Yuca". CENIAP/INIA. Venezuela.

- Scott J., Untereiner W., Wong B., Straus N., Malloch D. (2004) "Genotipic variation in P*enicillium chrysogenum* from indoor environments". Mycologia. 96.1095-1105.

- Simoncini N., Rotelli D., Virgili R., Quintavalla S. (2007). "Dynamics and characterization of yeast during ripening of typical Italian dry-cured ham". Food Microbiology. 6. 577-584.

- Skouboe P., Jens C., Frisvand J., Taylor J., Lauritse D., Boysen M., Rossen L. (1999). "Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region terverticillate *Penicillium* species". Mycol. Vol 103. 873-881.

- Smith J., Scopes R.(2003) "Analysis of proteins". Currents Protocols in Molecular Biology Cap 10. 6. 25 . Sección 2. Suplemento 63

- SneathP., Sokal R. (1973). Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. Gen, microbiology. 17. 201-206.

- Solís R. L, Iglesias L., Andreu.(2005) "Variación en la composición isoenzimática en la población de *Pinus hartwegii lindl* del pico de Orizaba, Veracruz". Cuadernos de Biodiversidad.

- Solís-Ramos L.Y, Andrade-Torres (2005). "¿Qué son los marcadores moleculares?. La Ciencia y el Hombre. Cap 18. 41-46

- Sonjack S., Licen M., Frisvand J., Gunde- Cimerman N. (2010). "The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia". Food Microbiology. Vol 30. 1-4.

- Sorensen L., Jacobsen T., Nielsen P., Frisvad J. (2008). "Mycobiota in the processing áreas of two different meats products". International Journal of food Microbiology. 124. 58-64.

- Soto A., Ponzoni I., Vazquez G. (2006)." Análisis numérico de diferentes criterios de similitud en algoritmos de clustering". Mecánica computacional Vol XXV. 993-1011.

- Sun S., Gao W., Lin S., Zhu J., Xie B., Lin Z. (2006). "Analysis of genetic diversity in Ganoderma population with a novel molecular marker SRAP". Appl. Microbiology Biotechnology. 72. 537-543.

- Suso J. (1997). "Las isoenzimas y la cuantificación del sistema de cruzamiento en plantas". Consejo Superior de investigaciones científicas. España.

- Tiwari K., Jadhav S., Kumar A. (2011). "Morphological and Molecular Study of Different *Penicillium* species". Journal of Scientific Research 7. Vol 2. 203-210.

- Toldrá, F, (2007). "Fermented Meat Production". Handbook of Food Products Manufacturing, Volume 2. Cap 60 266-275.

- Trujillo E., Moreno B., Acevedo R., Vera R. (2005). "Variabilidad genética de F*usarium spp*., causante de la marchitez

- Turano F., Wilson B., Matthews B. (1989). "Purification and characterization of Aspartate aminotransferase Isoenzymes from Carrot Suspension Cultures". Plant. Physiology. Vol 92. Pp. 587-594.

- Tuthill D. (2004). "Genetic variation and recombination in *Penicillium miczynskii* and Eupenicillium species".Mycological Progress. 3. 3-12.

- Vasquez J., Sanchez M., Carrillo J. (2000). "Marcadores en la mejora vegetal". Universidad politécnica de Madrid.

- White T, Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990). "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics". In PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), 315±322. Academic Press : London,U.K.

- Yanqing Z., Chune Z, Huanling Y, Yanju L., Rongtao T. (2008).” Application of ISSR markers in detection of genetic variation among Chinese yam (Dioscorea opposita Thunb) cultivars”. Life Science Journal, Vol 5. 1-8

- Zietkjewicz E, Rafalski A.(1994) “.Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification”. Genomics 20. 176-183.

Anexos

a) Medios de cultivo

DG18 (Agar al 18% de glicerol)

Glucosa	10 g
Peptona	5 g
$K H_2 PO_4$	1 g
$Mg SO_4 7 H_2 O$	0,5 g.
Glicerol	220 g.
Diclorán	1 ml.
Cloranfenicol	100 mg.
Agar	15 g.
Agua destilada	1000 ml.

MEA (Agar extracto de Malta)

Extracto de Malta	20 g
Peptona	1 g
Glucosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 5,6

CYA (Agar Extracto Czapek de levaduras)

K2 H PO4	1 g
Czapek Concentrado	10 ml
Solución de Metales Traza	1 ml
Extracto de Levadura	5 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

GN25 (Agar Nitrato Glicerol al 25%)

K2 H PO4	0,75 g.
Czapek concentrado	7,5 ml.
Extracto de Levadura	3,7 g.
Glicerol (Grado analítico)	250 g.
Agar	12 g.
Agua destilada	750 ml

pH: 7

Czapek Concentrado

Na NO3	30 g
K Cl	5 g.
MgSO4 7 H2 O	5 g.
Fe SO4 7 H2 O	0,1 g.
Agua destilada	100 ml.

CSN (Agar neutro sacarosa creatina)

CS concentrado	10 ml
Sacarosa	10 g.
Creatina	5 g.
KH2PO4	1 g.
Púrpura de Bromocresol	0,05 g.
Agar	15 g.

Medio de desarrollo de Micelios

Sacarosa	30 g.
KNO3	4 g.
NaCl	0,5 g.
MgSO47H2O	0,5 g.
FeSO47H2O	0,01 g.
Extracto de levadura	5 g.
K2HPO4	1 g.

b) Soluciones Buffer

Buffer de Extracción de proteínas : Bifosfato de Potasio 0,1 M (BPP)

K2HPO4 1M	0,5 l
KH2PO4 1 M	0,5 l

pH: 7

Buffer de electroforesis:

Buffer de electrodo:

6 g Tris
28,8g Glicina
Agua destilada hasta completar 100ml total

pH: 8,3

Buffer 4X TRIS-HCL pH: 6,8

6,05 g Tris base
40 ml de agua bidestilada
Ajustar el pH : 6,8 con 1N HCL
Adicionar agua bidestilada hasta 100 ml total

Buffer 4X TRIS- HCL pH: 8,8

91 g Tris base
300 ml agua bidestilada
Ajustar el pH: 8,8 con 1N HCL
Adicionar agua bidestilada hasta 500 ml total

c) Formulación de soluciones de tinción de isoenzimas

Solución de α-naftil acetato

A-naftil acetato	30 mg
Acetona	1,5 ml
Agua destilada	1,5 ml

Solución de $MgCl_2$ 0,1 M

$MgCl_2$	20 g
Agua destilada	100 ml

Solución Sustrato para GOT

Acido L- aspártico	1,33 g
Ácido α-cetoglutárico	0,365 g.
Polivinilpirrolidona	2,5 g.
Na2 EDTA	0,5 g.
Na2 HPO4	14,2 g.
Agua Bidestilada	400 ml.

Ajustar el pH final de la solución a 8.0 con 4.0 M NaOH.

MDHP (Malato deshidrogenasa NADP+). EC 1.1.1.40

0,2 M Tris- HCl, pH 8	50 ml
0,1 M Mg Cl2	1 ml
2,0 M Dl- Acido Málico, pH: 8.0	5 ml
NADP	0,02 g
5 mg/ml NBT	1 ml
5 mg/ ml PMS	1 ml

d) Geles

30 % Acrilamida/ 0,8% Bisacrilamida

30 g de acrilamida
0,8 g de N,N" metilenbisacrilamida.
agua en un volumen total de 100 ml.

Gel de apilamiento: 4% acrilamida

5 ml Tris- HCl
10 ml solución Acrilamida

Gel de resolución: 13 % acrilamida

10 ml Tris- HCl
26,6 ml sc acrilamida
0,6 ml persulfato de amonio

Gel de agarosa para corrida de ADN

0,8 g de Agarosa
20 ml TBE 5X (buffer corrida)
80 ml agua destilada (calentar hasta que se disuelva)
3 µl Gel Red

KEY TO THE COMMON FOOD- AND AIRBORNE GENERA OF THE DEUTEROMYCETES TREATED

1a. Conidia borne in pycnidia ..... *Phoma* (p. 248)
1b. Conidia not borne in pycnidia, but on hyphae, conidiophores, sporodochia or synnemata 2

2a. Conidia produced from special conidiogenous cells (phialides, annellides etc.) in chains or in heads, in basipetal succession 3
2b. Conidia not produced from special conidiogenous cells, but acropetally or by fragmentation of fertile hyphae, synchronously or single 14

3a. Conidia in dry chains 4
3b. Conidia in moist or slimy heads 10

4a. Conidia usually 2-celled, borne on filamentous conidiogenous cells, more or less obliquely inserted, arranged like a spike. Colonies pinkish ..... *Trichothecium* (p. 264)
4b. Conidia always one-celled, borne on flask-shaped or cylindrical conidiogenous cells in straight chains. Colonies in various colours 5

5a. Colonies very restricted, reddish-brown. Conidia formed (in a quartet) by division of a cylindrical verrucose fertile hypha, cubic, becoming (sub)-globose. Xerophilic ..... *Wallemia* (p. 268)
5b. Colonies usually not restricted (except xerophilic *Aspergillus* species). Conidia not formed after division of fertile hyphae 6

6a. Conidiophores with a typical apical swelling ..... *Aspergillus* (p.64)
6b. Conidiophores without an apical swelling 7

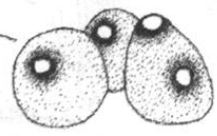
7a. Conidiogenous cells annellidic. Conidia with a broad truncate base ..... *Scopulariopsis* (p.252)
7b. Conidiogenous cells phialidic. Conidia without a broad truncate base 8

8a. Colonies dark grey to blackish. Phialides obovate (broadest at the top), conidia blackish. ..... *Memnoniella* (p. 162)
8b. Colonies not dark grey to blackish. Phialides flask-shaped or lanceolate (broadest at the base) 9

9a. Colonies yellow to brown. Phialides with a long neck ..... *Paecilomyces* (p.170)
9b. Colonies often greenish (some species whitish). Phialides with a short neck ..... *Penicillium* (p. 174)

10a. Phialides long, awl-shaped, polyphialides absent ..... *Acremonium* (p. 58)
10b. Phialides more or less flask-shaped and/or polyphialides present, or phialides reduced 11

11a. Colonies usually green (when grown in light) ..... *Trichoderma* (p. 260)
11b. Colonies whitish, yellow, purple, violet, pinkish, brown or blackish 12



12a. Colonies white, yellowish pinkish, purplish, sometimes greenish. Septate banana-shaped conidia usually present ..... *Fusarium* (p. 120)
12b. Colonies black, sometimes pinkish. Conidia not septate 13

13a. Phialides solitary or in loose whorls, flask-shaped with a conspicuous collarette or phialides reduced. Conidiophores not distinct ..... *Phialophora*/*Lecythophora* (p.244)
13b. Phialides in dense apical clusters, broadly clavate, widest near apex, without conspicuous collarette. Conidiophores distinct ..... *Stachybotrys* (p.258)

14a. Colonies growing very fast, covering a 9 cm Petri-dish within a few days, loose, floccose, orange ..... *Chrysonilia* (p.104)
14b. Colonies not orange and not covering a 9 cm Petri-dish within a few days 15

15a. Conidia only arthric 16
15b. Conidia both arthric and blastic or only blastic 18

16a. Conidiophore stipes pigmented ..... *Oidiodendron* (p. 168)
16b. Conidiophore stipes hyaline or absent 17

17a. Conidia hyaline, smooth-walled, more or less cylindrical. Intercalary conidia absent ..... *Geotrichum* (p. 160)
17b. Conidia (sub)hyaline becoming faintly coloured, and rough-walled with age. Intercalary conidia present ..... *Geomyces* (p. 158)

18a. Conidia formed in a quartet by division of a cylindrical fertile hypha ..... *Wallemia* (p.268)
18b. Conidia not formed in a quartet 19

19a. Conidiogenous structure consisting of both arthroconidia and blastoconidia (compare also *Trichosporon* in yeasts and the thick-walled, brown arthroconidia-like hyphal cells in *Aureobasidium*) ..... *Moniliella* (p.164)
19b. Conidiogenous structures consisting of only blastoconidia 20

20a. Blastoconidia borne synchronously on hyphae, or from swollen cells or branches 21
20b. Blastoconidia not formed synchronously on hyphae or swollen cells or branches 22

21a. Conidia borne from denticles on terminally swollen conidiogenous cells. Conidiophores erect, apically branched (tree-like). Colonies thin, greyish-brown ..... *Botrytis* (p.100)
21b. Conidia borne on hyphae or on almost completely swollen branches. Colonies yeast-like, creamish-yellow to light brown, pinkish-orange or blackish-green ..... *Aureobasidium* (p.98)

22a. Conidia formed singly on indistinct conidiophores, clustered and visible as black dots ..... *Epicoccum* (p.118)
22b. Conidia formed singly or in chains, conidiophores distinct, not clustered 23

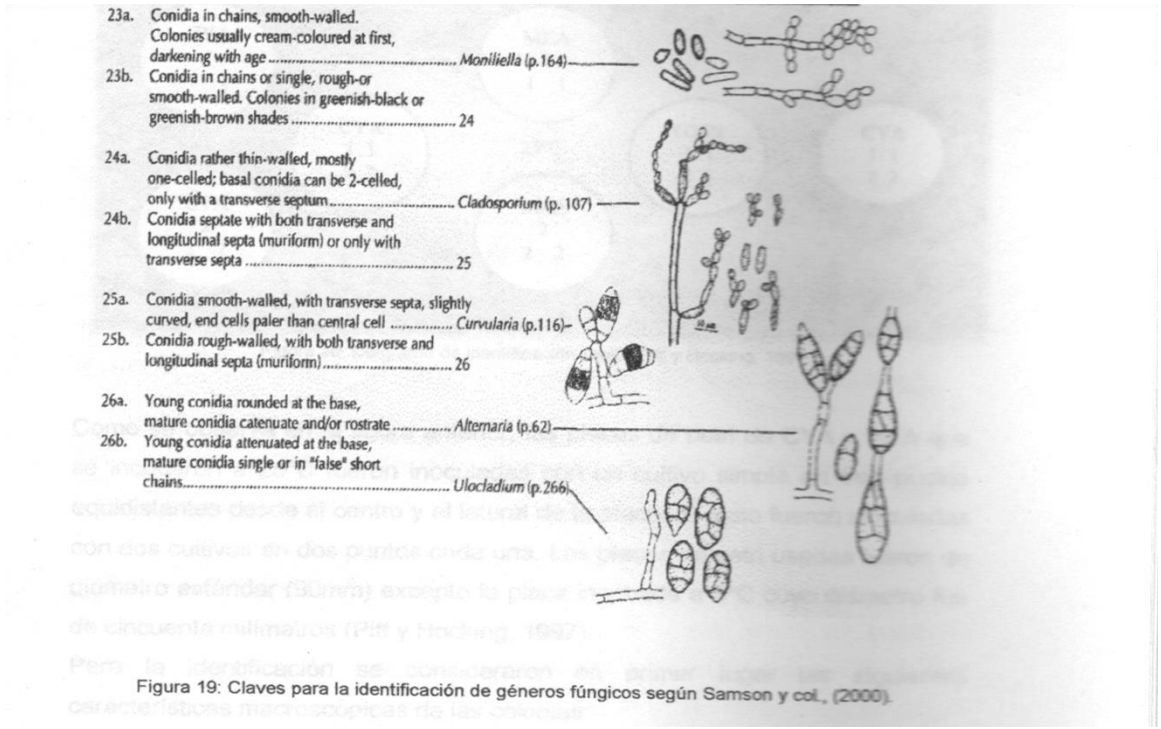


Figura 19: Claves para la identificación de géneros fúngicos según Samson y col., (2000).

Key to *Penicillium* subgen. *Penicillium* species included here.

1	Conidia white or plate grey green.	2
	Conidia more strongly coloured, blue, green or grey.	3
2 (1)	Stipes often rouge walled, conidia up to 5 µm; on CSN, reaction alkaline.	*P. camemberti*
	Stipes consistently smooth walled, conidia not usually exceeding 3,5 µm; diam; on CSN, reaction neutral to weakly acid.	*P. nalgiovense*
3 (1)	Stipes on CYA and MEA smooth walled, or at most very finely roughened.	4
	Stipes commonly rouge walled, especially on MEA.	16
4 (3)	Conidia borne as cylinders, with at least a proportion remaining so at maturity.	5
	Conidia borne as ellipsoids or spheres and remaning so at maturity.	7
5 (4)	Conidia olive, longer than 6 µm.	*P. digitatum*
	Conidia green, shorter than 6 µm.	6
6 (5)	Colonies on CYA and MEA exceeding 30 mm. diam	*P. italicum*
	Colonies on CYA and MEA no exceeding 30 mm. diam	*P. ulaiense* (ver *P. italicum*)
7(4)	Penicilli with 3 or more rami in large, compact terminal penicilli; on CSN, Growth weak, reaction neutral.	*P. olsonii*
	Penicilli with 1-2 rami, penicillius structure variable; CSN response variable.	8
8 (7)	Penicilli complexo r regular, reverse on MEA strongly colour, depp Orange brown to brown, phialides with short, broad collula; on CSN, reaction neutral to weakly acid.	*P. nalgiovense*
	Penicilli well defined, mostly terverticillate, reverse on MEA pale or dull yellow or brown, phialides with relatively long, narrow, collula; CSN response variable.	9
9 (8)	Colonies on CYA exceeding 30 mm diam.	10
	Colonies on CYA no exceeding 30 mm diam.	14
10 (9)	Conidias grey blue.	11
	Conidias grey green to green.	12
11 (10)	Colonies on CYA 35-45 mm diam, yellow exudate and soluble pigment often present, conidia ellipsoidal to subspheroildal; on CSN, medium Response neutral to weakly acid.	*P. chrysogegenum*
	Colonies on CYA 30-38 mm diam, exudate clear to plate brown, soluble pingments sometimes present, brown to reddish brown, conidia spherical to subspheroidales; on CSN, medium response acid, reverse acid plus brown.	*P. aurantiogriseum*
12 (10)	Reverse on CYA pale to deep brown; colonies on CSN usually exceeding 24 mm diam.	*P. expansum*
	Reverse on CYA pale, yellow or orange; colonies less than 24 mm diam.	13
13 (12)	Colonies dull green, conidia broadlyn ellipsoidal, reverse on CYA bright golden yellow; on CSN reverse acid plus brown.	*P. aethiopiccum*
	Colonies dark green, conidia mostly spherical to subspheroidal, reverse on CYA usually pale, sometimes orange or pale yellow; CSN reverse alkaline.	*P. solitum*

14 (9) Phialides commonly 4,5-6 µm long; on CSN, response neutral. *P. griseofulvum*
Phialides exceeding 6 µm long; CSN response variable. 15

15 (14) On CYA colonies dull green; penicilli very broad, metulae often apically inflated, conidia elipsoidal; on CSN, reverse neutral to weakly acid. *P. brevicompactum*
On CYA, colonies dark green, penicilli not very broad, metulae not usually apically inflate, conidia mostly spherical to subspheriroidal; on CSN, reverse alkaline. *P. solitum*

16 (3) Colonies on CYA exceeding 30 mm diam. 17
Colones on CYA no exceeding 30 mm diam. 24

17(16) Conidia with walls finely roughened to rough or spinose. 18
Conidia smooth. 19

18 (17) Mycellium insconspicuous, white, conidia dark green; on CSN strong, medium and reverse alkaline. *P. echinulatum* (ver *P. crustosum*)
Mycelium yellow, conidia dull green; on CSN, medium and reverse acid. *P. hordei* (ver *P. hirsutum*)

19 (17) Growth on CSN strong, colonies more than 20 mm, medium and reverse alkaline. 20
Growth on CSN variable, medium and reverse acid, reverse sometimes also brown. 22

20 (19) Colonies on CYA and MEA exceeding 40 mm diam, reverse on CYA and/or MEA often green to deep blue green; conidia up to 6 µm. *P. roqueforti*
Colonies on CYA and MEA less than 40 mm diam, reverse pale or yellow to orange brown, conidia mostly 4 µm or less diam. 21

21 (20) Colonies on CYA exceeding 35 mm diam and on MEA usually exceeding 30 mm diam; colonies on MEA often shedding masses of conidia when jarred. *P. crustosum*
Colonies on CYA and MEA no exceeding 35 and 30 mm diam respectively; conidia adhering to colonies on MEA. *P. commune*

22 (19) Colonies on CYA often exceeding 35 mm diam. 23
Colonies on CYA not exceeding l35 mm diam. *P . viridicatum*

23 (22) Exudate on CYA near maroon; mycelium often yellow; penicillin sometimes quaterverticillate. *P. hirsutum*
Exudate on CYA yellow pale; mycellium white; penicilli terverticillate or somewhat irregular. *P. allii* (ver *P. hirsutum*)

24 (16) Conidia mostly elilpsoidal, dark green. *P. glandicola* (ver *P. brevicompactum*)
Conidia near spherical, yellow green. 25

25 (24) Colonies on CYA and MEA exceeding 25 mm diam. *P. viridicatum*
Colonies on CYA and MEA no exceeding 25 mm diam. *P. verrucosum*

Recuento Total y Recuento por géneros del total de muestras (UFC/ml)									
Procedencia	Nombre	Recuento total	Penicillium	Mucor	Scopulariopsis	Geomyces	Cladosporium	Aspergillus	Geotrichum
Caroya n=30	F1	5,00E+06	5,00E+06						
	F2	sin aislamientos							
	F3	**2,18E+06**	**2,18E+06**						
	V1	4,00E+06	4,00E+06						
	V2	4,00E+06	4,00E+06						
	V3	4,50E+06	4,50E+06						
	A1	5,00E+04	5,00E+04						
	A2	8,00E+05	8,00E+05						
	A3	4,90E+05	4,90E+05						
	G1	8,50E+06	7,50E+06	1,00E+06					
	G2	1,00E+06	1,00E+06						
	G3	2,00E+05	1,00E+05						
	LC1	5,00E+06	4,00E+06	1,00E+06					
	LC2	2,00E+06	2,00E+06						
	LC3	3,00E+06	3,00E+06						
	R1	6,40E+07	6,30E+07	1,00E+06					
	R2	2,19E+07	2,09E+07	1,00E+06					
	R3	6,28E+07	6,18E+07	1,00E+06					
	DA1	4,00E+07	4,00E+07						
	DA2	4,00E+07	4,00E+07						
	DA3	6,00E+07	6,00E+07						
	SU1	1,00E+06			1,00E+06				
	SU2	1,84E+07		9,20E+06	9,20E+06				
	SU3	2,82E+06	1,10E+06	1,10E+06	7,20E+05				
	EM1	1,00E+06	1,00E+06						
	EM3	2,03E+05	3,30E+04		1,70E+05				
	CEN1	1,03E+06	3,30E+04	1,00E+06					
	CEN2	6,00E+07	6,00E+07						
	CEN3	3,91E+08	3,90E+08	1,00E+06					
Tandil n=15	TC2	1,30E+08	1,30E+08	1,00E+04					
	TPF1	2,25E+07	2,24E+07	1,00E+05					
	MSF1	1,10E+08	1,10E+08						
	MSF2	4,38E+06	2,92E+06	1,46E+06					
	DT12	1,56E+07			1,56E+07				
	PPF1	1,64E+06	1,80E+05			1,46E+06			
	PPF2	2,80E+05	2,80E+05						
	PPG1	2,60E+07	2,60E+07						
	PPG2	8,20E+04	8,20E+04						
	EI1	2,62E+06	2,62E+06						
	EI2	2,88E+07	2,88E+07						
	DPF1	1,03E+06	1,02E+06	1,00E+04					
	DPF2	1,40E+06	2,00E+05	1,20E+06					
	DPG1	4,06E+07	3,06E+07	1,00E+07					
	DPG2	1,21E+07			1,14E+06		1,10E+07		
La Pampa n=9	EP1	2,69E+07	9,35E+06				1,20E+07		
	LEM1	2,96E+07	2,92E+07	3,66E+05					
	G1	1,53E+07	1,46E+07	6,52E+05					
	G2	1,32E+05	6,60E+04	6,60E+04					
	PAM1	2,07E+05	1,98E+05	9,00E+03					
	PAM2	2,64E+07	2,64E+07						
	DE1	1,65E+06	2,48E+06	8,27E+05					
	DE2	3,01E+06	5,95E+06	8,50E+04					
	TR1	1,17E+09	2,30E+07	1,15E+09					
Mercedes n=8	M1	5,11E+08	6,07E+07				2,04E+07	5,10E+08	
	M2	2,58E+06	2,34E+06				2,35E+05		
	LMS1	5,83E+07	1,07E+07					4,76E+07	
	QC1	1,72E+07	1,54E+07					1,82E+06	
	QI1	7,88E+07	7,87E+07					6,56E+04	
	QL2	3,93E+07	3,93E+07						
	LC1	2,90E+07	2,90E+07						
	LC2	2,07E+07	2,07E+07						
Oncativo n=17	PP5	2,48E+07	2,32E+07						1,55E+06
	PPM	2,05E+08	1,88E+08	5,87E+04				1,76E+07	
	PPT	3,72E+07	3,50E+07	7,01E+04				2,10E+06	
	NN1	3,53E+07	3,46E+07	6,93E+05					
	NN2	1,33E+07	1,33E+07	6,63E+04					
	DH1	3,04E+07	2,03E+07				1,01E+07		
	DH2	1,09E+07	7,70E+05		1,01E+07				
	EF1	2,47E+07	2,47E+07						
	EF2	3,28E+07	3,28E+07						
	Pi1	1,64E+07							
	PI2	2,47E+07	1,87E+07	5,89E+04			5,89E+06		
	MA1	1,75E+07	1,75E+07	7,05E+05					
	EM2	1,57E+07	1,56E+07	7,82E+04					
	DA1	5,87E+07	5,22E+07	6,53E+06					
	DA2	2,23E+08	2,16E+08	6,64E+06					
	EG1	1,31E+07		6,86E+06			6,24E+06		
	EG2	sin aislamientos							
Totales		4,02E+09	2,19E+09	1,20E+09	3,79E+07	1,46E+06	6,59E+07	5,79E+08	1,55E+06

Recuento total y recuento por género para cada aislamiento (UFC/ml)										
Nombre	Aislamiento	Localidad de procedencia	recuento	Penicillium	Mucor	Aspergillus	Scopulariopsis	Cladosporium	Geotrichum	Geomyces
SCF11	P.nalgiovense	Colonia Caroya	1,00E+06	1,00E+06						
SCF31	P. nalgiovense	Colonia Caroya	3,80E+05	3,80E+05						
SCF32	P. nalgiovense	Colonia Caroya	1,80E+06	1,80E+06						
SCV11	P. nalgiovense	Colonia Caroya	4,00E+06	4,00E+06						
SCV21	P.nalgiovense	Colonia Caroya	4,00E+06	4,00E+06						
SCV31	P. nalgiovense	Colonia Caroya	4,50E+06	4,50E+06						
SCA11	P. nalgiovense	Colonia Caroya	5,00E+04	5,00E+04						
SCA21	P. nalgiovense	Colonia Caroya	4,00E+05	4,00E+05						
SCA22	P. nalgiovense	Colonia Caroya	4,00E+05	4,00E+05						
SCA31	P, nalgiovense	Colonia Caroya	4,90E+05	4,90E+05						
SCG11	Mucor racemosus	Colonia Caroya	1,00E+06		1,00E+06					
SCG13	P. nalgiovense	Colonia Caroya	7,50E+06	7,50E+06						
SCG21	P.nalgoiovense	Colonia Caroya	1,00E+06	1,00E+06						
SCG31	P. nalgiovense	Colonia Caroya	1,00E+05	1,00E+05						
SCG32	P. nalgiovense	Colonia Caroya	1,00E+06	1,00E+06						
SCLC11	Mucor racemosus	Colonia Caroya	1,00E+06		1,00E+06					
SCLC12	P nalgiovense	Colonia Caroya	4,00E+06	4,00E+06						
SCLC21	P.brevicompactum	Colonia Caroya	1,00E+06	1,00E+06						
SCLC22	P.nalgiovense	Colonia Caroya	1,00E+06	1,00E+06						
SCLC31	P. nalgiovense	Colonia Caroya	1,00E+06	1,00E+06						
SCLC32	P. nalgiovense	Colonia Caroya	1,00E+06	1,00E+06						
SCLC33	P. brevicompactum	Colonia Caroya	1,00E+06	1,00E+06						
SCR11	Mucor piriformis	Colonia Caroya	1,00E+06		1,00E+06					
SCR12	P. nalgiovense	Colonia Caroya	3,40E+07	3,40E+07						
SCR13	P. nalgiovense	Colonia Caroya	2,90E+07	2,90E+07						
SCR21	Mucor racemosus	Colonia Caroya	1,00E+06		1,00E+06					
SCR22	P. nalgiovense	Colonia Caroya	2,09E+07	2,09E+07						
SCR31	P.nalgiovense	Colonia Caroya	2,09E+07	2,09E+07						
SCR32	P.nalgiovense	Colonia Caroya	2,09E+07	2,09E+07						
SCR33	Mucor racemosus	Colonia Caroya	1,00E+06		1,00E+06					
SCR34	P.nalgiovense	Colonia Caroya	2,00E+07	2,00E+07						
SCDA11	P nalgiovense	Colonia Caroya	2,00E+07	2,00E+07						
SCDA12	P, nalgiovense	Colonia Caroya	2,00E+07	2,00E+07						
SCDA21	P.nalgiovense	Colonia Caroya	2,00E+07	2,00E+07						
SCDA22	P. nalgiovense	Colonia Caroya	2,00E+07	2,00E+07						
SCDA31	P. nalgiovense	Colonia Caroya	2,00E+07	2,00E+07						
SCDA33	P. nalgiovense	Colonia Caroya	2,00E+07	2,00E+07						
SCDA34	P. nalgiovense	Colonia Caroya	2,00E+07	2,00E+07						
SCSU11	Mucor racemosus	Colonia Caroya	1,00E+06		1,00E+06					
SCSU21	Scopulariopsis candida	Colonia Caroya	9,20E+06				9,20E+06			
SCSU23	P.nalgiovense	Colonia Caroya	9,20E+06	9,20E+06						
SCSU31	Mucor racemosus	Colonia Caroya	1,00E+06		1,00E+06					
SCSU32	P. nalgiovense	Colonia Caroya	1,10E+06	1,10E+06						
SCSU33	Scopulariopsis candida	Colonia Caroya	7,20E+05				7,20E+05			
SCEM11	P.nalgiovense	Colonia Caroya	1,00E+06	1,00E+06						
SCEM31	Scopularipsis	Colonia Caroya	1,70E+05				1,70E+05			
SCEM32	P. nalgiovense	Colonia Caroya	3,30E+04	3,30E+04						
SCCEN11	P. nalgiovense	Colonia Caroya	3,30E+04	3,30E+04						

Continúa

Recuento total y recuento por género para cada aislamiento (UFC/ml)										
Nombre	Aislamiento	Localidad de procedencia	recuento	Penicillium	Mucor	Aspergillus	Scopulariopsis	Cladosporium	Geotrichum	Geomyces
SCCEN12	Mucor racemosus	Colonia Caroya	1,00E+06		1,00E+06					
SCCEN21	P.nalgiovense	Colonia Caroya	3,00E+07	3,00E+07						
SCCEN22	P.nalgiovense	Colonia Caroya	3,00E+07	3,00E+07						
SCCEN31	Mucor hiemalis	Colonia Caroya	1,00E+06		1,00E+06					
SCCEN32	P.nalgiovense	Colonia Caroya	1,30E+08	1,30E+08						
SCCEN33	P.nalgiovense	Colonia Caroya	1,30E+08	1,30E+08						
SCCEN34	P.nalgiovense	Colonia Caroya	1,30E+08	1,30E+08						
STTC21	P. nalgiovense	Tandil	1,30E+08	1,30E+08						
STTC22	Mucor racemosus	Tandil	1,00E+04		1,00E+04					
STTPF11	P. nalgiovense	Tandil	1,12E+07	1,12E+07						
STDT12	Mucor racemosus	Tandil	1,00E+05		1,00E+05					
STTPF13	P. nalgiovense	Tandil	1,12E+07	1,12E+07						
STMSF11	P. chrysogenum	Tandil	5,49E+07	5,49E+07						
STMSF13	P. chrysogenum	Tandil	5,49E+07	5,49E+07						
STMSF21	P. nalgiovense	Tandil	1,46E+06	1,46E+06						
STMSF22	P.chrysogenum	Tandil	1,46E+06	1,46E+06						
STMSF23	Mucor racemosus	Tandil	1,46E+06		1,46E+06					
STPPF11	Geomyces	Tandil	1,46E+06							1,46E+06
STPPF12	P.griseofulvum	Tandil	1,80E+05	1,80E+05						
STPPF21	P. nalgiovense	Tandil	1,40E+05	1,40E+05						
STPPF22	P. chrysogenum	Tandil	1,40E+05	1,40E+05						
STPPG11	P. chrysogenum	Tandil	2,60E+07	2,60E+07						
STPPG21	P. nalgiovense	Tandil	4,10E+04	4,10E+04						
STPPG22	P. nalgiovense	Tandil	4,10E+04	4,10E+04						
STEI11	P. nalgiovense	Tandil	4,10E+04	4,10E+04						
STEI12	P. nalgiovense	Tandil	4,10E+04	4,10E+04						
STEI13	P. nalgiovense	Tandil	4,10E+04	4,10E+04						
STEI14	P. chrysogenum	Tandil	2,50E+06	2,50E+06						
STEI21	P. citrinum	Tandil	2,50E+07	2,50E+07						
STEI23	P. nalgiovense	Tandil	3,80E+06	3,80E+06						
STDPF11	P.solitum	Tandil	9,20E+05	9,20E+05						
STLDPF12	Mucor racemosus	Tandil	1,00E+04		1,00E+04					
STDPF13	P. nalgiovense	Tandil	1,00E+05	1,00E+05						
STDPF21	P. nalgiovense	Tandil	1,00E+05	1,00E+05						
STDPF22	P. nalgiovense	Tandil	1,00E+05	1,00E+05						
STDPF23	Mucor racemosus	Tandil	1,20E+06		1,20E+06					
STDPG11	P. chrysogenum	Tandil	1,02E+07	1,02E+07						
STDPG12(STLDPG12)	Mucor racemosus	Tandil	1,00E+07		1,00E+07					
STDPG13(STLDPG13)	P. nalgiovense	Tandil	1,02E+07	1,02E+07						
STDPG14(STLDPG14)	P. nalgiovense	Tandil	1,02E+07	1,02E+07						
STDPG21	Scopulariopsis cándida	Tandil	1,14E+06				1,14E+06			
STDPG22	Cladosporium herbarum	Tandil	1,10E+07					1,10E+07		
SPEP11	P. nalgiovense	La Pampa (región NO)	6,60E+06	6,60E+06						
SPEP12	P. implicatum	La Pampa (región NO)	2,75E+06	2,75E+06						
SPEP13	Mucor hiemalis	La Pampa (región NO)	5,51E+06		5,51E+06					
SPEP15	Cladosporium cladosporioides	La Pampa (región NO)	1,10E+07					1,10E+07		
SPEP16	Cladosporium sphaerospermum	La Pampa (región NO)	1,00E+06					1,00E+06		
SPLEM11	Mucor hiemalis	La Pampa (región NO)	3,66E+05		3,66E+05					
SPLEM12	P. nalgiovense	La Pampa (región NO)	1,46E+07	1,46E+07						
SPLEM13	P. nalgiovense	La Pampa (región NO)	1,46E+07	1,46E+07						
SPG11	P. nalgiovense	La Pampa (región NO)	1,46E+07	1,46E+07						
SPG12	Mucor hiemalis	La Pampa (región NO)	6,52E+05		6,52E+05					
SPG21	Mucor circinelloides	La Pampa (región NO)	6,60E+04		6,60E+04					
SPG22	P. nalgiovense	La Pampa (región NO)	6,60E+04	6,60E+04						
SPPAM11	P. nalgiovense	La Pampa (región NO)	6,60E+04	6,60E+04						
SPPAM12	P. nalgiovense	La Pampa (región NO)	6,60E+04	6,60E+04						
SPPAM13	P. nalgiovense	La Pampa (región NO)	6,60E+04	6,60E+04						
SPPAM14	Mucor hiemalis	La Pampa (región NO)	9,00E+03		9,00E+03					
SPPAM21	P. nalgiovense	La Pampa (región NO)	1,76E+07	1,76E+07						
SPPAM22	P. nalgiovense	La Pampa (región NO)	8,80E+06	8,80E+06						

Continúa:

SPPAM22	P. nalgiovense	La Pampa (región NO)	8,80E+06	8,80E+06						
SPTR11	P. solitum	La Pampa (región NO)	1,15E+07	1,15E+07						
SPTR13	P.solitum	La Pampa (región NO)	1,15E+07	1,15E+07						
SPTR14	M.hiemalis	La Pampa (región NO)	1,15E+09		1,15E+09					
SMM11	Cladosporium sphaerospermum	Mercedes	2,04E+07					2,04E+07		
SMM12	P. nalgiovense	Mercedes	1,02E+07	1,02E+07						
SMM13	P. nalgiovense	Mercedes	5,00E+07	5,00E+07						
SMM14	P. nalgiovense	Mercedes	5,10E+05	5,10E+05						
SMM15	A. ochraceus	Mercedes	5,10E+10			5,10E+08				
SMM22	P. nalgiovense	Mercedes	1,17E+06	1,17E+06						
SMM23	P. nalgiovense	Mercedes	1,17E+06	1,17E+06						
SMM24	C. cladosporoides	Mercedes	2,35E+05					2,35E+05		
SMLMS11	P.implicatum	Mercedes	6,28E+06	6,28E+06						
SMLMS12	A. ochraceus	Mercedes	6,28E+06			6,28E+06				
SMLMS13	A. ochraceus	Mercedes	6,28E+06			6,28E+06				
SMLMS14	A. ochraceus	Mercedes	5,02E+06			5,02E+06				
SMLMS15	A. ochraceus	Mercedes	6,28E+06			6,28E+06				
SMLMC11	A. ochraceus	Mercedes	2,37E+07			2,37E+07				
SMLMC13	P.implicatum	Mercedes	4,46E+06	4,46E+06						
SMQC11	P.implicatum	Mercedes	4,46E+06	4,46E+06						
SMQC12	P.nalgiovense	Mercedes	9,12E+06	9,12E+06						
SMQC13	A. ochraceus	Mercedes	1,82E+06			1,82E+06				
SMQC14	P.implicatum	Mercedes	1,82E+06	1,82E+06						
SMQL11	P.implicatum	Mercedes	6,56E+07	6,56E+07						
SMQL22	P.nalgiovense	Mercedes	3,93E+07	3,93E+07						
SMQL13	P.nalgiovense	Mercedes	6,56E+06	6,56E+06						
SMQL14	P.implicatum	Mercedes	6,56E+06	6,56E+06						
SMQL15	A. ochraceus	Mercedes	6,56E+04			6,56E+04				
SMLC11	P.nalgiovense	Mercedes	6,70E+06	6,70E+06						
SMLC12	P. chrysogenum	Mercedes	6,70E+06	6,70E+06						
SMLC13	P. chrysogenum	Mercedes	6,70E+06	6,70E+06						
SMLC14	P.nalgiovense	Mercedes	2,01E+06	2,01E+06						
SMLC21	P. nalgiovense	Mercedes	6,91E+06	6,91E+06						
SMLC22	P.nalgiovense	Mercedes	6,91E+06	6,91E+06						
SMLC23	P.nalgiovense	Mercedes	6,91E+06	6,91E+06						
SMLC24	P.nalgiovense	Mercedes	6,91E+06	6,91E+06						
SOPP51	P.citrinum	Oncativo	2,32E+07	2,32E+07						
SOPP53	Geotrichum candidum	Oncativo	1,55E+06						1,55E+06	
SOPPM1	P.nalgiovense	Oncativo	9,98E+07	9,98E+07						
SOPPM2	Aspergillus ochraceus	Oncativo	1,17E+07			1,17E+07				
SOPPM3	P.nalgiovense	Oncativo	8,80E+07	8,80E+07						
SOPPM4	Aspergillus ochraceus	Oncativo	5,87E+06			5,87E+06				
SOPPM5	Mucor circinelloides	Oncativo	5,87E+04		5,87E+04					
SOPPT1	P. nalgiovense	Oncativo	3,50E+07	3,50E+07						
SOPPT2	A. ochraceus	Oncativo	2,10E+06			2,10E+06				
SOPPT3	Mucor circinelloides	Oncativo	7,01E+04		7,01E+04					
SONN11	P. nalgiovense	Oncativo	3,46E+07	3,46E+07						
SONN12	M. circinelloides	Oncativo	6,93E+05		6,93E+05					
SONN22	P.nalgiovense	Oncativo	6,63E+06	6,63E+06						
SONN23	P.nalgiovense	Oncativo	6,63E+06	6,63E+06						
SONN24	M. racemosus	Oncativo	6,63E+04		6,63E+04					
SODH11	P.nalgiovense	Oncativo	2,03E+07	2,03E+07						
SODH12	Cladosporium cladosporoides	Oncativo	1,01E+07					1,01E+07		
SODH21	P.nalgiovense	Oncativo	5,14E+05	5,14E+05						
SODH23	Scopulariopsis cándida	Oncativo	1,01E+07				1,01E+07			
SODH24	P.nalgiovense	Oncativo	1,28E+05	1,28E+05						
SODH25	P.nalgiovense	Oncativo	1,28E+05	1,28E+05						
SOEF11	P. nalgiovense	Oncativo	1,28E+05	1,28E+05						
SOEF12	P.implicatum	Oncativo	8,20E+06	8,20E+06						
SOEF13	P.nalgiovense	Oncativo	1,64E+07	1,64E+07						
SOEF21	P.nalgiovense	Oncativo	1,64E+07	1,64E+07						
SOEF22	P.nalgiovense	Oncativo	1,64E+07	1,64E+07						
SOPI11	P.nalgovense	Oncativo	1,64E+07	1,64E+07						
SOPI22	P.nalgiovense	Oncativo	1,64E+07	1,64E+07						
SOPI23	C. cladosporoides	Oncativo	5,89E+06					5,89E+06		
SOPI24	P.implicatum	Oncativo	1,17E+06	1,17E+06						
SOPI25	P.nalgiovense	Oncativo	1,17E+06	1,17E+06						
SOPI26	M. circinelloides	Oncativo	5,89E+04		5,89E+04					
SOMA11	P.nalgiovense	Oncativo	8,74E+06	8,74E+06						
SOMA12	P.nalgiovense	Oncativo	8,74E+06	8,74E+06						
SOMA13	M. circinelloides	Oncativo	7,05E+05		7,05E+05					
SOEM21	P.nalgiovense	Oncativo	1,56E+07	1,56E+07						
SOEM22	Mucor hiemalis	Oncativo	7,82E+04		7,82E+04					
SODA11	P.nalgiovense	Oncativo	5,22E+07	5,22E+07						
SODA12	Mucor circinelloides	Oncativo	6,53E+06		6,53E+06					
SODA21	P. nalgiovense	Oncativo	8,32E+07	8,32E+07						
SODA22	P. nalgiovense	Oncativo	1,33E+08	1,33E+08						
SODA24	M.circinelloides	Oncativo	3,32E+06		3,32E+06					
SODA25	Mucor racemosus	Oncativo	3,32E+06		3,32E+06					
SOEG11	Cladosporium cladosporoides	Oncativo	6,24E+06					6,24E+06		
SOEG12	Mucor circinelloides	Oncativo	6,24E+06		6,24E+06					
SOEG13	Mucor circinelloides	Oncativo	6,24E+05		6,24E+05					
SODE11	P. nalgiovense	La Pampa (región NO)	2,48E+06	2,48E+06						
SODE12	Mucor circinelloides	La Pampa (región NO)	8,27E+05		8,27E+05					
SODE21	P.nalgiovense	La Pampa (región NO)	5,95E+06	5,95E+06						
SODE22	Mucor circinelloides	La Pampa (región NO)	8,50E+04		8,50E+04					

Provincias	*Localidades*	*Aislamientos*	*Concentración de proteínas (mg/ml)*
órdoba	*Colonia Caroya*	SCCEN12	0,91
		SCCEN21	0,92
		SCCEN22	0,70
		SCDA21	0,75
		SCF11	0,75
		SCG13	0,83
		SCG21	0,98
		SCLC12	0,59
		SCR13	0,89
		SCR22	1,30
		SCR32	0,70
		SCR34	0,35
		SCSU12	0,97
		SCSU23	0,58
		SCV11	0,52
		SCV31	1,10
	Oncativo	SODA21	0,81
		SODE21	0,84
		SOEF13	0,88
		SOEF22	0,94
		SOEM21	0,88
		SONN23	0,92
		SOPI11	0,96
		SOPI25	0,92
		SOPI25	0,96
		SOPP11	0,96
		SOPPm3	0,87
		SOPPM3	0,48
La Pampa	*La Pampa*	SPEP11	1,33
		SPG11	0,87
		SPG22	1,10
		SPLEM12	1,00
		SPLEM13	1,00
		SPPAM11	0,85
		SPPAM12	0,97
		SPPAM13	1,10
		SPPAM21	0,99
		SPTR11	0,90
Buenos Aires	*Tandil*	STDPF13	1,10
		STDPF21	1,40
		STDPF22	1,10
		STDPF22	0,75
		STEI11	0,87
		STEI13	0,95
		STEI23	1,00
		STMSF21	1,10
		STPPG22	0,88
		STR11	1,14
		STTC21	1,10
	Mercedes	SMLC12	0,77
		SMLC22	1,10
		SMLC32	1,00
		SMM12	0,86
		SMM14	0,95
		SMM22	0,68
		SMM23	1,10
		SMQC12	0,85
		SMQL22	0,96

Aislamiento e Identificación de hongos autóctonos de emplume de embutidos secos fermentados de Tandil (Buenos Aires)

Vila Graciela., Canel Romina., Ludemann Vanesa., Pose Graciela.

Ingeniería en alimentos- Departamento de Ciencia y Tecnología- Universidad Nacional de Quilmes (UNQ).
Roque Saenz Peña 352 Bernal. Buenos Aires. Argentina

gvila@uolsinectis.com.ar

Durante el proceso de secado de los salames, determinados hongos colonizan la superficie de la tripa. El desarrollo de los mismos constituye, por un lado uno de los factores que contribuyen a determinar el perfil sensorial del salame y por otro lado un indicador de las condiciones ambientales en los que se desarrolla el proceso de maduración. En la elaboración artesanal de salame, la fuente tradicional de estos hongos es la micoflora natural del ambiente.

Objetivo:

El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar los hongos que colonizan la superficie de embutidos secos fermentados producidos en Tandil.

Materiales y Métodos:

En Setiembre de 2010 fueron muestreados 5 establecimientos elaboradores (15 muestras totales) que no utilizan cultivos starter de emplume.

Para el recuento de hongos de crecimiento superficial se agregaron 200 ml de agua de peptona al 0,1% a bolsas estériles conteniendo la tripa.. A partir de allí se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 0,1 ml en Agar Dicloran Glicerol 18% (DG18) y 0,1 ml en Agar Extracto de Malta (MEA). El recuento total fue expresado como ufc/cm^2.

Los hongos se identificaron a nivel de especie según Pitt, 1997. sobre tres medios estándar: Agar Czapeck Extracto de Levadura (CYA), MEA y Agar Nitrato Glicerol 25% (GN25) a 25 °C y también sobre CYA a 5 °C . Como medio adicional de identificación se utilizó el Agar neutro creatinina sacarosa (CSN) y Agar Czapeck extracto de levadura 20% sacarosa (CY20S). para confirmar la identificación de especies de Penicillium y Eurotium respectivamente.

Los diferentes biotipos de Penicillium nalgiovense aislados fueron caracterizados de acuerdo al tamaño de la colonia y a la coloración de sus conidios en MEA y CYA (Fleischwirtsch 1988). (Figura N° 1)

Biotipos de P. nalgiovense	Color de los conidios		Grado de desarrollo de los conidios
A- Agar extracto de malta Colonias grandes (20- 26 mm)			
Biotipo 1	CYA	Turquesa	+++
	MEA	Verde	+++
Biotipo 2	CYA	Blanco	+
	MEA	Azul	+
Biotipo 3	CYA	Blanco	+
	MEA	Blanco a azul pálido	+
B- Agar extracto de malta Colonias pequeñas (10-20 mm)			
Biotipo 4	CYA	Turquesa	+++
	MEA	Verde	+++
Biotipo 5	CYA	Verde	+
	MEA	Verde	++
Biotipo 6	CYA	Blanco	+
	MEA	Amarillento	+

Figura N°1 : Caracterización morfológica de los distintos biotipos de P. nalgiovense

Resultados:

El recuento total en DG18 se encontró entre 10^4 y 10^8, siendo el promedio 6,38 10^7 ufc/cm^2 y en MEA entre 10^5 y 10^7, siendo el promedio 1,86 10^7 ufc/cm^2. También se realizó el recuento de levaduras siendo el promedio de 3,50 10^7 ufc/cm^2 en DG18 y 7,42 10^7 en MEA.

A partir del análisis de las 15 muestras se obtuvo un total de 34 aislamientos fúngicos, los cuales pertenecen a 5 géneros diferentes: *Penicillium*, *Mucor*, *Scopulariopsis*, *Eurotium* y *Cladosporium (Fig N°: 2)* dentro de estos se encontraron 9 especies: *P. nalgiovense*, *P. chrysogenum*, *P. solitum*, *P. citrinum*, *P. griseofulvum*, *M. racemosus*, *C. herbarum*, *E. amstelodami* y *S. candida*. Los aislamientos predominantes fueron *P. nalgiovense*, *P. chrysogenum* y *M. racemosus*. *(Fig N°: 3).*

El biotipo predominante fue el Biotipo 4 (9/14) con una frecuencia de aparición de 64%. (Figura N°: 4)

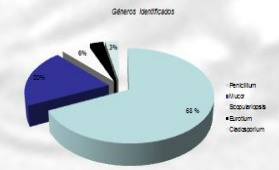


Figura N° 2: Géneros fúngicos aislados a partir de las 15 muestras analizadas

Hongos	Frecuencia (%)	Predominancia(%)
P.nalgiovense	93	42
P.chrysogenum	47	21
P.citrinum	7	3
P.solitum	7	3
P. griseofulvum	7	3
M. racemosus	40	18
S.candida	13	6
E. amstelodami	7	3
C.herbarum	1	3

Figura N°.3: Frecuencia y predominancia del las diferentes especies fúngicas aisladas

Figura N°4 : Penicillium nalgiovense Biotipo 4 (colonias en CYA)

Conclusiónes:

Como resultado podemos observar que existe diversidad de géneros y especies fúngicas y una predominancia de *P. nalgiovense* y *P. chrysogenum* coincidente con estudios previos realizados en la misma región bonaerense (Castellari, 2010).

El Biotipo predominante en nuestro estudio fue el 4 de apariencia verde, lo cual no es coincidente con los biotipos 2, 3 y 6 preferibles como colonizadores de la tripa por la apariencia blanquecina que le confieren al salame.

Referencias:

• Castellari, C; Quadrelli, A; Laich, F. (2010). Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 142: 149-155.
• Pitt, J.I.; Hocking, A.D. (2009). Fungi and food spoilage (3rd Edition). Blackie Academic & Professional, UK.

MICOFLORA SUPERFICIAL DE SALAMES PRODUCIDOS EN COLONIA CAROYA EN EPOCA INVERNAL Y ESTIVAL

Canel Romina, Vila Graciela, Pilatti, Leonor, Champredonde Marcelo, Ludemann Vanesa

Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) Roque Saenz Peña 352 Bernal (B1876XD).
vludemann@unq.edu.ar

Colonia Caroya es una localidad en la provincia de Córdoba (Argentina) de origen friulano donde la producción de chacinados es una de las actividades más importantes.
En la elaboración artesanal de estos embutidos, los hongos naturales del medioambiente colonizan su superficie otorgando la apariencia típica.
Durante época estival, la llamada "Mufa amarilla", preocupa a la mayoría de los productores. Consiste de un emplume de coloración amarillento que otorga problemas organolépticos a los salames.
El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar los hongos del emplume de los salames producidos en Colonia Caroya en época invernal y estival.
Los hongos superficiales fueron aislados sobre Agar Dicloran Glicerol 18% y Agar Extracto de Malta, e identificados a nivel de especie. Se determinó la actividad de agua y el pH.
En Julio de 2010 fueron muestreados 10 establecimientos elaboradores (30 salames) y en Febrero de 2011, 9 de estos establecimientos (18 salames).
Los salames de invierno mostraban al momento del muestreo un emplume blanquecino, a diferencia de los muestreados en verano en donde predominaban en varios de ellos una coloración amarillenta algodonosa superficial.
En el muestreo de invierno se obtuvo un total de 56 aislamientos, los cuales pertenecen a 3 géneros diferentes: *Penicillium* (78%), *Mucor* (18%) y *Scopulariopsis* (4%). Dentro de estos géneros se encontraron 7 especies, predominando *P. nalgiovense* (42/56) con una frecuencia de aparición del 100% y *M. racemosus* (8/56) con una frecuencia de aparición de 26%. En el muestreo de verano se obtuvo un total de 45 aislamientos, los cuales pertenecen a 5 géneros diferentes: *Penicillium* (49%), *Aspergillus* (33%), *Mucor* (7%), *Cladosporium* (4%) y *Geotrichum* (2%). Dentro de estos géneros se encontraron 9 especies, predominando *P. nalgiovense* (18/45) con una frecuencia de aparición del 100% y *A. ochraceus* (15/45) con una frecuencia de aparición de 100%.
A. Ochraceus, sería el responsable de la mufa amarilla. Esta especie representó entre el 28 - 92% del recuento total en 5 de los establecimientos analizados. La preocupación por esta problemática podría incrementarse, ya que no solo otorga a los salames caracteres organolepticos indeseables, sino que podría ser productor de Ocratoxina A, lo cual motiva a futuros estudios, que en la actualidad estamos trabajando.

BIODIVERSIDAD DE HONGOS DE EMPLUME EN EMBUTIDOS SECOS FERMENTADOS PRODUCIDOS EN COLONIA CAROYA (CÓRDOBA)

Canel Romina, Vila Graciela, Pilatti Leonor, Champredonde Marcelo y Ludemann Vanesa.
Universidad Nacional de Quilmes- Departamento de Ciencia y Tecnología
rcanel@unq.edu.ar

Durante el proceso de secado, los hongos filamentosos colonizan la superficie de los embutidos, asentándose sobre la tripa. El emplume superficial de los embutidos es considerado como un índice de terminación del proceso de secado confiriendo al producto final su apariencia típica además de ser reconocidos diversos atributos tales como desarrollo de flavour, actividad antioxidante e inhibición de la formación de encostrado. En la elaboración artesanal de embutidos, la fuente tradicional de estos hongos es la micoflora natural del ambiente, consistiendo en un grupo heterogéneo compuesto por diferentes familias y especies representativas. Al día de la fecha no se ha estudiado la micoflora de los salames producidos en Colonia Caroya.

Colonia Caroya es una localidad de origen friulano que se encuentra en la provincia de Córdoba; en ella la producción de chacinados es una de las actividades más importantes. El renombre que adquirieron estos embutidos a nivel nacional y el anclaje territorial del producto, motivó al municipio y a los elaboradores locales a iniciar un proceso de construcción de una Indicación Geográfica (IG), la cual fomenta el desarrollo local promoviendo la diferenciación de productos por su identidad y calidad particular asociada al origen geográfico.

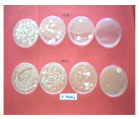
OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar los hongos del emplume de los salames producidos en Colonia Caroya.

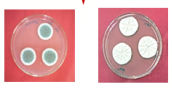
MATERIALES Y METODOS

En Julio de 2010 fueron muestreados 10 establecimientos elaboradores (3 salames por cada establecimiento).

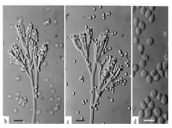
Para el recuento de hongos de crecimiento superficial se agregaron 200 ml de agua de peptona al 0,1% a bolsas estériles conteniendo la tripa. A partir de allí se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 0,1 ml en Agar Dicloran Glicerol 18% (DG18) y 0,1 ml en Agar Extracto de Malta (MEA). El recuento total fue expresado como ufc/cm^2. Todos los aislamientos fúngicos encontrados se identificaron a nivel de especie según Pitt and Hocking (2009) y Samsom *et al* (1995).



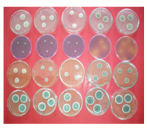
Recuento y Aislamiento de los diferentes hongos en DG18 y MEA



Purificación de los hongos aislados en MEA



Observación microscópica



Observación macroscópica en diferentes medios de cultivo

Identificación a nivel de especie

RESULTADOS

La recuperación de los hongos fue similar utilizando ambos medios (DG18 y MEA). El recuento total en DG18 se encontró entre 10^5 y 10^7, siendo el promedio 2,2 10^7 ufc/cm2 y en MEA entre 10^5 y 10^8, siendo el promedio 3,7 10^7 ufc/cm2.

Se obtuvo un total de 56 aislamientos fúngicos (Figura 1), los cuales pertenecen a 3 géneros diferentes: *Penicillium* (78%), *Mucor* (17%) y *Scopulariopsis* (5%), y dentro de estos se encontraron 7 especies: *P. nalgiovense*, *P. simplicissimum*, *P. brevicompactum*, *M. hiemalis*, *M. racemosus*, *M. piriformis* y *S. candida*.

Los aislamientos predominantes fueron *P. nalgiovense* (41/56) con una frecuencia de aparición del 100%, *M. racemosus* (7/56) con una frecuencia de aparición de 26% y *Scopulariopsis candida* (3/56) con una frecuencia de aparición de 10% (Figura 2).

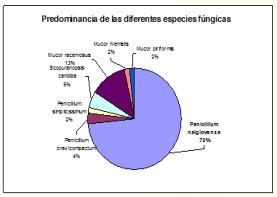


Figura 1: Especies fúngicas obtenidos de los 30 salames analizados

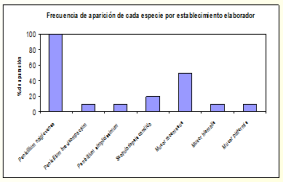


Figura 2: Frecuencia de aparición de cada especie fúngica en los 10 establecimientos evaluados.

DISCUSION

En conclusión podemos observar que en todos los establecimientos analizados existe una baja diversidad de géneros fúngicos y una alta predominancia de *P. nalgiovense*, lo cual concuerda con estudios anteriores en otras regiones y países (Castellari et al, 2010; Ludemann et al, *2004;* Andersen y Frisvad, 1994). A su vez un dato relevante es que esta especie está reportada como no toxicogénica (Pitt and Hocking, 2009).

Estos resultados son alentadores para la obtención del sello de IG que persigue Colonia Caroya, debido a que una micoflora autóctona característica de la región, constituiría un elemento que se podría sumar al conjunto de factores locales que contribuyen a definir la tipicidad del salame.

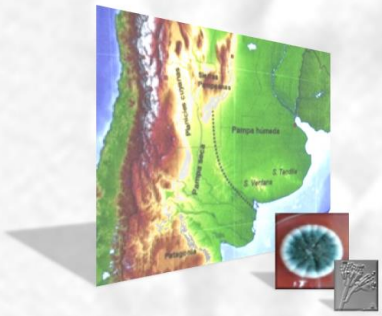
Todo esto motiva a continuar con estudios de diferentes elaboradores de la región y en diferentes épocas del año con la finalidad de colaborar en la búsqueda de la IG.

REFERENCIAS

• Andersen, S. J. and Frisvad, J. C. (1994). *Penicillium* production by *Penicillium nalgiovense*. Applied Microbiology, 19: 486-488.
• Castellari, C; Quadrelli, A; Laich, F. (2010). Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 142: 149-155.
• Ludemann, V.; Pose, G.; Pollio M.; Segura, J. (2004). Surface mycoflora of Argentinean meat-based dry fermented sausages and morphological characterization of isolates strains. Journal of Food Technology 2 (4): 288-292, ISSN: 1638-8831.
• Pitt, J.I.; Hocking, A.D. (2009). Fungi and food spoilage (3rd Edition). Blackie Academic & Professional, UK.
• Samsom, R. A.; Hoekstra, E. S.; Frisvad, J. C.; Filtenborg, O. (1995). Introduction to foodborne fungi, 4th Edition. Baarn, Netherlands.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA MICOFLORA DE EMBUTIDOS SECOS FERMENTADOS DE DIFERENTES REGIONES DEL PAIS

Vila Graciela., Canel Romina., Ludemann Vanesa., Pose Graciela.
Ingeniería en alimentos- Departamento de Ciencia y Tecnología- Universidad Nacional de Quilmes (UNQ). Roque Saenz Peña 352 Bernal. Buenos Aires. Argentina
gvila@uolsinectis.com.ar



La presencia de una micobiota particular que coloniza la superficie de los embutidos elaborados artesanalmente se debe a determinadas condiciones ambientales que se presentan en los lugares donde éstos son manufacturados. En Argentina las principales áreas productoras de salames se encuentran localizadas en la región centro-este del país (región pampeana) siendo una de las características que diferencian éstos productos su flavor y calidad

Objetivo:

El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar los hongos que colonizan la superficie de embutidos secos fermentados producidos en: Tandil y Mercedes en la provincia de Buenos Aires, NE de la provincia de La Pampa y Colonia Caroya en la provincia de Córdoba.

Materiales y Métodos:

Entre los meses de Setiembre de 2010 y Abril de 2011 fueron muestreados 24 establecimientos elaboradores (10 de Colonia Caroya, 5 de Tandil, 5 de la región NE de La Pampa y 4 de Mercedes) que no utilizan cultivos starter de emplume.

Para el recuento de hongos de crecimiento superficial se agregaron 200 ml de agua de peptona al 0,1% a bolsas estériles conteniendo la tripa.. A partir de allí se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 0,1 ml en Agar Dicloran Glicerol 18% (DG18) y 0,1 ml en Agar Extracto de Malta (MEA). El recuento total fue expresado como ufc/cm^2.

Los hongos se identificaron a nivel de especie según Pitt, 1997. sobre tres medios estándar: Agar Czapeck Extracto de Levadura (CYA), MEA y Agar Nitrato Glicerol 25% (GN25) a 25 °C y también sobre CYA a 5 °C . Como medio adicional de identificación se utilizó el Agar neutro creatinina sacarosa (CSN) y Agar Czapeck extracto de levadura 20% sacarosa (CY20S). para confirmar la identificación de especies de Penicillium y Eurotium respectivamente.

Resultados:

El recuento total en DG18 se encontró entre 10^4 y 10^8, siendo el promedio 2,6.10^7 ufc/cm^2 y en MEA entre 10^5 y 10^7, siendo el promedio 2,13. 10^8ufc/cm^2. (Figura Nº 1)

Se obtuvo un total de 133 aislamientos fúngicos, los cuales pertenecen a 6 géneros diferentes: *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Scopulariopsis*, *Cladosporium* y *Eurotium* (Figura Nº 2) dentro de estos se encontraron 15 especies: *P. nalgiovense*, *P. chrysogenum*, *P. solitum*, *P. citrinum*, *P. griseofulvum*, *P. implicatum* *M. racemosus*,*M. circinelloides*, *M. hiemalis*, *C. cladospoorides*, *C. herbarum*, C. sphaerospermum, A. ochraceus, *E. Amstelodami* y *S. candida*.

		Colonia Caroya		Tandil		Mercedes		La Pampa (región NE)	
Nº de salames		30		15		8		4	
Medio		DG18	MEA	DG18	MEA	DG18	MEA	DG18	MEA
Recuentos (UFC/cm^2)	Mínimo	2.10^3	5,8.10^4	1.10^4	9.2.10^5	6,2.10^6	6,8.10^6	6,5.10^5	1,3.10^5
	Máximo	5,9.10^8	1,6.10^8	7,9.10^8	8.5.10^7	7,8.10^7	5,2.10^7	5,7.10^7	5,2.10^7
	Promedio	3,6.10^8	4.10^7	3,9.10^8	4.2.10^7	4,2.10^7	2,9.10^7	2.10^7	2.10^7

Figura Nº 1:

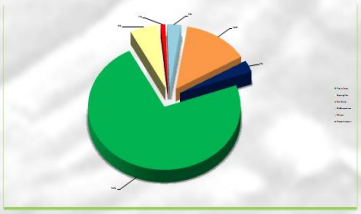


Figura Nº 2: Géneros fúngicos aislados a partir de las muestras analizadas

Los aislamientos predominantes fueron: en Tandil P. nalgiovense y P. chrysogenum , en Mercedes: P. nalgiovense, A. ochraceus y P. implicatum . En la región NE de La Pampa: P. nalgiovense y M. racemosus . En Colonia Caroya: P. nalgiovense y M. racemosus

Las frecuencias de aparición de los aislamientos predominantes fueron en Tandil :*P. nalgiovense*, *P. chrysogenum* y *M. racemosus*. En Mercedes: P. nalgiovense, A. ochraceus , P. implicatum y P. chrysogenum . En región NE de La Pampa : P. nalgiovense, M. hiemalis y P. implicatum. En Colonia Caroya : P. nalgiovense, M. racemosus y S. candida (Figura Nº 2)

Región	Aislamiento	Predominancia(%)	Frecuencia(%)
Tandil	P.nalgiovense	44	67
	P. chrysogenum	19	40
	M.racemosus	16	40
Mercedes	P.nalgiovense	37	75
	A.ochraceus	28	62
	P.implicatum	21	50
	P.chrysogenum	7	12
La Pampa (región NE)	P.nalgiovense	42	100
	M. hiemalis	33	75
	P.implicatum	8	25
Colonia Caroya	P.nalgiovense	72	100
	M. racemosus	17	50

Figura Nº 2: Frecuencia y predominancia del las diferentes especies fúngicas aisladas

Conclusiónes:

En conclusión podemos observar que en todos los establecimientos analizados existe una baja diversidad de géneros fúngicos y una alta predominancia de *P. nalgiovense*, lo cual concuerda con estudios anteriores en otras regiones y países.

Referencias:

• Castellari, C; Quadrelli, A; Laich, F. (2010). Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 142: 149-155.
• Pitt, J.I.; Hocking, A.D. (2009). Fungi and food spoilage (3rd Edition). Blackie Academic & Professional, UK.

Universidad Nacional de Quilmes

POLIMORFISMOS DE ESTERASA EN *Penicillium nalgiovense* DE LA MICOFLORA DE EMBUTIDOS SECOS FERMENTADOS DE DIFERENTES REGIONES DEL PAÍS

Vila G[1], Agüero M[2], Ludemann V[1], Segura J[1,2], Pose G[1,2,3].

1- Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) Roque Saenz Peña 352 Bernal (B1876XD)
E- mail: gvila@uolsinectis.com.ar
2- Universidad Nacional de Río Negro
3- CONICET

Aislamientos de *Penicillium nalgiovense* obtenidos de embutidos secos fermentados de diferentes regiones productoras del país presentan diferencias a nivel morfológico. La utilización de diferentes marcadores, entre ellos los perfiles de isoenzimas, permiten determinar la existencia de polimorfismos en poblaciones genéticamente emparentadas y correlacionar diferencias morfológicas y bioquímicas.

Objetivo:

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar bioquímicamente los aislamientos de *P. nalgiovense* provenientes de diferentes regiones productoras del país determinando el polimorfismo isoenzimático del sistema α-esterasa.

Materiales y Métodos:

Un total de 63 aislamientos obtenidos de las regiones productoras de Caroya (18), Oncativo (18), Mercedes (9), Tandil (9) y La Pampa (9) fueron estudiados.

Los micelios fueron crecidos 7 días a 25 ° C a 150 rpm en 250 ml de medio de cultivo conteniendo: 30g de sacarosa, 4g de KNO_3 K_2HPO_4 0,5g de NaCl 0,5g de $MgSO_47H_2O$, 0,01g de $FeSO_47H_2O$, 5g de extracto de levadura. (Banke,1997) y colectados por filtración. La extracción de proteínas se llevó a cabo con buffer bifosfato de potasio (BPP) 0,1M a 4ºC. La concentración proteica se determinó utilizando el kit colorimétrico Protein Assay Kit II (método Bradford) (BioRad).Las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida discontinuos verticales no desnaturalizantes (Laemmli, 1970). La tinción de α-esterasas (EC. 3.1.1.1) se realizó con: 0,2M Tris-HCl pH:7,α- naftil-acetato y fast blue BB salt (según Brewer, 1970)

Se analizó movilidad relativa (Rf) e intensidad de tinción de cada banda, considerando que corresponden a los mismos alelos bandas de igual movilidad y con la misma apariencia, teniendo en cuenta la siguiente fórmula (Gottlieb and Hepben ,1966):

Rf: bc/bf

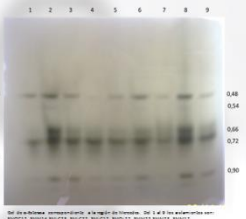
bc: distancia de migración de la banda
bf: distancia de migración del frente de corrida

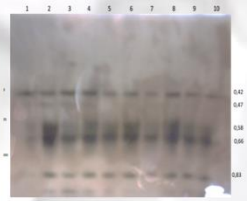
Resultados

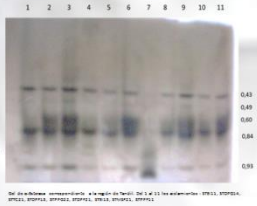
Se obtuvieron un total de 13 bandas de diferente movilidad subdivididas en 3 áreas. Área I: bandas de Rf 0.42, 0.45, 0.48 y 0.51. Área II: bandas de Rf 0.57, 0.60, 0.65, 0.68, 0.71 y 0.74. Área III: bandas de Rf 0.83, 0.89 y 0.92. Las bandas se distribuyen para cada región de la siguiente manera: Área I: 0.42 (Tandil y Oncativo), 0.45 (en La Pampa), 0.48 (común a todas las regiones) y 0.51 (en Mercedes). En el Área II la distribución de bandas es: 0.57 (Oncativo), 0.60 (Tandil y La Pampa), 0.65 (Oncativo, La Pampa y Mercedes), 0.68 (Caroya), 0.71 (Mercedes), 0.74 (Caroya). En el Área III: Rf 0.83 (Tandil, Oncativo y La Pampa), 0.89 (La Pampa) y 0.92 (Caroya, Tandil, Mercedes y Oncativo). Tabla 1

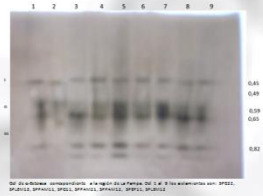
		Movilidad electroforética (Rf)												
		Area I				Area II						Area III		
	nº de aislamientos	0,42	0,45	0,48	0,51	0,57	0,60	0,65	0,68	0,71	0,74	0,83	0,89	0,92
Región Caroya	18			—					—		—			—
Oncativo	18	—		—		—		—				—		—
La Pampa	9		—	—			—	—				—	—	
Mercedes	9			—	—			—		—				—
Tandil	9	—		—			—					—		—

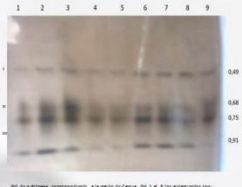
Tabla 1: Distribución de bandas de α-esterasa por región según áreas de diferente movilidad electroforética











Conclusiones

Los aislamientos correspondientes a Caroya y Oncativo comparten bandas con todas las regiones analizadas. La Pampa, Mercedes, Caroya y Oncativo presentan bandas no compartidas con otras regiones. Tandil no presenta bandas sin compartir. Estos resultados sugieren que la región de Caroya posee mayor cantidad de alelos compartidos con todas las regiones estudiadas, en especial con Oncativo y Tandil, siendo Mercedes y La Pampa las regiones que presentan mayor número de alelos sin compartir.

Referencias:
-Tivoli, (1993)Fusarium spp from potato: polymorphism of esterase phenotypes on polyacrylamide gel electrophoresis. Agronomie. 13, 637-64.
-Gottlieb D, Hepden (1966). The electrophoretic movements of proteins from various Streptomyces species as taxonomic criterion.Gen Microbiology. 44, 65-104.
Brewer, G. J. & Singh, C. F. (1970). An introduction to isozymes techniques. London & New York, Academic Press, 186 p
-Banke. (1996) Taxonomy of Penicillium chrysogenum and related xerophilic species, based on isozyme analysis. Mycology. 617-624.
-Laemnli (1979). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 227, 680– 685
-Murphy, (1990) *Proteins I: Isozyme Electrophoresis*, Molecular systematics. Cap 4.

BIOTIPOS DE *Penicillium nalgiovense* PREDOMINANTES EN EMBUTIDOS SECOS FERMENTADOS ARTESANALES DE LAS PRINCIPALES REGIONES PRODUCTORAS DE ARGENTINA

Vila Graciela, Pose Graciela, Segura Juan, Ludemann Vanesa
Departamento de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de Quilmes (UNQ) Roque Saenz Peña 352 Bernal (B1876XD)
E- mail: gvila@uolsinectis.com.ar

La presencia de diferentes biotipos Penicillium nalgiovense en la micoflora superficial de embutidos secos fermentados artesanales está determinada por las condiciones ambientales y climáticas del lugar de manufactura que influyen en la adaptabilidad y consecuente capacidad de colonización.

Objetivo:

El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar los principales biotipos de P. nalgiovense en embutidos secos fermentados artesanales provenientes de las principales regiones productoras del país: Tandil y Mercedes en la provincia de Buenos Aires, centro y norte de la provincia de La Pampa, Colonia Caroya y Oncativo en la provincia de Córdoba.

Materiales y Métodos:

A partir de setiembre del 2011 y hasta febrero del 2013 fueron analizadas 79 muestras: 30 de Colonia Caroya, 17 de Oncativo, 15 de Tandil, 9 de La Pampa y 8 de Mercedes

El aislamiento directo de hongos de crecimiento superficial se realizó sobre Agar Dicloran Glicerol 18% (DG18) y Agar Extracto de Malta (MEA). La identificación a nivel de género y especie fue realizada siguiendo el esquema propuesto por Pitt y Hocking (2009). Esto es, los cultivos fueron crecidos 7 días en CYA (Agar Czapek Extracto de levadura), MEA (Agar Extracto de Malta) y GN25 (Agar Glicerol Nitrato). Las placas de CYA se incubaron a 25, 37 y 5 ºC, mientras que las de MEA y GN25 fueron incubadas solo a 25ºC. Como medio adicional se usó Agar neutral Creatinina Sacarosa (CSN). Para determinar el biotipo de cada aislamiento se observó el tamaño de la colonia en MEA, el color y grado de formación de conidios en CYA y MEA, según Fink-Gremmels (1998).

Biotipos de *Penicillium nalgiovense* presentes en los aislamientos

Agar extracto de malta Colonias grandes (20- 26 mm)		Agar extracto de malta Colonias pequeñas (10-20 mm)		
Biotipo 1	**Biotipo 3**	**Biotipo 4**	**Biotipo 5**	**Biotipo 6**
CYA: turquesa MEA: verde	CYA: blanco MEA: blanco o azul pálido	CYA: turquesa MEA: verde	CYA: verde MEA: verde	CYA: blanco MEA: amarillento

Resultados

Sobre un total de 196 aislamientos, 144 pertenecieron al género Penicillium, de los cuales 108 correspondieron a la especie P. nalgiovense. La distribución fue la siguiente: Colonia Caroya 39,82%, Oncativo 23,15%, Tandil 14,81%, La Pampa 9,26%, Mercedes 12,96% (Figura N°1)

Los biotipos predominantes por región fueron: en Colonia Caroya , Oncativo y Tandil fueron los biotipos 4 y 6 . Por su parte, en La Pampa fueron los biotipos 1 , 3, 4 y 5 . En Mercedes fueron los biotipos 1 y 3 (Figura N°2 y 3)

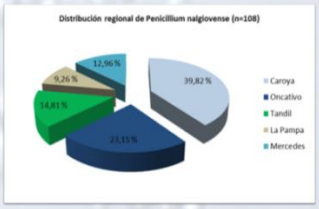
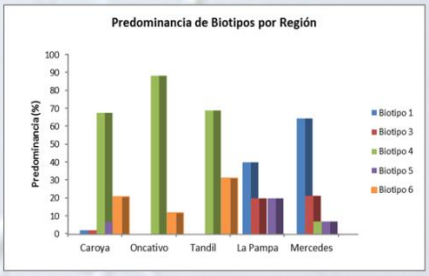


Figura N°1:Distibución por regiones de Penicillium nalgiovense

Región	Predominancia (%)						
	N°total de aislamientos	Biotipo 1	Biotipo 2	Biotipo 3	Biotipo 4	Biotipo 5	Biotipo 6
Caroya	57	2,33	-	2,33	67,44	6,97	20,93
Oncativo	51	-	-	-	88	-	12
Tandil	35				68,75		31,25
La Pampa	21	40	-	20	20	20	-
Mercedes	32	64,28		21,42	7,14	7,14	-

Figura N°2: Predominancia por regiones de los diferentes biotipos de *Penicillium nalgiovense*



FiguraN°3:Predominancia por regiones de los diferentes biotipos de Penicillium nalgiovense

Conclusión:

Se pudo observar que existen dos áreas bien definidas donde de acuerdo a las condiciones climáticas y ambientales los biotipos presentes en la micoflora superficial de los embutidos son marcadamente distintos: en la provincia de Córdoba y en Sudeste de la provincia Buenos Aires (de Clima Templado Serrano) predomina el Biotipo 4, mientras que noroeste de Buenos Aires y La Pampa (de clima Templado Pampeano Húmedo) predomina el Biotipo 1.

Referencias:

• Pitt, J.I.; Hocking, A.D. (2009). Fungi and food spoilage (3rd Edition). Blackie Academic & Professional, UK.

•Fink-Gremmels. (1988) Developing mould starters for meat products. Fleischwirtschaft. 68 (10): 1292-1294

Área: M
Póster N°19

Caracterización morfológica, bioquímica y molecular de las poblaciones fúngicas de embutidos secos fermentados de las principales regiones productoras de Argentina

Vila G., Pose G., Segura J., Ludemann V.
gvila@unq.edu.ar

La caracterización de las poblaciones fúngicas, entre las que predomina *Penicillium nalgiovense*, que se desarrollan sobre los embutidos artesanales elaborados en distintas regiones contribuye sumando un elemento al conjunto de factores locales que definen la tipicidad del producto.

Objetivo: utilizar marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares para caracterizar y confirmar la identidad de poblaciones de *Penicillium nalgiovense* presentes en la micoflora de embutidos secos artesanales de las principales zonas productoras de Argentina.

Materiales y Métodos: Se analizaron 79 muestras de las cuales se aislaron e identificaron las especies fúngicas presentes. Para los aislamientos de *P. nalgiovense* se identificaron biotipos. Se crecieron los micelios y fueron caracterizados bioquímicamente por perfil de isoenzimas: α-esterasas (α-EST), malato deshidrogenasa (MDH) y glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT). Molecularmente, se amplificó la región ITS con los primers ITS1 e ITS4. Los productos de amplificación fueron secuenciados y las secuencias analizadas por el método Clustal.

Resultados:
A partir de 196 aislamientes se determinó que la población fúngica estaba compuesta por 6 géneros, siendo el predominante *Penicillium*. Sobre un total de 108 aislamientes de *P. nalgiovense* se determinaron 5 biotipos en las regiones productoras. Morfológicamente el biotipo 4 predomina en Colonia Caroya, Oncativo y Tandil y el biotipo 1 predomina en Mercedes y La Pampa (Figura 1)

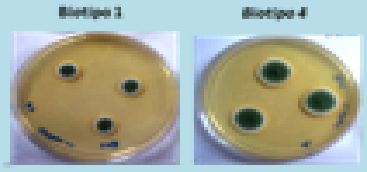
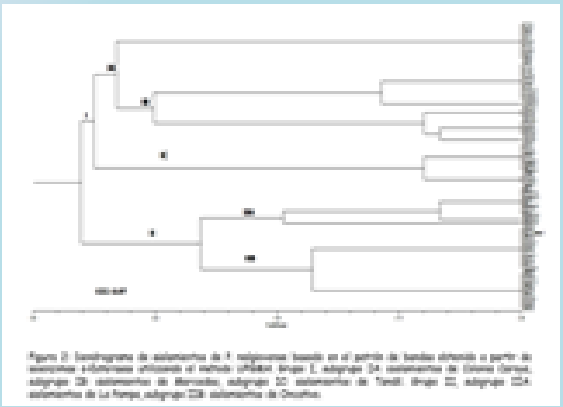
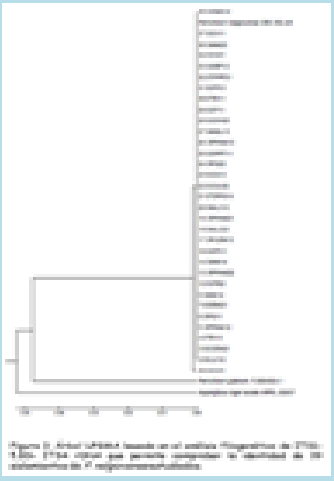


Fig 1: Biotipos de *P. nalgiovense* predominantes



Respecto a la caracterización bioquímica, α-EST dio por resultado un alto grado de polimorfismo que, en el análisis de agrupamientos, origina dos grupos: I: conformado por los aislamientos de Tandil, Mercedes y Colonia Caroya y II: conformado por los aislamientos de las localidades de La Pampa y Oncativo. (Figura 2). GOT y MDH no presentaron bandas polimórficas



Del análisis de secuencias, la identidad fue confirmada en el 99% de los aislamientes de *P. nalgiovense*. (Figura 3)

Conclusión:
El análisis morfológico de los aislamientes de *P. nalgiovense* confirma la existencia de diferencias fenotípicas a nivel de biotipos según la región de estudio probablemente como resultado de adaptaciones ambientales. Los marcadores bioquímicos indican polimorfismo en la composición isoenzimática de esterasas a nivel regional constituyendo herramientas para la caracterización de las poblaciones fúngicas del emplume de embutidos secos fermentados de nuestro país.