

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, provincia de Córdoba, República Argentina, para optar el título de Microbióloga.

DIRECTORA:

Dra. Cecilia Frigerio

CO-DIRECTORA:

Dra. Susana Bettera

JURADO:

Dra. Cecilia Frigerio

Dra. Cristina Bogni

MSc. Mirta Lasagno

Río Cuarto, 02 de Octubre de 2008

Gracias

A Dios Por iluminar mi vida todos los días y por permitirme haber llegado a cumplir mi meta.

A Nuestra Señora de “La Consolata” Por que con su infinito amor de madre me bendijo en los momentos difíciles.

Al “Cristo de la Quebrada” Por la inmensa paz que me brinda estando en mi corazón.

A mi familia Por la paciencia y apoyo incondicional.

A Javier, mi amor Por escucharme, aconsejarme; por ayudarme a cumplir mis sueños aumentando mi confianza y por ser mi incondicional compañero de vida.

Silvana Amiga incondicional Por acompañarme, alentarme y darme fuerzas en los difíciles primeros pasos de la carrera.

A Cecilia y Susana Por permitirme realizar mi tesina en su lugar de trabajo, que para mí fue no sólo el lugar dónde puse en práctica los conocimientos adquiridos, sino que me permitieron conocer a dos personas que aman lo que hacen y diariamente lo transmiten en el esfuerzo y empeño con el que enseñan. Sin dejar de mencionar su incansable vocación de formar no sólo buenos profesionales sino también buenas personas.

A Dani, Lauri y Colo (El equipo de laboratorio) Un excelente grupo que tubo constancia, paciencia de explicar y además de responder más de una vez al llamado de ayuda.

A Alfonsina y Cristian Mis compañeros de laboratorio que con sus ocurrencias hacían que el tiempo que compartíamos sea llevadero y ameno.

A UNRC Por permitirme Creer Crear y Crecer libremente.

De corazón muchas gracias a todos.

Índice

	<i>pág.</i>
INTRODUCCIÓN	
Un poco de Historia	3
Inicio y desarrollo del cultivo en Argentina	3
Producción actual en Argentina	4
Consumo Mundial de Soja	6
Algunos usos y aplicaciones de la soja	6
Características de la semilla de soja	7
Equivalencias en cuanto a proteínas	8
Composición por cada 100 gramos	8
Tipos de harina de soja	9
Calidad de la harina de soja	9
Definición de la Harina de soja según el C.A.A.	10
Proceso de elaboración de la harina de soja	12
Recepción y almacenaje de granos	12
Limpieza de semillas	14
Pesaje	14
Rotura de semilla	15
Acondicionamiento térmico de las láminas	16
Extracción de aceite por solvente	17
Desolventización del lex	18
Tostado de la harina	19
Secado enfriado de la harina	19
Ciclón de finos	19
Sistema de gestión y aseguramiento de la calidad	20
Características del género <i>Salmonella</i>	21
Patogénesis	21
Síndromes por <i>Salmonella</i>	22
Manifestaciones Clínicas	23
Diagnóstico	24

Trabajo Final

Medidas de control	24
Características bioquímicas de familia y género	25
HIPÓTESIS	
Objetivos Generales	26
Objetivos Específicos	26
MATERIALES Y MÉTODOS	
Antecedentes	27
Muestreo	28
Metodología para el aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i>	29
Pruebas bioquímicas de las colonias sospechosas	31
Confirmación serológica	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Figura 13: Aislamiento de <i>Salmonella</i> por etapas	37
Figura 14: Porcentajes de muestras positivas y negativas para <i>Salmonella</i>	38
Tabla 3: Lugares del muestreo que se encontró <i>Salmonella</i>	40
Figura 15: Porcentaje de muestras positivas (6,72) distribuidos en cada uno de los puntos muestreados	41
Tabla 4: Aplicación de los desinfectantes y resultados obtenidos	43
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFÍA	46

UN POCO DE HISTORIA

“LA SUPREMA LEGUMBRE”

Tres mil años o más hacia atrás de nuestra historia respaldan a la soja como el cultivo más antiguo. Aparece en las leyendas y la mitología de oriente, especialmente Japón y China cuando luego de una guerra entre ellos surge el nacimiento de los cinco granos sagrados: soja, cebada, arroz, mijo y avena. Los que han sido y son el alimento primordial de esos pueblos, con una premisa “si cultivas soja tendrás: carne, leche, queso, pan y aceite”. Curiosamente en nuestros días y con el apoyo de los descubrimientos científicos se corrobora esto, dado que la soja posee proteínas, hidratos de carbono y grasas (los tres macro nutrientes indispensables), vitaminas y minerales de modo que se puede considerar apta para una alimentación de supervivencia, o sea casi completa.

“Glycine max” es el nombre científico de esta planta que recorrió un largo camino de oriente a occidente, donde se sembró como una curiosidad, luego en forma experimental y a éstas nuevas tierras se dice que llegó por casualidad como lastre en los barcos.

A partir de 1804 las plantaciones de soja comenzaron a aparecer aquí y allá incrementándose poco a poco la producción, haciéndose cada vez mayor y desde 1930 ya masivamente sembrada como cultivo de alto rendimiento económico, la soja es por lejos el cultivo que más dividendos deja. En nuestros días EEUU es el primer productor mundial y le siguen Brasil y Argentina (17).

INICIO Y DESARROLLO DEL CULTIVO EN ARGENTINA

Las primeras plantaciones de soja en Argentina se hicieron en 1862, pero no encontraron eco los productores agrícolas de aquellos años. En 1925, el Ministro de Agricultura Le Bretón, introdujo nuevas semillas de soja de Europa y trató de difundir el cultivo.

Hacia 1956 en Argentina no se conocían aún los aspectos básicos de la soja como cultivo. Los fracasos en la implantación hicieron que fuese considerada para esa época como un cultivo “tabú”. La primera vez que Argentina exportó soja fue el 5 de julio de 1962, a través del buque “Alabama”, que partió llevando en su interior 6000 toneladas con destino a Hamburgo (Alemania). La producción se incrementó notoriamente en los años 70

Trabajo Final

hasta alcanzar en la actualidad más de 6.000.000 de hectáreas cosechadas con una producción de más de 11.000.000 de toneladas, convirtiendo a la Argentina en el tercer productor mundial de grano, el primer exportador mundial de aceite de soja y el segundo de harina de soja. No debe sorprender entonces que la soja represente en la actualidad el rubro de mayor incidencia en el Producto Bruto Agropecuario del país y el mayor generador de divisas y conflictos (13).

PRODUCCIÓN ACTUAL EN ARGENTINA

Actualmente el cultivo de soja ocupa una amplia zona ecológica que se extiende principalmente en la Región Pampeana, con cerca del 94% de la superficie sembrada y el 95 % de la producción total del país. Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires representan las provincias de dicha región con mayor producción por área sembrada y magnitud de rendimientos, en la figura 1 se muestra la producción de soja en Argentina.

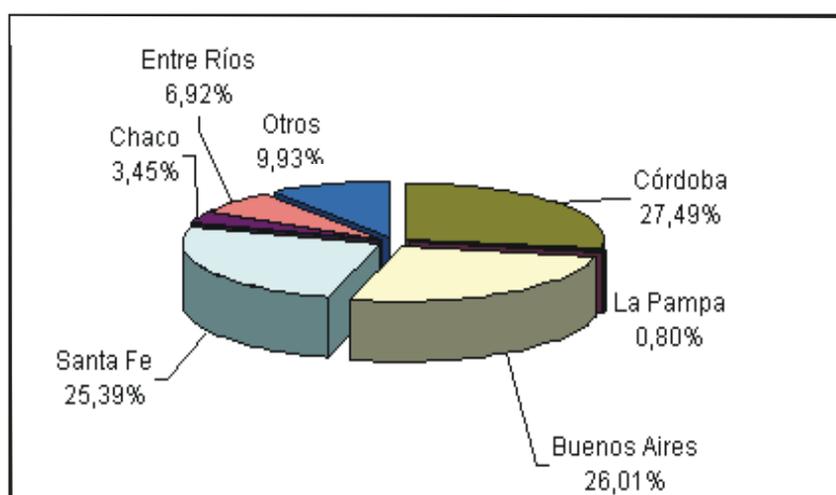


Figura 1: Producción de soja en Argentina

En la presente campaña, de Abril de 2008 la superficie bajo cultivo superó a la anterior en un 2,8 %, con una cobertura estimada en 16.600.000 hectáreas, con esta cifra se alcanzará un nuevo récord histórico en la superficie sembrada con esta oleaginosa.

Los cultivos se desarrollaron satisfactoriamente en el noroeste de Bs. As, norte de La Pampa, gran parte de Córdoba y el centro-sur de Santa Fe.

La cosecha está transcurriendo con buenos rendimientos en Santa Fe, con cifras de 36 a 39qq/ha en el sur provincial, algo menores en el centro (32qq/ha) y disminuyendo abruptamente hacia el norte provincial, debido a la sequía soportada.

Trabajo Final

En la provincia de Córdoba, en la zona de San Francisco los rendimientos se ubican en los 25qq/ha; a medida que se avanza hacia el sur cordobés los mismos se elevan, debido a las oportunas lluvias recibidas, que permiten a la zona de Río Cuarto cosechas con rindes cercanos a 30qq/ha, que aumentan hacia el este (Marcos Juárez) con promedios de 36qq/ha.

En el norte bonaerense, en la zona cercana a la ciudad de Junín los rendimientos son de 40qq/ha, en Pergamino y Lincoln de 34qq/ha.

De continuar las productividades en los niveles actuales y las demás condiciones del clima en forma benigna, se puede pronosticar una producción de 47,2 millones de toneladas, en la figura 2 se muestran las zonas de Argentina donde se cultiva soja (24).

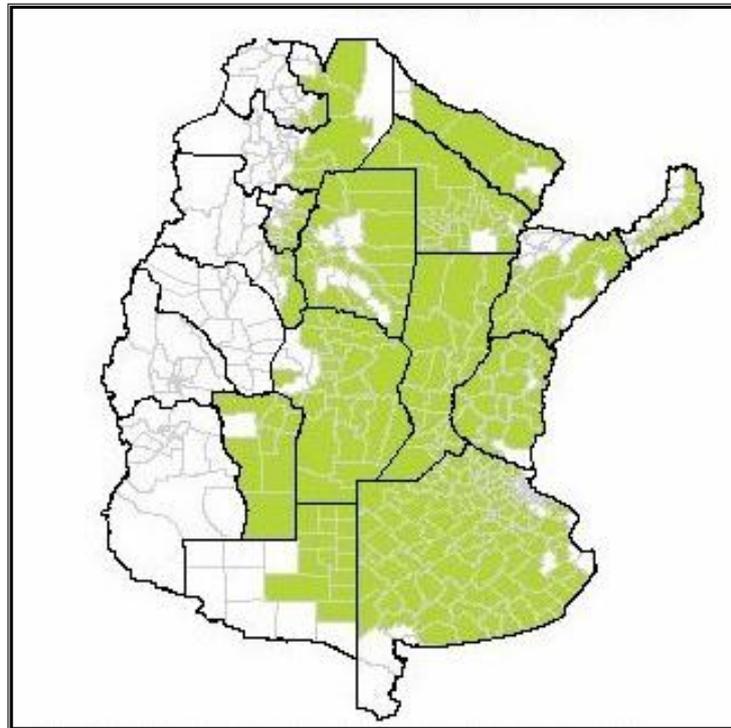


Figura 2: Zonas de Argentina donde se cultiva soja

CONSUMO MUNDIAL DE SOJA

El análisis del consumo mundial de soja indica que se produjo un aumento del mismo de 57,1 millones de toneladas (ton), pasando de 162,87 a 220 millones de ton. Y

Trabajo Final

aquí aparece el principal dato, China ha sido el principal país consumidor y comprador de poroto de soja con 21,4 millones de ton consumidas durante la campaña 2000/01, volumen equivalente al 13% del consumo mundial (162,87 mill. ton). Con 48,7 millones de ton de consumo para el 2006/07, equivalente al 22% del consumo mundial, China es hoy el principal país demandante de soja del mundo.

En el lapso de apenas 7 años China duplicó (128%) su consumo de poroto de soja (o su equivalente convertido en aceite y harina de soja). Como consecuencia del aumento de su consumo de este país se ha visto obligado a aumentar sus importaciones de poroto de soja en casi el 450 %. En efecto, China importaba en el 2001 por un volumen total de 5,75 millones de ton de soja poroto, mientras que para la campaña 2006/07 los chinos importaron 31,5 millones de ton. Por el contrario el volumen de las importaciones de poroto de soja por parte de la U.E. se ha reducido en el periodo en 2,15 millones ton pasando de 16,33 mill. ton en el 2000/01 a 14,18 millones de ton para el 2006/07. La Unión Europea (U.E.) cobra mucha mas relevancia en la demanda mundial de harina que de poroto de soja. El caso contrario se da en China, que cobra mucho más importancia como importador de poroto de soja y de aceite de soja, no así de harina de soja.

En Argentina, el 95 % de la soja es transgénica, forrajera y su principal destino es alimentar ganado vacuno, porcino y avícola. Como así también la producción de aceites industriales (24).

ALGUNOS USOS Y APLICACIONES DE LA SOJA

ACEITE DE SOJA REFINADO.

Usos comestibles: Margarina, mayonesa, productos medicinales farmacéuticos, aceite de cocina, crema para café, etc.

Usos técnicos: Agentes anticorrosivos, combustibles ecológicos, desinfectantes, aislamientos eléctricos, pinturas, fungicidas y pesticidas, champúes, detergentes, masilla, epoxis, etc.

LECITINA DE SOJA

Usos comestibles: Agentes emulsionantes, productos para panificación, revestimiento para dulces y chocolates, productos farmacéuticos, etc.

Trabajo Final

Usos técnicos: Agentes antiespumantes, antidispersantes, pigmentos para pinturas, pinturas y tintas, cosméticos, caucho, margarina, etc.

PRODUCTOS INTEGRALES

Golosinas, confituras, leche de soja, alimento para ganado, pan, dulces, postres, galletitas, productos dietéticos, entre otros.

PRODUCTOS PROTEICOS

Usos comestibles: Pastas, comidas infantiles, cervezas, ingredientes para panificación, productos dietéticos, “leche hipoalergénica,” cubiertas de salchichas, levadura, etc.

Usos técnicos: Pegamentos, reactivos para análisis de laboratorio, emulsiones asfálticas, pintura base agua, plásticos, pesticidas, funguicidas, textiles, productos de limpieza, etc.

HARINA DE SOJA

Uso en alimentos balanceados para animales.

CÁSCARA

Alimentos balanceados para ganado lechero, material para filtros, pan integral (17).

CARACTERÍSTICAS DE LA SEMILLA DE SOJA

El poroto de soja aporta principalmente proteínas y aceite. Las variedades que se cultivan en Argentina, tienen un contenido medio de proteína de alto valor biológico con un 40% equivalente en materia seca. En este sentido el cultivo de soja es productor de proteínas; el aceite es un subproducto. Las proteínas se hallan bien equilibradas en materia de composición de aminoácidos esenciales; en la soja por tratarse de una leguminosa, las proteínas son más ricas en lisina y triptófano en comparación con otros cereales (18).

EQUIVALENCIAS EN CUANTO A PROTEÍNAS

Trabajo Final

Si comparamos (Tabla1) un kilo de cualquier alimento común, veremos que la soja contiene más proteínas (18).

Tabla 1: comparación proteica de la soja con otros alimentos.

<p>La cantidad de proteínas en 1Kg es igual a:</p>	<p>2Kg de carne vacuna</p> <p>5Kg de arroz</p> <p>3Kg de porotos comunes</p> <p>5 docenas de huevos</p> <p>11 litros de leche</p>
--	--

COMPOSICIÓN POR CADA 100 GRAMOS DE POROTOS DE SOJA

Agua 7,00 gr.	Vitamina A 95.00 UI.
Energía 453 Kcal.	Vitamina E 13,30 mg.
Grasas 23,50 gr.	Vitamina K 190,00 mg.
Proteínas 36,89 gr.	Vitamina B2 0,30 mg.
Carbohidratos 23,50 mg.	Vitamina B3 2,50 mg.
Fibra 11,90 mg.	Vitamina B1 1,00 mg.
Calcio 260,00 mg.	Magnesio 250,00 mg.
Sodio 4,00 mg.	Fósforo 590,00 mg.
Hierro 8,60 mg.	Potasio 1750,00 mg.
Cobre 110,00 mg.	Selenio 60,00 mg.
Manganeso 2800 mg.	Ácido fólico 94,00 mg.
Yodo 6,00 mg.	Flúor 0,36 mg.
Zinc 1000 mg. (21)	

TIPOS DE HARINA DE SOJA

Trabajo Final

Comúnmente la harina de soja se describe sobre la base de su contenido graso. La harina rica en grasa se obtiene de granos sin tratar; la harina pobre en grasa se logra con la harina tratada a la cual se le extrajo el aceite por extrusión y la harina de soja desgrasada, se obtiene de harina extraída con solventes. En el primer caso se trata simplemente de grano molido no apto para su consumo tal cual (requiere cocción y tratamiento), tiene la desventaja de no poder ser aprovechado tal cual se cosecha dado que contiene alta actividad ureásica y anti-tripsina. Ésta enzima anula la absorción proteica tanto en el organismo humano como en el animal.

Partiendo de esta base, complejos estudios demostraron los beneficios que proporciona tratar al poroto de soja con calor controlado y durante un tiempo predeterminado.

La tripsina es una enzima segregada en el organismo, que permite la absorción de las proteínas. La anti-tripsina contenida en el poroto crudo es una enzima inhibitoria de la tripsina.

El tratamiento con calor (tostado) tiene la ventaja de destruir al factor anti-tripsina e inhibir la actividad ureásica del mismo.

La actividad ureásica del poroto de soja, además de provocar un sabor ácido, se presenta como un indicador de la existencia del factor anti-tripsina. Según estándares óptimos esta actividad ureásica del poroto tratado debe oscilar alrededor de 0.2 unidades de pH (6).

CALIDAD DE LA HARINA DE SOJA

La harina de soja es la fuente de proteínas, de mayor calidad y menor variabilidad en dietas de cerdos y pollos. Aún así puede existir variabilidad en cuanto a la cantidad y calidad de los nutrientes entre distintas muestras y fuentes de la harina de este cereal. Esto se debe a diferencias en las variedades de soja, condiciones de crecimiento, de almacenaje y a variaciones en el procesado.

Mantener la calidad de la harina de soja es importante por diferentes motivos:

Económicos: Con harina de soja de alta calidad se obtienen más nutrientes por el mismo costo.

Productivos: La harina de soja de alta calidad permite obtener mayores crecimientos, mejores índices de conversión del pienso y una mayor producción de huevos.

Trabajo Final

Rentabilidad: Mejor productividad se traduce en un menor costo por unidad y en mejores ganancias y beneficios.

La harina de soja con alto contenido en proteínas (47,5 a 48,5%) generalmente es la fuente más económica de nutrientes. Se separa la cascarilla de la harina de soja, de esta forma se obtiene harina de alto contenido proteico, dado que la cascarilla tiene poca proteína y es de baja digestibilidad. Se necesita comprar una mayor cantidad de harina con menor contenido proteico para obtener la misma cantidad de nutrientes digeribles. Esto supone un mayor costo para la harina con menor contenido proteico, sin embargo ésta puede ser utilizada para dietas que requieren menor densidad de nutrientes, tales como piensos para cerdos y pollos reproductores (29).

DEFINICIÓN DE HARINA DE SOJA SEGÚN EL C.A.A.

"Harinas Proteínicas de origen vegetal: son los productos de la molienda de semillas limpias, sanas, enteras, parcial o totalmente decorticadas, previstas en el Código Alimentario Argentino, que han sido sometidas o no a procesos de remoción parcial o prácticamente total del aceite que contienen".

Su granulometría responderá a valores establecidos para cada caso en el Código; Harina de Soja o Soya es la obtenida a partir de semillas de Glycine Max (L) Merrill. Los diversos tipos de harina de soja que se consideran responderán a las siguientes características, detalladas en la Tabla 2.

Tabla 2: Contenido nutricional de la harina de soja

	Con toda la grasa %	Con poca grasa %	Desgrasado %
Humedad (100 °C-105 °C)	9	9	9
Proteínas (N x 6,25)	35	45	50
Grasas (Estr. etéreo)	18	4,5-9	Máx.2
Fibras cruda Máx.	3,0	3,3	3,5
Cenizas (500 °C-550 °C)	5,5	6,5	6,5

Granulometría

El 95 por ciento debe pasar por tamiz de 149 micrones.

Trabajo Final

Las harinas pueden someterse o no a un tostado durante el procesamiento.

Las harinas tostadas deberán cumplir los siguientes requisitos:

Valor nutritivo

Lisina disponible mín. 5g/16g N

PER (Relación Eficiencia Proteínica) mín. 2,0

UPN (Utilización Proteínica Neta) mín. 60,0

Actividad ureásica (AOCS. BA. 9-58) máx. 0,30

Inocuidad:

Agentes patógenos entéricos:

Aflatoxinas, inferior a 0,03 mg/g

Clostridium perfringens máx. 100/g

Paracolons, negativo/50/g

Salmonella, negativo/50/g

Staphylococcus, negativo/g

Streptococcus faecalis, negativo/g

Coliformes, negativo

Esporas, máx. 10/10/g

Levaduras y Mohos, máx. 50/g

Termofílicas (Est. Am.Nat.Ass.), máx. 1.500/g

Recuento bacteriano total, máx. 20.000/g

Las harinas de soja no tostadas podrán ser usadas con fines industriales, siempre que los procesos a que se someten con posterioridad aseguren una efectiva inactivación de los factores nutritivos y microbiológicos (5).

PROCESO DE ELABORACIÓN DE HARINA DE SOJA

Trabajo Final

El grano de soja sufre numerosos procesos desde que ingresa a la planta elaboradora hasta lograr obtener harina como producto final. Las etapas de elaboración se detallan a continuación:

RECEPCIÓN Y ALMACENAJE DE GRANOS

Después de la cosecha, las condiciones de almacenaje pueden tener diferentes efectos en la calidad final del grano. Los diversos factores que pueden afectar adversamente el almacenaje de la semilla son la humedad, la temperatura, hongos y bacterias.

Se considera que los granos almacenados constituyen un ecosistema más o menos cerrado (medianamente aislado del exterior), en los que se encuentran componentes vivos como los granos, microflora, y las plagas, que normalmente acompañan a esta mercadería.

La mayor parte de los insectos desarrollan entre temperaturas de 16-35 °C, los hongos desarrollan en óptimas condiciones a 25 °C, cuando éstos se encuentran en alto porcentaje generan autocalentamiento por respiración, el calentamiento intenso incrementa el contenido de ácidos grasos libres, daña el color y la calidad del aceite y harina a producir; además en porotos dañados y almacenados por mas de 6 meses, el contenido de inhibidor de tripsina aumenta.

La disminución de la tasa de germinación es un indicador preciso para poner en evidencia todo el daño que sufre un grano; es por eso que deben almacenarse a T° y humedad adecuadas, para lograr obtener granos con temperatura interna menor a 20 °C, y con una humedad menor al 20%, de esta manera pueden mantenerse sin alteraciones por períodos prolongados (aproximadamente 1 año). Gráficamente puede explicarse como, “La zona de almacenamiento seguro” Figura 3 (10).

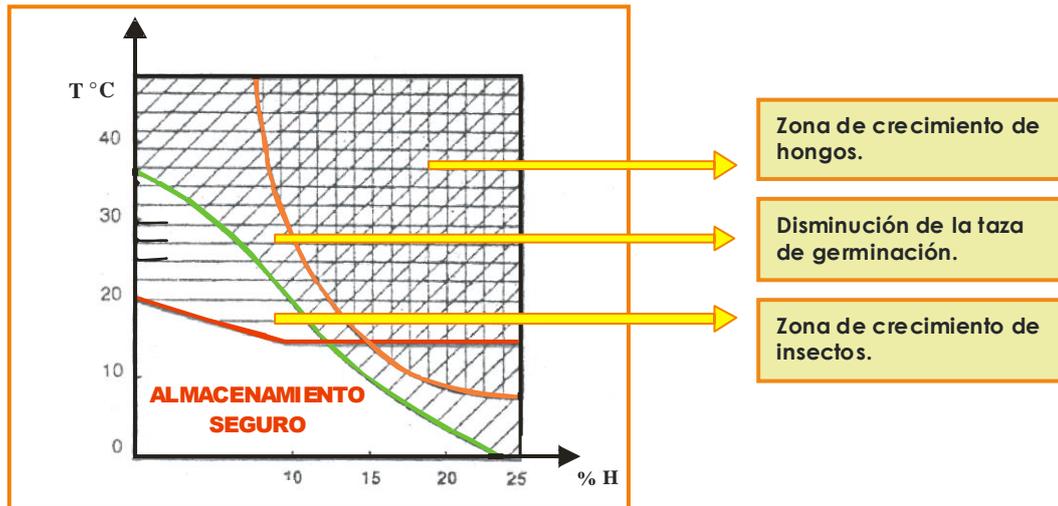


Figura 3 Zona de almacenamiento seguro del grano de soja.

Los granos se almacenan en silos, éstos deben poseer sensores de temperatura, humedad y alarma. El material de construcción puede ser de chapa, acero inoxidable o de hormigón, y pueden tener diseño vertical u horizontal. Sin importar el material de construcción las estructuras de almacenaje deben ser tan resistentes al clima como sea posible.

Otro factor importante es la condensación que puede ocurrir dentro de los silos, cada vez que exista un diferencial de temperatura (T°) entre los granos almacenados y las paredes del silo; para ello es que existen los sistemas de aireación, que ayudan a reducir la T° del aire en el silo y por ende minimizan la condensación, usualmente se realiza haciendo fluir aire desde el tope del silo al piso por varias horas, hasta que se establezca un equilibrio entre la humedad de la semilla y la del aire. Cuando un silo no es provisto de adecuada aireación, las semillas pueden fermentar y causar un serio incremento en la T° y daño por calentamiento; cuando sube por encima de los 60°C las semillas pueden autocombustionar. Sin duda la inspección periódica de la mercadería de los depósitos es una exigencia ineludible para el éxito de la conservación; en base a las novedades habrá que tomar las medidas correctivas del caso (9, 4).

La inspección puede consistir en la medición de T° , complementado con extracción de muestras para su posterior análisis. Efectuada la aireación de mantenimiento, se procede al secado de granos.

Este proceso debe llevarse a cabo a una T° y velocidad de extracción de agua determinada, para evitar la ruptura del grano de soja. Culminado el secado se procede a preparar la semilla para la obtención simultánea de dos productos: aceite y harina de soja

Trabajo Final

(factor de interés) por medio de extracción directa por solvente, tal como se muestra en la figura 4 (28).

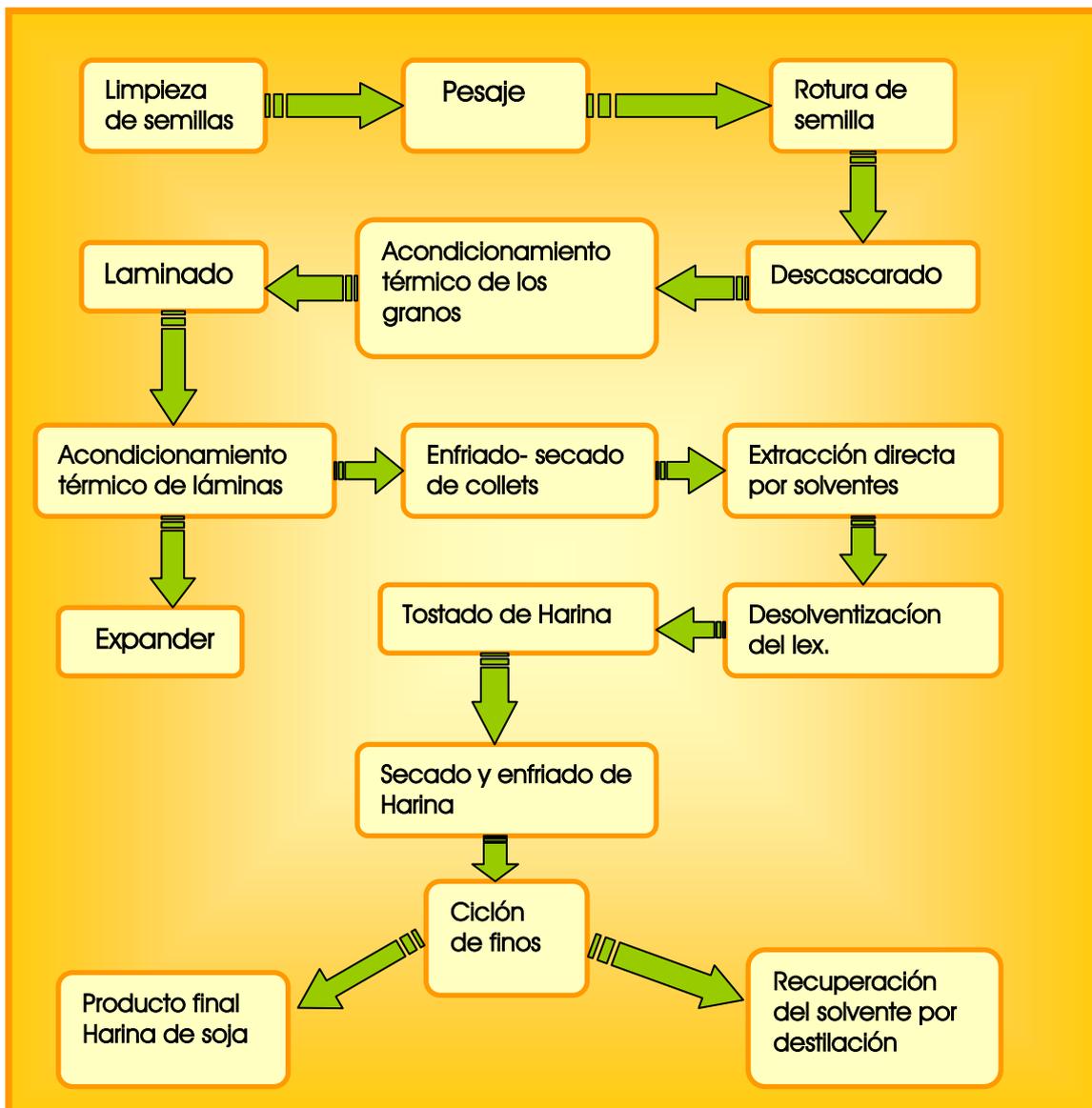


Figura 4: Diagrama de operaciones para la obtención de harina de soja.

LIMPIEZA DE SEMILLAS

Se efectúa para eliminar impurezas vegetales, minerales y metálicas mediante técnicas de tamizado, aspiración y separación magnética.

PESAJE

Para regular y controlar la capacidad de la planta.

ROTURA DE SEMILLA

Triturado o molienda, se realiza para reducir las semillas a trozos de 1/4 a 1/6 del tamaño de la semilla entera y adaptarlas a las condiciones de ingreso de los molinos laminadores.

DESCASCARADO

Se efectúa cuando quiere elaborarse harina de alto contenido proteico; al extraer las cáscaras se elimina fibra, y por lo tanto se concentra la proteína en un 48% aproximadamente, contra un 44% de proteína, obtenido sin descascarar. Para ello se separan las cáscaras de las pepas por medio de aspiración o tamización.

ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO

Los granos se calientan a 65 °C, en hornos de cocción, para acondicionarlos para la próxima etapa (laminado), y obtener allí láminas estables con bajo contenido de finos.

LAMINADO

Se realiza con el objeto de romper las células oleíferas y permitir la obtención de aceite. El mecanismo de laminado es por medio de rodillos laminadores, y por medio del mismo se convierte un trozo de material relativamente granular, en una lamina delgada, esta tendrá de 4 a 6 veces la superficie del grano original. La relación superficie / volumen aumenta, por ende incrementa el área expuesta al acondicionamiento y lavado con solvente. La figura 5 muestra la variación en la relación superficie / volumen que sufre un grano de soja, posterior al proceso de laminado (7, 11).

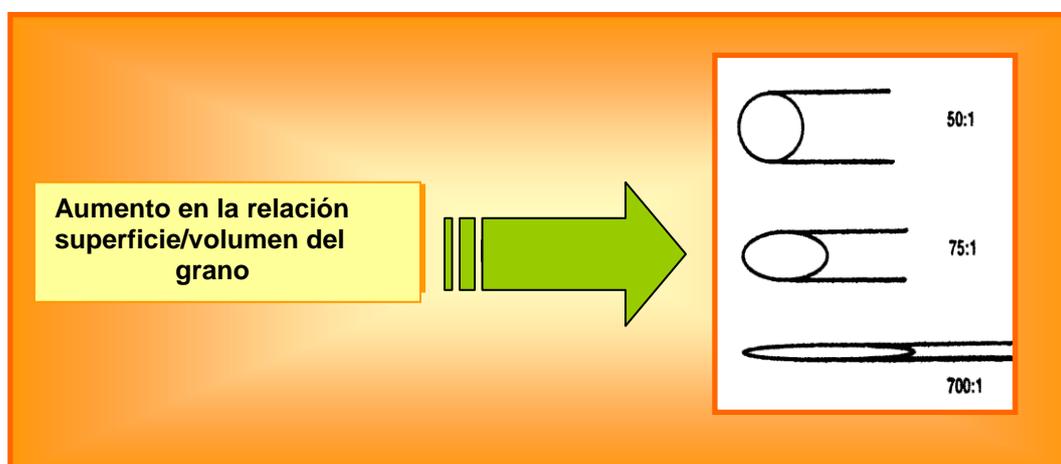


Figura 5 Variación en la relación superficie volumen del grano de soja.

ACONDICIONAMIENTO TÉRMICO DE LAS LÁMINAS

Se realiza para inactivar enzimas, lipooxigenasas, que provocan la oxidación de fosfolípidos y para neutralizar todo producto generado a partir de ellas; se lleva a cabo aplicando vapor sobre las láminas de soja. Otra ventaja que proporciona el acondicionamiento es la disminución de aceite residual en la harina extraída (15).

EXPANDER

El mecanismo de acción es el siguiente: Las láminas de soja ingresan al expander, durante su transporte son trituradas y se les inyecta vapor directo, aumentando la temperatura y la presión dentro del cilindro. Por medio de este procedimiento se rompen las células oleíferas, se aglomera el producto y se logra expandir (inflar) el material a medida que sale de la matriz generando los collets. Estos poseen numerosas ventajas (en relación a trabajar con láminas sin expandir) a la hora de efectuar la extracción directa con solvente, las mismas son: mayor densidad, mayor porosidad, mayor homogeneidad del material.

El incremento de la porosidad ocasiona que el solvente y el aceite escurran mejor, obteniéndose así una harina con menor contenido residual de estos componentes. (En la figura 6 se muestran los componentes de un expander) (15).

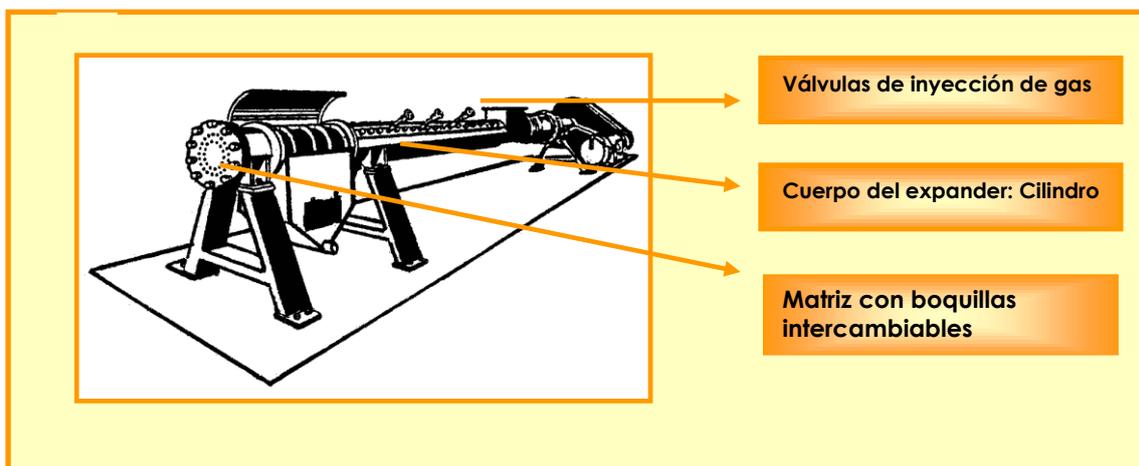


Figura 6: Componentes de un expander

ENFRIADO - SECADO DE COLLETS:

Los collets salen del extrusor con una temperatura aproximada de 85-115 °C; para poder ingresar al extractor con solvente éstos se enfrían a 60 °C y se los seca hasta lograr una humedad final del 10% (16).

Trabajo Final

EXTRACCIÓN DIRECTA DE ACEITE POR SOLVENTE (PROCESO DE SEPARACIÓN ACEITE/ HARINA)

Definiciones básicas:

Micela: mezcla de solvente y aceite que se forma luego de que el solvente a entrado en contacto con el lecho y a comenzado ha extraer aceite.

Lecho: es la capa de collets en el extractor.

Lex: material que sale del extractor, antes de su ingreso al desolventizador (harina + solvente).

Harina: material que se obtiene a la salida del desolventizador (harina sin solvente).

Finos: es el polvillo que acompaña a la harina.

Teoría de la extracción: El grano de soja es una semilla con bajo contenido de aceite (18-20%), si la comparamos con girasol que contiene un 40-45% de aceite. Debido a esta característica se extrae directamente el aceite en el proceso de extracción por solvente, sin un prensado previo. En la figura 7 se muestra el sistema de extracción completa (3).

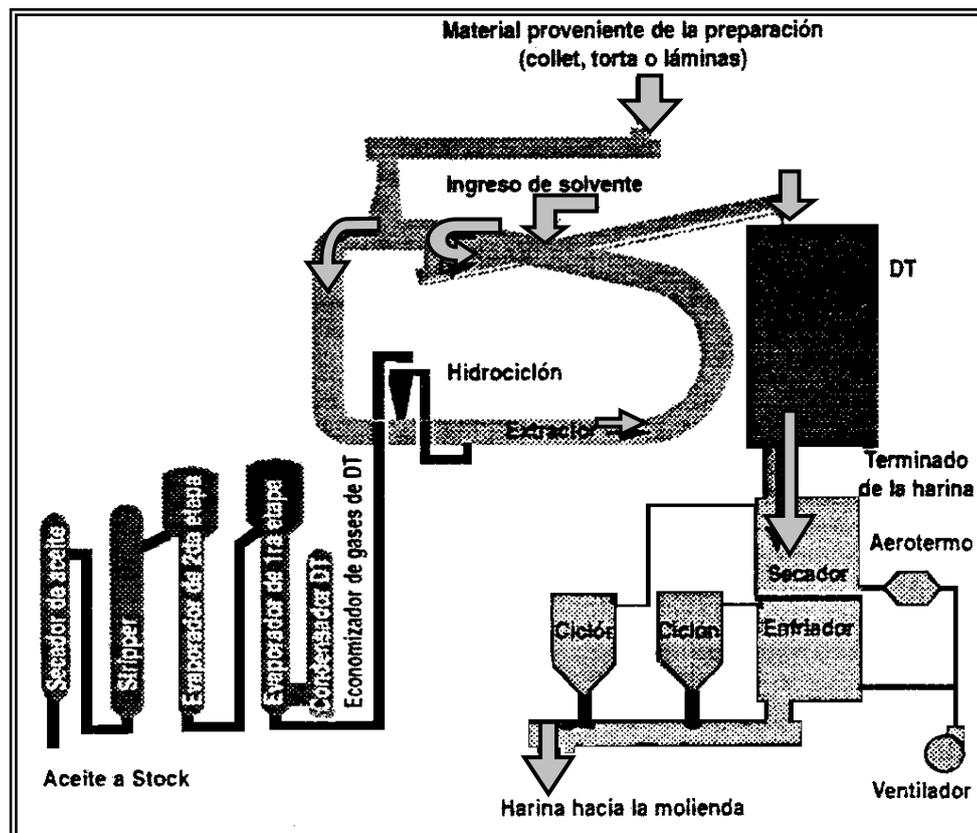


Figura 7: sistema completo de extracción

Trabajo Final

Una vez que los collets han sido enfriados y secados se dirigen al extractor, donde se extraerá el aceite por medio de hexano (solvente), una vez allí se genera un lecho de material, que circula en el extractor a contracorriente de solvente, el solvente o la micela disuelven y quitan el aceite del lecho. A medida que el material fluye, se lava con concentraciones mas bajas de aceite en hexano, y finalmente se lava con hexano puro. Posteriormente se deja que drene el lecho tan lentamente como sea posible, tal como lo muestra la figura 8 (3).

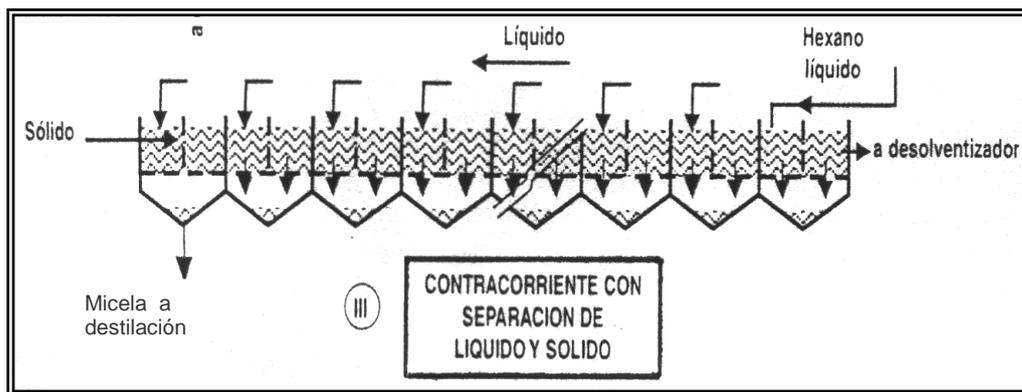


Figura 8: Sistema de drenaje con separación de líquido y sólido

DESOLVENTIZACIÓN DEL LEX

A continuación el lex obtenido después del drenaje, se dirige al desolventizador-tostador (DT), este recibe el material con 25-35% de solvente, aproximadamente. El mismo debe ser recuperado para su reutilización y para evitar riesgo de incendio en la harina.

Una vez evaporado el solvente, la harina sale del desolventizador con una humedad del 20%, y una temperatura aproximada de 100 °C. El esquema básico y funcional de un desolventizador tostador, se presenta en la figura 9 (3).

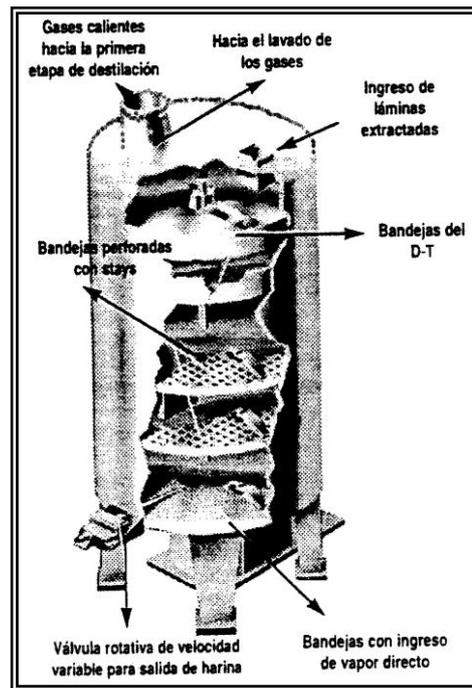


Figura 9: Esquema de un desolventizador / tostador.

TOSTADO DE HARINA

La harina de soja requiere tostado para inactivar los factores antinutritivos y producirla con las características nutricionales adecuadas. La cantidad de tostado generalmente se mide como “actividad de la ureasa” por medio del pH. Esta medida sirve como un indicador de destrucción del factor anti- nutritivo (3).

SECADO-ENFRIADO DE LA HARINA

Posterior al tostado de la harina se realiza el secado, este proceso se efectúa para reducir la humedad que ésta posee de 20% a un valor aproximado de 13.5%.

El enfriador es un equipo que se mantiene a bajas temperaturas usando agua, y además posee un aspirador de aire del medio ambiente, el mismo circula a contracorriente respecto al flujo de harina; aquí la harina se enfría a 10 °C sobre la temperatura ambiente (14).

CICLÓN DE FINOS

El ciclón de finos se encuentra a posterior del enfriador de harina, la función del mismo es recuperar las partículas más livianas (finos) que va arrastrando el aire exógeno a medida que va enfriando la harina, y evitar que sean liberados al medio ambiente. Los

Trabajo Final

finos recuperados se envían nuevamente al proceso para que conformen el producto final (3).

SISTEMA DE GESTIÓN Y ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD

Debido que la harina de soja se destina principalmente a la elaboración de alimentos balanceados para animales, es que se ha hecho hincapié en la seguridad, trabajando con un enfoque preventivo implementando sistemas de gestión de calidad, como Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), y Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP), tendientes a que la calidad de los alimentos proteja la seguridad del animal (Salud Animal) y del ser humano como consumidor de la producción animal (Salud Pública).

Las BPM, constituyen un conjunto de criterios generales de higiene y correctas prácticas y procedimientos para la manufactura de alimentos, con el fin de que aplicándolas a cualquier proceso de elaboración, se logre un producto seguro y saludable para el consumidor; no obstante es necesario actualizar las BPM para evitar su obsolescencia. Las BPM constituyen la base obligatoria para la implementación del sistema HACCP. Este sistema, es una herramienta que se utiliza para garantizar la inocuidad de los alimentos en todas las fases de su elaboración y manipulación.

En resumen este sistema se basa en 7 principios:

- 1. Identificar peligros y evaluar sus riesgos.**
- 2. Determinar puntos críticos de control.**
- 3. Formular criterios para garantizar el control.**
- 4. Vigilar los puntos críticos de control.**
- 5. Adoptar medidas correctivas cuando la vigilancia revele que no se satisfacen los criterios.**
- 6. Comprobar que el sistema funcione según lo previsto.**
- 7. Establecer un sistema de registros que documenten el sistema HACCP.**

Con este sistema las plantas identifican puntos críticos de control en los cuales pueden existir peligros durante sus procesos, establecen controles para evitar o reducir esos peligros y mantienen registros que documentan que los controles funcionan según lo planeado (23).

CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Salmonella*

Salmonella es un género perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Los miembros de ésta familia se caracterizan por ser: Bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, las formas móviles tienen flagelos peritricos, pero existen algunas especies que no lo son como *S. pullorum* y *S. gallinarum*.

Posee antígenos somáticos, flagelares, y algunos serovares presentan un antígeno capsular denominado (Vi).

El antígeno somático (O) es de naturaleza lipopolisacárida termoestable, localizado en la pared celular, que está asociada con la endotoxina y permite la división de *Salmonella* en grupos.

El antígeno flagelar (H) es termolábil de naturaleza proteica y permite la división de las especies en monofásicas (siempre poseen el mismo antígeno flagelar y reaccionan con sueros homólogos) o difásicas (fase 1 y fase 2, pueden presentar reacciones cruzadas con otros microorganismos).

El antígeno (Vi) solamente lo poseen algunos serovares, es capsular, termolábil y responsable junto al antígeno (O) de la virulencia.

Al igual que otros Gram negativos poseen el complejo lipopolisacárido (LPS), componente de la pared celular que funciona como endotoxina, y es importante en la determinación de la virulencia del mismo, en infecciones clínicas es el responsable de la fiebre y de las muchas manifestaciones del shock que pueden ocurrir en enfermedades sistémicas (19).

PATOGENESIS

La patogenia de *Salmonella* se debe a los factores de virulencia, que poseen:

- a) **La capacidad de invadir células.**
- b) **La capa de lipopolisacáridos.**
- c) **La capacidad de replicarse intracelularmente.**
- d) **La elaboración de toxinas.**

Es por eso que tienen la capacidad de una vez ingeridos con los alimentos, poder sobrevivir a la barrera del ácido gástrico e invadir la mucosa del intestino y producir las toxinas.

La invasión de las células estimula la liberación de citoquinas proinflamatorias que inducen una respuesta aguda que provoca diarrea y puede conducir a la ulceración y

Trabajo Final

destrucción de la mucosa, además pueden difundir del intestino y causar una enfermedad sistémica (19).

SÍNDROMES POR *Salmonella*

Algunas de las manifestaciones por este microorganismo son: Gastroenteritis, Fiebre Entérica, Septicemia, Infecciones Focales y un estado de Portador Asintomático.

Algunos serovares son más propensos a producir un síndrome por ej.

S. typhi, *S. paratyphi*, y *S. schottmuelleri* → Fiebre entérica.

S. choleraesuis → Septicemia ó Infecciones focales.

S. typhimurium y *S. enteritidis* → Gastroenteritis.

Sin embargo cualquier serotipo puede producir cualquiera de los síndromes. En general las infecciones más graves se producen en los niños, adultos mayores de 50 años y en personas con enfermedades debilitantes.

La principal vía de transmisión es por la ingesta de alimentos contaminados y de persona a persona. La Salmonelosis es una zoonosis y tiene un enorme reservorio animal, los más comunes son: pollos, pavos, cerdos, vacas y también algunos animales salvajes.

El importante crecimiento del comercio internacional de alimentos entre países que tienen diferentes niveles de higiene en sus industrias agroalimentarias y en sus procesos agrícolas produce un problema de salud pública de elevada complejidad. La ubicuidad de esta bacteria asegura la preeminencia de este patógeno en la cadena alimentaria global y su importancia como agente causante de ETA (enfermedad transmitida por alimentos).

La contaminación del medio ambiente con *Salmonella* es debida exclusivamente a la transmisión de la bacteria a través de las heces contaminadas, las aguas residuales que pueden contener gran número de *Salmonella* y si son utilizadas con fines agrícolas se puede diseminar con gran facilidad.

Salmonella se excreta a través de las heces de animales y el hombre infectados pudiendo permanecer viables en la materia fecal durante mucho tiempo y transmitirse a los humanos por medio del contacto de las manos con todo aquello que halla sido contaminada por las heces, la comida, los piensos y el agua son los vehículos primarios.

La diseminación de *Salmonella* puede extenderse a todo un rebaño de animales durante el transporte al matadero o antes del sacrificio. La carne vacuna y de ave, los productos lácteos, el contagio persona-persona y el contagio animal doméstico-persona son algunas de las principales causas de los brotes epidémicos producidos por éstos microorganismos.

Trabajo Final

Los alimentos de origen animal también pueden contaminarse a través de los equipos sucios con materia fecal y por ambientes viciados en los mataderos.

La contaminación cruzada se produce por el contacto de los alimentos crudos durante el proceso de elaboración con alimentos o utensilios infectados con esta bacteria, pudiendo permanecer y multiplicarse en los equipos y en el ambiente.

Es importante mencionar también la infección de los subproductos avícolas como plumas y huevos. La superficie de la cáscara puede infectarse en la cloaca del animal o en ambientes contaminados con materia fecal.

Los productos del huevo, deshidratados y congelados que no han sido pasteurizados son un importante vehículo para diseminar al microorganismo. Estos productos que son utilizados como ingredientes en industrias de pastelería o del helado o en los hogares son una de las formas de transmisión más importantes.

Las frutas frescas y las especias también son un reservorio de *Salmonella*. Los productos lácteos como quesos y helados figuran en un puesto importante como agentes transmisores.

Los cambios en los hábitos alimenticios, los catering a gran escala, el incremento del comercio mundial de alimentos y de ingredientes han contribuido en gran magnitud a que se observe un incremento significativo de los brotes epidémicos siendo la salmonelosis la enfermedad líder en casos de ETA (2, 12, 28).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

El período de incubación de la gastroenteritidis o infección alimentaria por *Salmonella* depende de la dosis de bacterias. Los síntomas usualmente comienzan 6 a 48 hs. después de la ingestión de alimentos o agua contaminados y por lo general adoptan formas de náuseas, vómitos, diarreas, dolor abdominal, mialgias y dolor de cabeza son comunes, sin embargo la manifestación cardinal es la diarrea y fiebre (38 °C a 39 °C), también puede dar escalofríos y calambres abdominales. La duración de la diarrea y la fiebre varía pero, suele ser de 2 a 7 días.

La forma grave de Salmonelosis es Fiebre entérica que es sistémica. La mejor estudiada es la fiebre tifoidea causada por *S. typhi*, pero cualquiera de las especies puede ocasionar este tipo de enfermedad. Los síntomas comienzan después de un período de incubación de 10 a 14 días. Las fiebres entéricas pueden ser precedidas por gastroenteritis, que por lo general se resuelve antes de la aparición de la enfermedad sistémica. Los

Trabajo Final

síntomas de la fiebre entérica son inespecíficos e incluyen fiebre, anorexia, cefaleas, mialgias y estreñimiento.

Esta patología es una infección grave que puede ser fatal si los antibióticos no son administrados rápidamente (19).

DIAGNÓSTICO

Salmonelosis debe considerarse en cualquier diarrea aguda o enfermedad febril sin causa aparente. El diagnóstico se confirma por el aislamiento del microorganismo en muestras clínicas (heces o sangre).

MEDIDAS DE CONTROL

Salmonella es difícil de erradicar del medio ambiente, debido al importante reservorio que contribuyen las aves y el ganado. Sin embargo la disminución del número de estos microorganismos presentes en los animales es reducir significativamente la exposición en humanos.

En algunos lugares como por ej. Dinamarca todos los alimentos para animales son sometidos a un tratamiento para eliminar al microorganismo, antes de su distribución, lo que resulta en una marcada disminución de casos de Salmonelosis.

Otras medidas útiles incluyen cambios en las prácticas de sacrificio de animales para reducir la contaminación cruzada; proteger a los alimentos procesados de la contaminación; impartir formación en prácticas de higiene para el personal que manipula alimentos en los mataderos, en plantas de procesamiento, restaurantes y hogares, además de cocción y refrigeración adecuada de los mismos y ampliar los programas de vigilancia de las enfermedades entéricas (19).

CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE FAMILIA Y GÉNERO (1)**Pruebas de identificación de familia:**

- | | |
|--------------------------------|-----|
| 1. Fermentación de la glucosa: | (+) |
| 2. Oxidasa: | (-) |
| 3. Reducción de Nitratos: | (+) |

Pruebas para identificar Género *Salmonella*

- | | |
|-----------------------|--|
| 1. Citrato de Simons: | (+/-) |
| 2. Indol: | (-) |
| 3. Voges Proskauer: | (-) |
| 4. Rojo de metilo: | (+) |
| 5. TSI: | Alc/Ac, SH ₂ (+), Gas (+/-) |
| 6. Fenilalanina: | (-) |
| 7. Ureasa: | (-) |
| 8. Lia: | (+) |
| 9. Lactosa: | (-) |

HIPÓTESIS

- ▶ El tratamiento con desinfectantes en las diferentes etapas de producción disminuye la presencia de *Salmonella sp.* en harina de soja

OBJETIVO GENERAL

- ▶ Aislar e identificar *Salmonella sp.* en muestras de harina de soja en diferentes etapas de la producción y en el producto final antes y después del tratamiento con desinfectantes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Realizar la toma de muestras de harina de soja provenientes de una planta productora en las diferentes etapas, antes y después del tratamiento con desinfectantes.
- ▶ Aislar e identificar *Salmonella sp* en las muestras de harina de soja.
- ▶ Verificar el efecto de desinfectantes por comparación de muestras tratadas y no tratadas con desinfectantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANTECEDENTES

El trabajo final realizado con anterioridad por la Sta. Ivana Butus para obtener el título de Microbióloga, desarrollado en el laboratorio de Microbiología de Alimentos del Departamento de Microbiología e Inmunología al igual que el presente, se determinaron los puntos a muestrear de acuerdo al diagrama de flujo de la fabricación del producto, éstos fueron:

1. En el flujo de la materia prima (grano de soja)
2. Antes de la entrada al desolventizador-tostador.
3. Salida del desolventizador-tostador.
4. Salida del secador.
5. Salida del enfriador.
6. Ciclón de finos.
7. Despachos de vagones (Producto final).
8. Terminal de expedición (Puerto).

En el trabajo mencionado se determinó la presencia de *Salmonella* en las siguientes etapas muestreadas:

- Ingreso de semillas
- Salida del desecador.
- Salida del enfriador.
- Ciclón de finos.
- Terminal de expedición.

Estos resultados sirvieron para concluir que:

- Deben aplicarse acciones correctivas para eliminar al patógeno ó disminuir su presencia.
- Evaluar el funcionamiento e implementación de las BPM a lo largo de la cadena productiva (27).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en dicho trabajo final se rediseñaron los lugares de muestreo. Con respecto al Ingreso de semilla: no se consideró porque en la etapa posterior, salida del desecador no se determinó la presencia de *Salmonella*, indicando que el calor de esta etapa elimina a los microorganismos presentes.

Las demás etapas del estudio se mantuvieron y se agregó el análisis del Pellet que en el trabajo anterior no se había estudiado.

Trabajo Final

Además se aplicaron medidas correctivas que consistieron en la aplicación de desinfectantes que luego se detallan.

MUESTREO

Se tomaron un total de 119 muestras, realizando tres muestreos entre el 29/11/06 al 20/12/06. Y posteriormente se realizaron tres muestreos más entre el 02/05/07 al 16/05/07. En esta segunda etapa se aplicaron desinfectantes mediante una mezcla de (Ácido Fórmico, Propionato de Amonio y Formato de Amonio) en la etapa de elaboración Ciclón de finos. En despacho del producto final (en vagones), se le aplicó Hipoclorito de Sodio.

El muestreo se realizó una vez por semana, dos veces al día por la mañana y por la tarde en los siguientes puntos:

- 1. Pellet de cáscara.**
- 2. A la salida del toster.**
- 3. En la salida aireador/secador**
- 4. En la salida del enfriador.**
- 5. Ciclón de finos sin desinfectante.**
- 6. Ciclón de finos con desinfectante.**
- 7. Despacho del producto final en vagones sin desinfectante.**
- 8. Despacho del producto final en vagones con desinfectante.**

Tamaño de la muestra: Se recolectó 1 Kg. de muestra en cada etapa, en un lapso de ½ hora. La misma se colocó en bolsas de papel, se cerraron y rotularon adecuadamente, con fecha, etapa del producto, número de muestro y se aclaró si era con o sin desinfectante.

METODOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* sp.

Para el aislamiento e identificación de *Salmonella* se deben respetar una serie de pasos a seguir:

- 1. Enriquecimiento no selectivo.**
- 2. Enriquecimiento selectivo**
- 3. Siembra en medios sólidos selectivos y diferenciales**
- 4. Pruebas bioquímicas a las colonias sospechosas.**
- 5. Confirmación serológica**

Los pasos 1 a 3 corresponden al aislamiento y el 4 y 5 corresponden a la identificación.

ENRIQUECIMIENTO NO SELECTIVO:

Se realizó en caldo lactosado que facilita la recuperación de los microorganismos que han sufrido daño ó estrés en los alimentos crudos ó procesados.

Se prepararon 225 ml. de caldo lactosado en recipientes estériles tarados, se pesaron 25 gr. del alimento a analizar y se incubó a 35 °C por 18 a 24 hs.

ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO:

El proceso de enriquecimiento selectivo está diseñado para inhibir el crecimiento de otros microorganismos diferentes a *Salmonella*, potenciando así su crecimiento que se consigue mediante la utilización de inhibidores químicos.

Se tomó 1ml con pipeta estéril del caldo lactosado y se agregaron a 10ml de caldo de enriquecimiento selectivo Selenito-Cistina.

Nuevamente se colocó un 1ml de caldo lactosado en caldo de enriquecimiento selectivo Rappaport luego se incubaron a 35 °C por 24 hs.

SIEMBRA EN MEDIOS SÓLIDOS SELECTIVOS Y DIFERENCIALES:

El aislamiento y la identificación de *Salmonella* se realizaron a través de cultivos sólidos en placas de Petri. La selectividad de estos medios está dada por el verde brillante, bismuto sulfito y las sales biliares.

Trabajo Final

La diferenciación de otros microorganismos se consigue a través de los cambios de color con indicadores de pH, presentes en los medios de cultivos, al responder a la fermentación o no de la lactosa y la producción de SH₂.

A partir de los caldos selectivos se tomó medio con ansa calibrada estéril y se sembró en estrías por agotamiento para obtener colonias aisladas, los medios selectivos y diferenciales utilizados fueron:

Agar Bismuto-Sulfito: Las colonias se observaron pardas grises o negras y presentan brillo metálico, el medio que las rodea es al principio oscuro volviéndose más tarde negro a medida que aumenta el período de incubación figura 10.



Figura 10: Colonias típicas de *salmonella* en medio Bismuto Sulfito

Agar *Salmonella-Shigella*: Las colonias se observaron entre incoloras y rosa pálido, opacas y translúcidas con el centro negro figura 11.

Por último se incubaron las placas en forma invertida a 35 °C durante 24-48 hs.

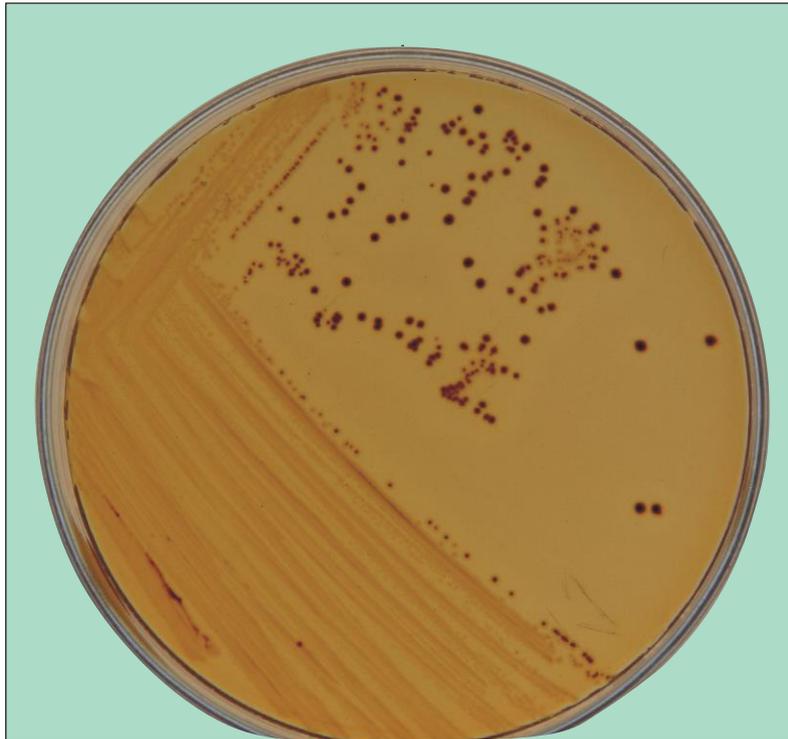


Figura 11: Colonias sospechosas en medio *Salmonella Shigella*

PRUEBAS BIOQUÍMICAS A LAS COLONIAS SOSPECHOSAS:

TSI

Fundamento: Con esta prueba se determina la capacidad que tienen los microorganismos de utilizar los hidratos de carbono incorporados en el medio de crecimiento (glucosa 0,1 %, sacarosa 0,1 %, lactosa 1 %), con producción o no de gases y la determinación de la producción de sulfuro de hidrógeno.

Interpretación

a) Utilización de los hidratos de carbono de tres maneras diferentes según el microorganismo analizado.

1. Alcalino/ Acido: solamente es consumida la glucosa.
2. Acido/Acido: es consumida la glucosa, la lactosa y/o sacarosa.
3. Alcalino/Alcalino: no fermenta los hidratos de carbono del medio, sólo utiliza las peptonas del medio.

Reacción ácida: amarilla; Reacción alcalina: roja.

b) Producción de gases: Las bacterias que producen gas se denominan “aerogénicas” esta capacidad se deba a la presencia de una enzima (deshidrogenasa fórmica) que desdobla el ácido fórmico en anhídrido carbónico e hidrógeno. Esto se visualiza con la presencia de burbujas en el medio o el desplazamiento del mismo.

Trabajo Final

c) Producción de ácido sulfhídrico: algunas especies de bacterias son capaces de liberar azufre enzimáticamente de los diferentes aminoácidos que lo contienen produciendo ácido sulfúrico. La enzima responsable de esta actividad es la cisteinasa.

El precipitado negro del sulfuro ferroso que indica la producción de SH_2 puede ocultar la condición ácida producida en la capa superior, por lo tanto si se produce SH_2 es que existe una condición ácida aún cuando no se lo observe.

Metodología: A las colonias sospechosas aisladas en los medios sólidos se las cultivó en agar nutritivo durante 24 hs y posteriormente se las sembró con ansa en profundidad y superficie en un tubo inclinado conteniendo el medio de cultivo para TSI, se incubaron a 35 °C por 18hs.

La prueba es (+) para *Salmonella sp* cuando: se observa reacción Alcalina/Ácida con producción de sulfhídrico y/o de gas.

La prueba es (-) cuando se presentan cualquiera de las dos formas de reacción citadas anteriormente (Figura 12) (1).

UREASA

Fundamento: Los microorganismos que poseen la enzima ureasa son capaces de hidrolizar la urea con la alcalinización del medio.

Reacción (+): azul-verdoso.

Reacción (-): no se observa cambio de color.

Metodología: Se sembró a partir del agar nutritivo el cual fue inoculado con las colonias sospechosas de los medios de cultivos sólidos.

Con un ansa estéril se sembró en profundidad y en superficie en un tubo pico de flauta se incubó a 35° C por 24 hs (Figura 12) (1).

DESCARBOXILACIÓN DE LA LISINA (LIA)

Fundamento: Se determina la capacidad que tienen algunos microorganismos de descarboxilar un aminoácido (lisina) transformándolo en cadaverina y éste por desaminación oxidativa pasa a putrescina, liberando NH_3 que hace virar el indicador del medio.

Reacción (+): color violeta oscuro.

Reacción (-): color amarillo como el testigo sin el aminoácido.

Trabajo Final

Metodología: A partir del agar nutritivo inoculado con las colonias sospechosas de los medios sólidos, se sembró dos tubos uno control sin el aminoácido, el otro tubo que contiene el aminoácido se sembró con ansa estéril en profundidad y se le añade vaselina para generar anaerobiosis, luego se incubó a 35° C durante 4 días (Figura 12) (1).

FENILALANINA (FA)

Fundamento: Por desaminación oxidativa la fenilalanina pasa a ácido fenilpirúvico que con el reactivo (cloruro férrico) da un color verde en la superficie del tubo.

Metodología: A partir del agar nutritivo se sembró con ansa estéril en profundidad se incubó a 35 °C durante 24hs. (Figura 12)

Se revela la prueba por el agregado de 4 ó 5 gotas del reactivo (cloruro férrico) sobre la superficie del agar.

Reacción (+): color verde.

Reacción (-): no se observa cambio de color.

INDOL, ROJO DE METILO, VOGES PROSKAUER, CITRATO (I.M.V.I.C.)**Prueba de Indol**

Fundamento: Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco; el indol se puede detectar en un medio apropiado observando la formación de un halo color rojo- fucsia en la interfase del reactivo y el medio de cultivo, luego de agregarle el reactivo de kovacs (p-dimetilamino benzaldehido, alcohol isoamílico y HCl).

Reacción (+): Formación del halo color rojo-fucsia en la superficie del medio.

Reacción (-): No se observa cambio de color.

Metodología: A partir de un cultivo fresco de 24hs en agar nutritivo se inoculó con ansa en un tubo que contenía 2ml de agua peptonada, se incubó a 35 °C durante 24hs.

Luego se reveló la prueba agregando 2 ó 3 gotas del reactivo de kovacs, se agitó suavemente y se observó si hay cambio de color (1).

ROJO DE METILO

Fundamento: Los microorganismos que realizan fermentación ácida mixta a partir de glucosa producen un descenso del pH en el medio de cultivo por debajo de 4,5 lo que ocasiona que vire el indicador de pH (rojo de metilo) de amarillo a rojo.

Trabajo Final

Reacción (+): Viraje del medio a rojo (fermentación mixta).

Reacción (-): Viraje del medio a amarillo.

Metodología: Se inoculó en medio de Clark y Lubs un cultivo de 18 hs proveniente de agar nutritivo, luego se agregaron unas gotas de solución rojo de metilo, se agitó durante 30 minutos y se observó el cambio de color (1).

VOGES PROSKAUER

Fundamento: Las bacterias por la fermentación de la glucosa producen fundamentalmente ácido pirúvico, que de acuerdo con la batería enzimática que posea el microorganismo es metabolizado por distintas vías, una de ellas es la del butilenglicol; que lleva a la producción de acetilmetilcarbinol (acetoína) producto final neutro y una baja cantidad de ácido mixtos.

En presencia de O₂ atmosférico y OHK al 40 %, los productos finales neutros acetoína son oxidados a diacetilo que se convierte en un complejo de color rojo por acción del reactivo (alfanaftol) que actúa como catalizador y se combina con el diacetilo y los compuestos del tipo guanidina y arginina que se encuentran en las peptonas del medio. Se debe agregar primero el alfanaftol y luego el álcalis.

Reacción (+): color rosado en el medio (fermentación butilenglicólica)

Reacción (-): No se observa cambio de color.

Metodología: Se inoculó con ansa de un cultivo proveniente de agar nutritivo en 2 ml de medio de Clark y Lubs y se incubó a 35 °C durante 24hs. Luego se le agregó 0,6 ml de alfanaftol y 0,2 ml de hidróxido de potasio y se llevó a estufa durante 30 minutos y se observó cambio de color (1).

CITRATO DE SIMONS

Fundamento: La utilización del citrato por las bacterias se comprueba usando un medio de cultivo que contenga como única fuente de carbono, el citrato de Na y como única fuente de nitrógeno, el fosfato monoamónico. Las bacterias que utilizan el citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal amónico, produciéndose la alcalinización del medio por producción de hidróxido de amonio, lo que se visualiza por el cambio de color en el medio por el viraje del indicador (azul bromotimol).

Reacción (+): Viraje del medio de verde a azul.

Reacción (-): No se observa cambio de color.

Trabajo Final

Metodología: Se sembró con ansa en punta, de un cultivo agar nutritivo, en profundidad y superficie en un tubo inclinado, se incubó a 35 °C por 24 hs y se observó cambio de color (1).

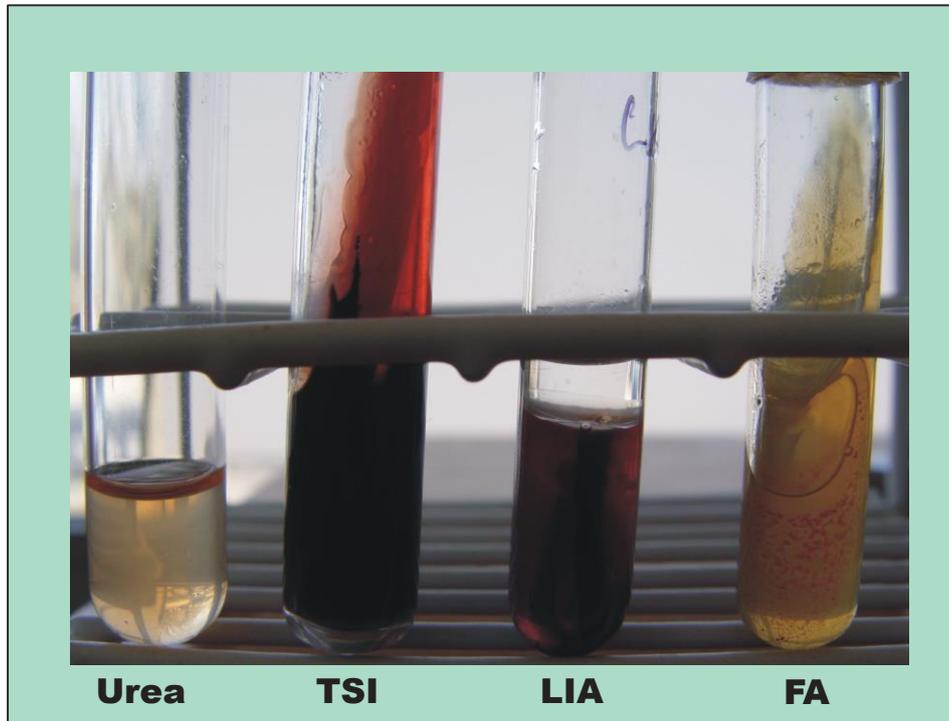


Figura 12: Pruebas Bioquímicas

CONFIRMACIÓN SEROLÓGICA

El último paso en la identificación de *Salmonella* es el test serológico. Éste se basa en la capacidad de aglutinación de los microorganismos frente a determinados antisueros específicos con los antígenos somáticos (O), flagelar (F), o capsular (Vi).

Fundamento: Los sueros polivalentes somáticos utilizados son: el (OS-A) y el (OS-B). Si los microorganismos producen aglutinación con el Suero (OS-A), la cepa es del serotipo (A), si en cambio se produce aglutinación con el Suero (OS-B), la cepa es del serotipo (B).

Metodología: Se colocó en un porta objetos 2 gotas de solución fisiológica una en cada extremo del mismo, luego se tomó con ansa material de un cultivo de 24 hs en agar nutritivo y se realizó una suspensión con la solución, posteriormente se colocaron los sueros polivalentes (OS-A) y el (OS-B) próximos a cada una de las suspensiones y con el ansa flameada y enfriada se procedió a mezclar, posteriormente se comenzó a observar la aglutinación (1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se muestran los resultados obtenidos del aislamiento e identificación de *Salmonella* en 119 muestras analizadas en diferentes etapas de la elaboración de harina de soja y producto final, los mismos se analizan comparativamente con los datos obtenidos en el trabajo realizado con anterioridad y con algunos similares publicados. Cabe mencionar que los antecedentes disponibles sobre este tipo de investigaciones son muy escasos.

Como se describió en la sección materiales y métodos la metodología para aislar e identificar *Salmonella* se realizó en varias etapas.

En la etapa que se sembró en medios sólidos, *Salmonella-Shigella* (S-S) y Bismuto Sulfito (B.S.) se observó que el 70,59 % de las muestras presentaron colonias sospechosas de *Salmonella* (Figura 13).

En el 39,49% de las muestras aparecían colonias características en ambos medios, en el 18,48 % sólo en (S-S) y en el 12,60 % sólo en (B. S).

Esto muestra la importancia de utilizar medios diferentes.

Cuando a esas colonias sospechosas se les realizó las pruebas de TSI, LIA, Urea y FA un porcentaje similar de colonias provenientes de cada uno de los medios dieron positivas. (10,96 % en el medio S-S y 10,08 % en el medio B.S.). Estos números se redujeron cuando se completó el esquema de identificación con las pruebas de I.M.V.I.C. (Figura 13).

A las 8 cepas que las pruebas bioquímicas se correspondieron con *Salmonella* se les realizó la identificación serológica.

Todas las cepas dieron serología positiva, 7 de ellas pertenecieron al serogrupo B y sólo 1 al serogrupo A.

ATENCION

IMPRIMIR PERO NO ENCUADERNAR

Trabajo Final

En un trabajo realizado en Madrid por Rosa Amejeiras se analizaron 4504 muestras de harina de soja de diferentes orígenes geográficos con la finalidad de establecer conclusiones para la industria de piensos. Los resultados indicaron que algunos de los serovares aislados en la harina de soja también se encontraron en huevos, ovoproductos, en el resto de los alimentos y en el agua (20).

Los serovares mas aislados fueron de *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, que coincidió frecuentemente con los serotipos aislados en brotes de toxoinfección alimentaria en el hombre.

Los resultados obtenidos en éste trabajo para los distintos productos analizados que dieron positivos para *Salmonella* fueron los siguientes:

Harina de soja tratada después de la extracción del aceite (HST): 4,48 %.

Harina de soja sin tratar ó full-fast (HSST): 17,0 %.

Es importante mencionar la sensibilidad de los medios de cultivos sólidos utilizados, el medio *Salmonella-shigella*, mostró mayor sensibilidad para el aislamiento de *salmonella* comparados con el Bismuto Sulfito (20).

El aislamiento e identificación de *Salmonella sp* se llevó a cabo en 119 muestras que fueron tomadas en distintos puntos en la elaboración de harina de soja y en el producto final. Se aisló *Salmonella* en 8 muestras (6,72 %) mientras que en las restantes 111 muestras (93,27 %) éste microorganismo estuvo ausente (figura 14).

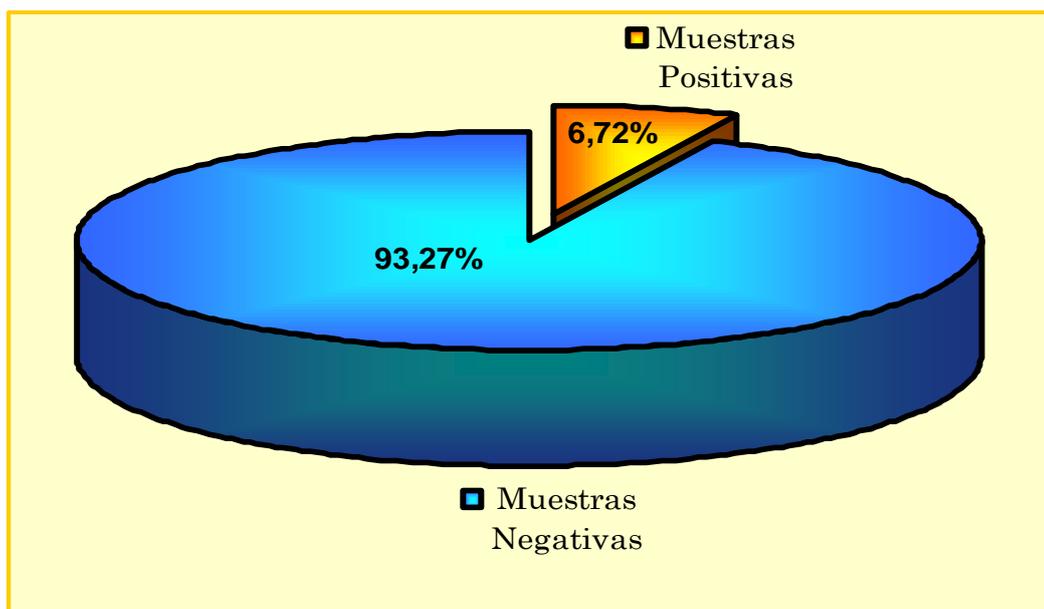


Figura 14: Porcentajes de muestras positivas y negativas para *salmonella*.

Trabajo Final

El instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos de Habana Cuba en 2001, realizó un trabajo de identificación de *Salmonella* en piensos y materias primas con las que se elabora dicho alimento. Se analizaron 140 muestras de pienso y sus materias primas procedentes de una planta elaboradora de alimentos para animales en la Ciudad de La Habana el 13,6 % de las muestras resultaron positivas para *Salmonella*. Las cepas de *Salmonella* aisladas fueron tipificadas; el serotipo *derby* fue el más frecuente (21 %), seguido por el *tennessee* (serogrupo C1) (15,8 %). La materia prima más contaminada fue la harina de soya con el 29,1 % de positividad, seguida por la harina de trigo con el 20,8 % (22).

Franco A (Agencia de inspección de alimentos Canadá) coincidiendo con otros trabajos ya mencionados indicó que la prevalencia de *Salmonella* en distintos productos para la fabricación de piensos es muy importante como se muestra en un monitoreo de frecuencia y riesgo de contaminación en materias primas proteínicas provenientes de Holanda, donde los resultados obtenidos fueron:

Granos: 0,9 %, Harina de Soja: 2,7 %, Harina de Pescado: 12,2 % y Harina de carne: 3,0 %.

Las especies que prevalecen en alimentos balanceados según la FDA, en proteínas vegetales son: *S. tennessee*, *S. enteritidis*, *S. cubana*, *S. Montevideo* (8).

Trabajo Final

Las 8 cepas aisladas en el presente trabajo provenían de muestras tomadas en diferentes lugares y tiempos a continuación en la (Tabla 3) se detallan: el serogrupo hallado en cada uno y sus respectivas fechas de muestreo.

Éste último dato es importante mencionarlo, ya que los aislamientos se produjeron en forma sucesiva, información que revela la presencia de *Salmonella* en forma constante.

Tabla 3: Lugares del muestreo que se encontró *Salmonella* sp.

<u>Fecha</u>	<u>Lugar del Muestreo</u>	<u>Serogrupo</u>	<u>Número de Muestras</u>
29/11/06	Carga de Vagones	Serogrupo B	8
20/12/06	Carga de Vagones	Serogrupo B	8
02/05/07	Salida Desecador	Serogrupo B	24
	Carga Vagones	Serogrupo B	8
09/05/07	Salida Enfriador	Serogrupo B	24
	Pellet	Serogrupo A	5
16/05/07	Ciclón de Finos	Serogrupo B	24
S/F	Carga de Vagones	Serogrupo B	8

En este trabajo no se determinó a que especie de *Salmonella* pertenecen las cepas aisladas, actividad que realiza el Instituto Nacional Carlos Malbrán. En un trabajo posterior por medio de la utilización de técnicas moleculares se realizarán identificaciones de serotipo más específicas.

Trabajo Final

En la figura 15 se observa que el porcentaje de aislamiento se mantiene constante en todas las etapas de elaboración.

Si consideramos todo el proceso el mayor porcentaje se aisló en el producto terminado (carga de vagones). No se encontró *Salmonella* en la salida del toster, lo cual es esperable debido a la aplicación del proceso térmico.

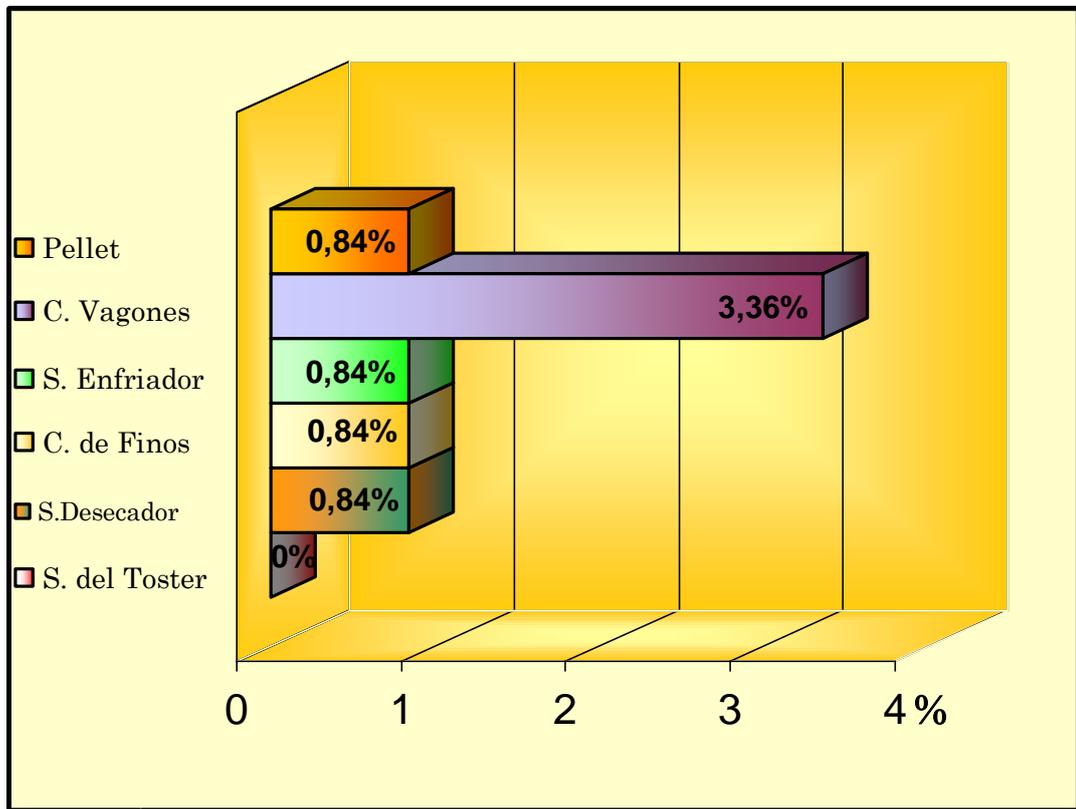


Figura 15: Porcentaje de muestras positivas (6,72 %) distribuidos en cada uno de los puntos muestreados.

En el trabajo realizado anteriormente por Ivana Butus los resultados obtenidos muestran que los puntos con mayor porcentaje de aislamiento se produjeron en Ciclón de finos y Terminal 6 (2 %), el porcentaje que le sigue corresponde a Ingreso de semillas, Salida del desecador, Ventanilla del Secador, Salida del enfriador (0,8 %). Por último los puntos Antes del toster, Salida del toster y Despacho de vagones, son los lugares en los cuales no se hallaron muestras positivas para *Salmonella* (28).

Trabajo Final

Las diferencias en los resultados obtenidos (en los porcentajes de aislamiento) en ambos trabajos son debidos a que el volumen de materia prima que se procesa es de toneladas y es difícil establecer un criterio de muestreo, teniendo en cuenta que la cantidad a analizar por etapas es de unos pocos gramos. Con el agravante que el microorganismo no se distribuye uniformemente en la materia contaminada.

Un estudio de monitorización de *Salmonella* realizado por (López S. y col) en un total de nueve fábricas de piensos en España determinó que la segunda zona con mayor contaminación correspondía a las muestras obtenidas en el enfriador, llegando a niveles de hasta el 85,7% de aislamientos, otros puntos donde se encontró un número importante de aislamientos fue en piqueras y granuladora, con valores del 52 % y 28 % respectivamente (25).

Después de la granulación, el pienso está caliente, húmedo y condensa al entrar en contacto con las superficies frías del enfriador. Además puede acumularse una gran cantidad de polvo, no sólo del pienso que entra sino el procedente de la fuente de aire exterior.

Se detectó una mayor presencia de *Salmonella* y enterobacterias en polvo recogido del enfriador que en las muestras de pienso.

El gran volumen de aire que mueve el enfriador moviliza a las partículas de pienso acumuladas en el equipo. La presencia de estas partículas, juntamente con la combinación de temperatura y humedad del proceso, constituyen condiciones óptimas para el crecimiento de *Salmonella* (25).

Trabajo Final

En el presente trabajo en las muestras tomadas luego de la aplicación de los desinfectantes en las diferentes etapas del proceso como se detalla en la tabla 4, no se aisló *Salmonella*.

Tabla 4: Aplicación de los desinfectantes y resultados obtenidos.

<i>Fecha</i>	<i>Aplicación de los Desinfectantes</i>	<i>Presencia de Salmonella</i>
09/05/07	<i>Ciclón de Finos (*1) (mañana y tarde)</i>	<i>Negativo</i>
09/05/07	<i>Carga de vagones (*2)</i>	<i>Negativo</i>
16/05/07	<i>Ciclón de Finos (*1) (tarde)</i>	<i>Negativo</i>

(*1): Desinfectantes aplicados (Ácido Fórmico, Propionato de Amonio, Formato de Amonio).

(*2): Desinfectante aplicado (Hipoclorito de Sodio)

La calidad de las materias primas es el primer factor y el más importante para asegurar la calidad del pienso, tanto nutricional como microbiológicamente. Según datos oficiales de los diferentes países de la U.E. correspondientes al año 2003, el nivel de contaminación por *Salmonella* detectado fue 0,7% en los ingredientes de origen animal, 0,7% en los productos de cereales y 3,5% en los productos proteicos de oleaginosas, mientras que en los piensos los niveles fueron inferiores al 1%.

La reducción y control de la contaminación puede lograrse con tratamientos térmicos: su eficacia dependerá de la temperatura, tiempo, humedad y presión aplicados.

Se considera que temperaturas de unos 80 °C durante 5-10 minutos son suficientes para reducir significativamente la carga bacteriana, aunque son necesarios para la reducción de la contaminación tratamientos superiores a los 120 °C durante más de 15 minutos para higienizar completamente el pienso. Posteriormente deberá evitarse la recontaminación.

Trabajo Final

Los tratamientos químicos también contribuyen para reducir y controlar la contaminación. Se basan principalmente en el uso de ácidos orgánicos, siendo el fórmico (bactericida) y propiónico (fungicida) los más utilizados. Aunque otros ácidos y sus combinaciones pueden ser muy interesantes para una mayor protección del pienso, así como obtener efectos beneficiosos en el animal (9).

Datos recogidos por (López S Guinovart y col.) de un total de 3.105 muestras de diez fábricas de piensos (de nueve puntos de verificación), que fueron: Piqueras, Silos con materia prima, Molinos, Mezcladora, Granuladora, Enfriador, Silos con producto final, Zona de expedición y Planta de almacenamiento.

Se observó que el principal punto de contaminación (mayor porcentaje de muestras positivas) es la piqueta, 1 de cada 4 muestras recogidas en este punto dieron positivas a *Salmonella*. El segundo punto de contaminación importante fue el enfriador con un 24 % de aislamientos positivos, en tercer lugar se encontró a los puntos Molinos y Silos con producto final con un 15,4 % de aislamientos, en el resto de los puntos muestreados se encontró un aislamiento menor al 10 % (26).

CONCLUSIONES

I) La marcha microbiológica mostró que los porcentajes de aislamiento para cada medio sólido utilizado son los siguientes:

5,88 % Para el medio *Salmonella-Shigella*.

4,20% Para el medio Bismuto Sulfito.

De acuerdo con estos resultados podemos concluir que la sensibilidad es ligeramente mayor para el medio S-S, coincidiendo este dato con resultados obtenidos por otros autores.

II) La etapa de elaboración de harina de soja que mostró mayor contaminación con *Salmonella* fue en el producto terminado (carga de vagones).

III) En la etapa a la salida del toster no se aisló *Salmonella* en ninguna muestra. El tratamiento con calor de esta etapa produce su eliminación o lesión, esto último inhibe el desarrollo de los microorganismos, que en etapas posteriores estimulados por las características nutricionales de la materia prima, se reanuda su crecimiento.

IV) La implementación de medidas correctivas (aplicación de desinfectantes) produjo el efecto deseado, disminuyendo la carga microbiana.

V) La presencia de *Salmonella* en los diferentes puntos muestreados y producto final indican fallas durante el proceso y se convierten en Puntos críticos de control. Sería necesario reiterar el muestreo y aumentar su frecuencia en dichos lugares a los fines de lograr adecuados criterios de higiene y prácticas de procedimientos de elaboración de productos para una correcta aplicación de las BPM.

BIBLIOGRAFÍA

1. **BERGEY'S MANUAL OF BACTERIOLOGY SISTEMATIC** – 1986. *Volumen II*
Editorial Acribia Zaragoza.
2. **BREWER R.L, JAMES W.O, JOHNSON R. W, ALVARES C.A, KELLY W. BERGERON E. A** – 1995. *Journal of foods science.* (*Distribución de las enfermedades transmitidas por alimentos*)
3. **BRUESKE GLENN, CROWN D.** – 1991. *Proceso de separación aceite /harina.*
Libro de oro de A & G (Aceites y Grasas) Editorial Amalevi
4. **CARR ROY** – 1991. *Cosecha, almacenaje y transporte de semillas oleaginosas.*
Pospilot Plant Corporation Saskatoon, Saskatchewan, Canadá. Libro de oro de A & G (Aceites y Grasas) -10 Aniversario. Editorial Amalevi.
5. **CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO.** *Capítulo XIX. Harinas, concentrados, Aislados y derivados proteínicos. Artículo 1407 – (Res. 126,29.1.80)*
6. **F.E.D.E.R.A.R (FUNDACION DE ESTUDIOS PARA EL DESARROLLO ECONOMICO Y REGIONAL ARGENTINA.** *Revisa Agrodesarrollo-2007; 23(87) Iniciativa desnutrición cero. Director: Jesús Leguiza.*
7. **FETZER W, BUHLER AG, UZWIL** – 1999. *Planta de preparación de semillas combinadas.* *Libro de oro de A & G (Aceites y Grasas) -10 Aniversario. Editorial Amalevi.*
8. **FRANCO A.** *Vicepresidente de Servicios científicos, National Renderers Association, Presidente de Animal Protein Producer Industry* (Agencia de Inspección de Alimentos) Canadá-2005.
9. **GONZALO MATEO (UPM), PEDRO MEDEL (IMASDEL)**-2005 *Calidad microbiana en materias primas y piensos. Agencia De Enfermedades Zoonóticas De La Unión Europea*

Trabajo Final

10. **HACK ALBERTO.G.** – 1999. *Almacenamiento de granos oleaginosos*. Asociación Argentina de Poscosecha de Granos (APOSGRAN). Libro de oro de A & G (Aceites y Grasas)-10 Aniversario. Editorial Amalevi.

11. **HEIMANN MARK, CHAPMAN ROSKAMP** – 1999. *Operación de molinos laminadores y control de rodillos*. Libro de oro de A & G (Aceites y Grasas) -10 Aniversario. Editorial Amalevi.

12. **(I.C.M.S.F) INTERNACIONAL COMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICACIONES FOR FOODS OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOLOGICAL SOCIETES.** – 1996 *Especificacionaes microbiológicas en alimentos, Salmonella y otros microorganismos patógenos*.

13. **I.N.T.A. (INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA ALIMENTARIA)** *El cultivo de soja en Argentina - Noviembre-2005 Autor: Carlos Ghida Daza Tec. del área de economía estadística e información*.

14. **KNOTT MICHEL, DE SMET** – 1999. *Desolventizacion y Acabado de harinas*. Libro de oro de A & G (Aceites y Grasas) -10 Aniversario. Editorial Amalevi.

15. **KNOTT MICHEL, DE SMET** – 1999. *Nuevos desarrollos en la molienda de semillas oleaginosas*. Libro de oro de A & G (Aceites y Grasas) -10 Aniversario. Editorial Amalevi.

16. **LUSAS E.W, WATKINSY L.R., RHEE K.C.** – 1999. *Separación de grasas y aceites por extracción por solvente: métodos no tradicionales. Parte I. Food protein research and development, center the texas A & M. University Sistem, college station, Texas*. Libro de oro de A & G (Aceites y Grasas) -10 Aniversario. Editorial Amalevi.

17. **MABEL ABIATTE; REVISTA MUNDO SOJA** Artículo: “Historia de la suprema legumbre” Mayo-2003 45(3-8).

18. **MARIA JULIA COLOMBO (INTA)** Extraído de publicación Anual (Nutrición diet.) “Aplicaciones de la soja en la alimentación humana- 2002 Buenos Aires.

Trabajo Final

19. **MICROBIOLOGY, VIROLOGY, IMMUNOLOGY, BACTERIOLOGY, PARASITOLOGY Y MICOLOGY** – 2001. (*The borrad trastees of the universith of south*) *Doctor Charles Bryan of the USC School of Medicinal*

20. **ROSA AMEJEIRAS RODRIGUEZ** (*Prevalencia de microorganismos del genero Salmonella en harina de soja*) Departamento de Microbiología Facultad de CC Biológicas Universidad de Madrid -1998

21. **ORGANIZACION ALIMENTACION SANA** www.alimentacion-sana.org

22. **SAENZ POZO EMILIO, CASTILLOLEYVA VIRGINIA, RODRIGUEZ PEREZ OLGA, TORRES REYES MARITZA Y MARQUEZ FERRER Y AUMARA** *Revista Cubana Aliment Nutr 2001, 15 (1):26-30. Instituto de Nutrición e Higiene de los alimentos* (Serotipos de *Salmonella* aislados en piensos para gallinas ponedoras.

23. **SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, PESCA Y ALIMENTACION** – 1997. *Guía para las Buenas Prácticas de Manufactura y Manual de análisis de riesgos y puntos críticos de control. El obrador división Editorial.*

24. **S.A.G.PyA. (SECRETARIA AGROPECUARIA GANADERIA PESCA Y ALIMENTACION)** *Datos actualizados Boletín N° 55 Dr. Javier De Urquiza (Subsecretaría de política alimentaria y alimentos; Ing. Mercedes Nimo Directora Nacional de Alimentos - abril 2008.*

25. **S. LOPEZ GUINOVART JM. CREUS E.** -2005 *Riesgo de contaminación de Salmonella en materias primas. Universidad Autónoma de Barcelona España. www.3tres3.com.*

26. **S. LOPEZ GUINOVART JM. CREUS E.** -2005 *Nivel higiénico de la fábrica de piensos: puntos de contaminación cruzada Universidad Autónoma de Barcelona España www.3tres3.com.*

Trabajo Final

- 27. TRABAJO FINAL POR BUTUS IVANA** *Determinación de la presencia de Salmonella en distintas etapas de la elaboración de harina de soja y en el producto final. (U.N.R.C) Facultad de Ciencias Exactas Físico – Químicas y naturales departamento de Microbiología e Inmunología-2008.*
- 28. YANUCCI DOMINGO** - 1999. *Manejo del secado. Libro de oro de A & G (Aceites y Grasas) -10 Aniversario. Editorial Amalevi.*
- 29. WILLIAM A. DUDLEY- CASH, PHD** “American Soybean Association” IV *Jornadas control de calidad de harina de soja y soja integral Seminario: control de calidad de materias primas - 2003.*