

**Tesis de Maestría en Biología-Opción Microbiología
PEDECIBA**

**“Hongos toxicogénicos y producción
de micotoxinas en silos de sorgo
húmedo”**

Ana Claudia Mionetto Cabrera

**Tutora: Dra. Dinorah Pan
Co-tutora: Dra. Lina Bettucci**

**Laboratorio de Micología
Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Montevideo, Uruguay
2017**



AGRADECIMIENTOS

A los miembros del tribunal, por sus correcciones y aportes a la tesis.

A CSIC y CONAPROLE por el co-financiamiento del proyecto CSIC Sector productivo-Modalidad 1, realizado en conjunto con la Sección Toxicología de Facultad de Veterinaria

A la ANII, por el financiamiento de una Beca de Postgrado

A PEDECIBA, por el aporte monetario que ayudó a financiar este trabajo

A mi gran familia, los integrantes del Laboratorio de Micología, por su constante colaboración en lo que pudieran ayudarme, y por tantos momentos lindos que me hicieron pasar en esta etapa tan linda de mi vida y que tanto se extraña, que fue integrar el Laboratorio de Micología.

A Dinorah y Lina, mis tutoras, por aceptar dirigir esta tesis, por enseñarme, ayudarme y apoyarme constantemente.

A mis padres, por guiarme siempre a elegir el mejor camino posible, apoyando siempre mis decisiones. A mis hermanos, por su apoyo constante.

A mi amor, por bancarme tantos años de estudio, con lo que eso trae asociado, y por su amor incondicional, apoyo y aliento constantes.

RESUMEN

En Uruguay, la producción ganadera se ha intensificado en los últimos años, lo que ha llevado al desarrollo de avances tecnológicos que permitan incrementar la disponibilidad de alimentos para el ganado. Una de las estrategias tecnológicas utilizadas es la producción de ensilajes que aporten energía para balancear dietas, siendo ésta una práctica muy difundida en nuestro país. Concomitantemente al uso de los ensilados, han aumentado los problemas sanitarios y la disminución de la producción. Estos problemas se han asociado con la calidad nutricional del recurso así como también a la contaminación por micotoxinas, ambos debidos al desarrollo de hongos presentes previamente o durante el ensilado. Ya que es una técnica relativamente nueva en Uruguay, existe muy poca información acerca de la contaminación fúngica que puede encontrarse en los granos de sorgo al momento de ensilar y cómo evoluciona en los silos durante el tiempo que están almacenados. Tampoco se conocen los factores relacionados a su presencia o a la contaminación de los silos con micotoxinas. En este trabajo se realizó un estudio de ensilados de grano húmedo de sorgo obtenidos de diferentes establecimientos localizados en la principal región lechera del Uruguay. Se analizó la evolución durante el almacenamiento tanto de las propiedades físicas como de los hongos y micotoxinas presentes en los mismos. También se determinaron *in vitro* las condiciones de crecimiento óptimas y de producción de micotoxinas por parte de cepas toxicogénicas obtenidas de los ensilados, a diferentes temperaturas y actividades hídricas. En cuanto a las propiedades físicas de los ensilados, las condiciones obtenidas durante el almacenamiento concuerdan con aquellas citadas para una adecuada conservación del grano ensilado. Por otra parte, se observó una alta contaminación de las muestras, superando el límite establecido como estándar de calidad higiénica de acuerdo a los criterios de buenas prácticas de manufactura. Se encontraron además una gran diversidad de géneros y especies fúngicas que varían en frecuencia dependiendo de la etapa en que se encuentre el proceso de ensilado, siendo *Penicillium* y *Aspergillus* los géneros predominantes. Algunas de las especies encontradas presentan conocida capacidad toxicogénica, como es el caso de *Fusarium graminearum*, *Fusarium nygamai* y *Aspergillus flavus*. A pesar de esto, sólo unas pocas muestras estuvieron contaminadas con fumonisinas y aflatoxinas, no superándose los límites establecidos para consumo animal. Al analizar los requerimientos ecofisiológicos de estas cepas toxicogénicas, los resultados muestran que *F. nygamai* tolera un amplio rango de temperaturas en ambas actividades hídricas analizadas. En cuanto a la producción de

fumonisin, éstas fueron detectadas a todas las temperaturas evaluadas, observándose un aumento de las mismas a mayores temperaturas. Por otra parte, *F. graminearum* presentó un menor rango de temperaturas a las que puede crecer. En cuanto a la producción de nivalenol (NIV) y deoxinivalenol (DON), todas las cepas estudiadas fueron productoras de ambos tricotecenos, observándose la mayor producción para ambos a 15°C. Para *Aspergillus flavus* se observaron diferencias importantes en el crecimiento para ambas actividades hídricas, favoreciéndose su desarrollo a menor actividad hídrica. En cuanto a la producción de aflatoxinas, se detectó la producción de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, en todas las temperaturas estudiadas excepto para G₂ a 37°C, en donde la producción fue nula. La principal aflatoxina producida en todos los casos fue B₁, observándose un descenso en los niveles a medida que aumentó la temperatura. Estos resultados muestran la presencia en los silos de importantes especies toxicogénicas. La presencia de éstas en los ensilados puede producir una disminución en la producción de leche y en casos graves hasta pueden registrarse problemas de fertilidad e incluso la muerte de animales. También puede verse afectada la calidad de la leche por la presencia de aflatoxina M₁ en leche proveniente de animales expuestos a aflatoxinas. Existen severas restricciones en cuanto a su presencia en leche y derivados, siendo la limitante principal para la exportación de productos lácteos. Dado que no existe práctica aislada alguna que, aplicada en un determinado punto de la cadena de producción, es capaz de eliminar el problema de la contaminación con micotoxinas, conocer las condiciones que favorecen su aparición en silos de sorgo húmedo a fin de controlar su presencia en los mismos permitirá mantener una adecuada sanidad animal, además de obtener productos más seguros y que puedan competir en el mercado internacional.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Silos de grano húmedo.....	1
1.1. Proceso de ensilaje.....	2
1.2. Ensilados de sorgo de grano húmedo.....	6
2. Contaminación microbiológica asociada a los cultivos de cereales.....	8
2.1. Hongos.....	9
2.2. Micotoxinas.....	11
3. Factores que condicionan la colonización fúngica y producción de micotoxinas.....	14
3.1. Disponibilidad de agua.....	14
3.2. Temperatura.....	15
3.3. Efecto de la actividad de agua y temperatura en el crecimiento fúngico y producción de micotoxinas.....	16
3.4. pH del sustrato.....	18
4. Hongos y micotoxinas asociados a los silos de grano húmedo de sorgo.....	19
4.1. Micobiota y micotoxinas asociadas al sorgo.....	19
4.1.1. Fumonisinias.....	20
4.1.2. Deoxinivaleol y Nivalenol.....	23
4.2. Micobiota y micotoxinas asociadas a los ensilados.....	27
4.2.1. Aflatoxinas.....	28
5. Problemas asociados a los silos de grano húmedo de sorgo.....	32
HIPÓTESIS.....	34
OBJETIVOS.....	34
Objetivo general.....	34
Objetivos específicos.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
1. Ensilados de grano húmedo de sorgo.....	35
Muestreo.....	35
Aislamiento e identificación de especies fúngicas.....	35
Determinación de la humedad y la actividad hídrica (a_w).....	37
Determinación de pH.....	37
Determinación de micotoxinas.....	38
Análisis de datos.....	39

2. Ecofisiología de cepas toxicogénicas.....	39
Selección de cepas.....	39
Producción de micotoxinas por <i>F. graminearum</i> y <i>F. nygamai</i>	39
Producción de micotoxinas por <i>A. flavus</i>	41
Determinación de la velocidad de crecimiento de las cepas seleccionadas.....	41
Producción de micotoxinas de las cepas seleccionadas.....	42
DON y NIV.....	42
Fumonisinias.....	43
Aflatoxinas.....	43
RESULTADOS.....	44
1. Ensilados de grano húmedo de sorgo	44
1.1. Humedad y actividad hídrica.....	44
1.2. pH.....	45
1.3. Contaminación fúngica de los ensilados.....	45
1.4. Contaminación de los ensilados con micotoxinas.....	50
2. Ecofisiología de cepas toxicogénicas.....	51
2.1. Velocidad de crecimiento.....	50
2.1.1. <i>Fusarium graminearum</i>.....	50
2.1.2. <i>Fusarium nygamai</i>.....	53
2.1.3. <i>Aspergillus flavus</i>.....	55
2.2. Producción de micotoxinas.....	57
2.2.1. Tricotecenos.....	57
2.2.2. Fumonisinias.....	58
2.2.3. Aflatoxinas.....	60
DISCUSIÓN.....	62
1. Ensilados de grano húmedo de sorgo	62
2. Ecofisiología de cepas toxicogénicas	67
CONCLUSIONES.....	71
BIBLIOGRAFÍA.....	73
ANEXO I – Silos de grano húmedo de sorgo.....	95
ANEXO II – Selección de cepas toxicogénicas.....	96
ANEXO III – Medios de cultivo.....	97

INTRODUCCIÓN

En Uruguay, la producción ganadera se ha intensificado en los últimos años, lo que ha llevado a la búsqueda continua de nuevas estrategias que permitan mejoras en la competitividad (Rovira & Velazco, 2012). Esto conlleva al desarrollo de avances tecnológicos que permitan intensificar los sistemas de producción de carne o leche, para lo cual es necesario incrementar la disponibilidad de alimentos para el ganado. Una de las estrategias tecnológicas utilizadas es la producción de ensilajes que aporten energía para balancear dietas, principalmente para complementar y/o sustituir las pasturas naturales cuando estas son escasas. Esta técnica permite conservar granos con alta humedad dentro del mismo predio en el que se va a utilizar, lo que permite manejar la ingesta de energía en cantidades y momentos deseados por el productor. Es así que se han comenzado a usar silos de grano húmedo como suplemento alimenticio para el ganado, siendo ésta una práctica muy difundida en nuestro país (Chalkling, 2016; Acosta, 2010^a).

1. Silos de grano húmedo

El ensilado es uno de los procesos más antiguos aplicados a la preservación de alimentos. Existen evidencias de que esta técnica ya era utilizada en el antiguo Egipto, y luego por los griegos y romanos. Sin embargo, fue a partir de 1950 que su uso aumentó considerablemente en áreas templadas en el mundo debido al inicio de la producción ganadera intensiva. En la actualidad, es considerada una de las prácticas más apropiadas para preservar el valor nutricional de la alimentación animal (Alonso *et al.*, 2013; Cheli *et al.*, 2013; Pelhate, 1977).

Se define como silo de grano húmedo al grano cosechado y almacenado sin previo secado, con una humedad comprendida entre 27 y 32%, en condiciones de anaerobiosis (Chalkling, 2016; Acosta, 2010^b). Esta alternativa de almacenamiento de alimentos con destino al consumo animal se basa en mantener el valor nutritivo del producto minimizando los procesos de degradación o el ataque de organismos indeseados, garantizando la conservación del mismo. Además, permite una mayor retención de energía (ácidos orgánicos, azúcares y fibras digestibles), proteínas y otros nutrientes, de mejor calidad que en el grano seco, que pueden ser eficientemente usados por los animales, implicando un menor costo y una menor

dependencia de factores externos (Baldi *et al.*, 2008; Scarpitta, 2008). Los granos destinados para este tipo de uso son principalmente el maíz y el sorgo, debido a la productividad que presentan dichos cultivos, a la adaptación a la nutrición animal y al valor que tiene el grano en el mercado, ya que existen otras opciones más costosas (Chalkling, 2016). Estos cultivos, alcanzan su madurez fisiológica, en donde se registra un corte del flujo de savia hacia el grano, antes de la madurez comercial, presentando una humedad de aproximadamente 35%. En este momento, el grano ha alcanzado su máximo peso seco, con la más elevada cantidad de nitrógeno y carbohidratos. Desde el punto de vista de la calidad nutritiva del producto, el almidón de los granos presenta una tasa de digestión mayor debido a la mayor accesibilidad que tienen las enzimas hacia los gránulos de almidón, que en condiciones de humedad mayores al 30% se encuentran en estado amorfo y altamente digestible en rumen e intestino. Al cosechar los granos en este momento, para luego ensilar, nos estamos asegurando cosechar el máximo contenido de nutrientes por hectárea, obteniendo nutrientes de buena calidad que permiten una buena digestibilidad. Conjuntamente con las ventajas desde el punto de vista nutricional, la cosecha anticipada del grano respecto a la cosecha del grano seco permite la liberación anticipada del terreno cultivado y ahorro de flete, además de evitar pérdidas de rendimiento provocadas por condiciones climáticas adversas y aves (Montiel & Depetris, 2007). Por otra parte, la humedad en el grano también es imprescindible para que se den los procesos de fermentación que llevan a que se den las condiciones de ensilado adecuado (Chalkling, 2016).

1.1. Proceso de ensilaje

El ensilaje es una técnica de conservación de cultivos basada en una fermentación láctica natural bajo condiciones de anaerobiosis. Para esto se requiere de un ambiente libre de oxígeno y de una humedad óptima, siendo muy importante la humedad inicial del grano (no son recomendadas humedades de cosecha inferiores al 22%), además de un adecuado compactado de los granos. La fermentación en sí, es un proceso catabólico de oxidación parcial que no requiere oxígeno y que produce una degradación incompleta del sustrato, acumulándose subproductos finales. Esta fermentación láctica espontánea es producida por los microorganismos presentes en el tejido vegetal almacenado, que comienzan a degradar los carbohidratos solubles del material ensilado, produciendo ácidos grasos volátiles, que

alterarán el medio acidificándolo hasta un pH de 4 aproximadamente. Esto inhibe el crecimiento de microorganismos que pueden degradar los granos o pueden producir toxinas, como es el caso de los hongos, evitando así la pérdida nutricional del grano y/o prevenir la contaminación del mismo con micotoxinas que presenten un riesgo sanitario importante en la salud animal (Chalkling, 2016; Dunière *et al.*, 2013).

Un exitoso proceso fermentativo asegura un buen producto, con mínimas pérdidas económicas. Para esto, el proceso de ensilado debe ser cuidadosamente controlado en cada una de sus etapas, iniciando al momento de la cosecha con el control de humedad del material cosechado. Luego, controlando el quebrado del grano y adecuado llenado, compactado y sellado del silo para así eliminar la mayor parte del oxígeno presente, prosiguiendo con un correcto almacenamiento y posterior apertura para la alimentación animal. En Uruguay, el método mayormente utilizado es el de silo bolsa o silobag, que permite un alto porcentaje de aprovechamiento del silo (aproximadamente 90%), además de realizar el quebrado y compactación del grano al mismo tiempo, lo que ofrece una importante simplicidad operativa, además de permitir una mayor hermeticidad a la penetración de oxígeno (**Figuras 1 y 2**) (Chalkling, 2016; Dunière *et al.*, 2013).



Figura 1. Proceso de llenado del silo bolsa (quebrado y compactado simultáneo)
Fuente: Scarpitta, 2008.



Figura 2. Silo bolsa terminado
Fuente: Rovira & Velazco, 2012.

Una vez que el material ha sido quebrado y compactado dentro de los silos, comienzan dentro de los mismos importantes cambios bioquímicos, fisicoquímicos y microbiológicos que llevarán a la conservación del material. Este proceso puede dividirse en 4 etapas (**Figura 3**) (Chalkling, 2016; Dunière *et al.*, 2013; Acosta, 2010^a):

- 1- Respiración residual (aeróbica)**
- 2- Fermentación heteroláctica**
- 3- Fermentación láctica**
- 4- Estabilización**

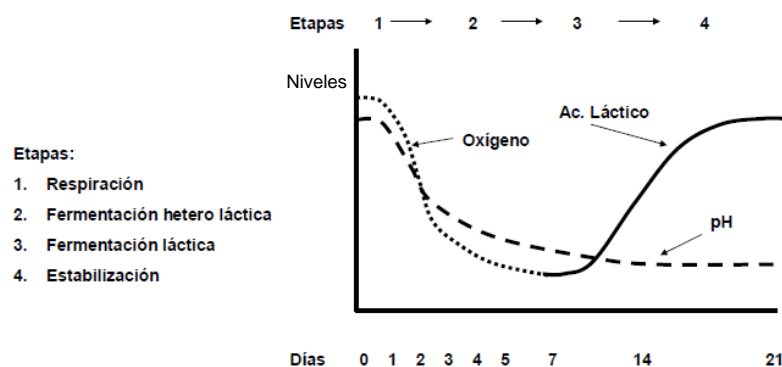


Figura 3. Esquema del proceso de ensilado (se detallan principales variables involucradas, y tiempo de duración) Fuente: Acosta, 2010^a.

1- Respiración residual (aeróbica)

Este primer paso se debe a los procesos enzimáticos de las células vegetales intactas y a la respiración de microorganismos presentes en los granos en el momento del ensilado (hongos filamentosos, levaduras y bacterias), lo que lleva a que el oxígeno atrapado en la masa del grano compactado sea consumido. Este proceso dura aproximadamente 2 o 3 días (día 2-3 de ensilado).

2- Fermentación heteroláctica

A medida que se va agotando el oxígeno, va disminuyendo la actividad de microorganismos aeróbicos estrictos (hongos filamentosos, algunas bacterias), dejando lugar a los microorganismos facultativos y anaeróbicos (levaduras, algunas bacterias), que comienzan a realizar procesos de fermentación de azúcares simples solubles presentes en los granos, produciéndose principalmente ácido láctico, CO₂ y etanol. En esta etapa, comienza a disminuir el pH, pudiendo observarse una reducción de hasta pH 6, lo que promueve aún más

la inhibición del desarrollo de microorganismos aeróbicos. Esta etapa dura aproximadamente 4 o 5 días (día 6-7 de ensilado).

3- Fermentación homoláctica

Para que la fase anterior se desarrolle con éxito, los microorganismos capaces de consumir oxígeno deberán consumir todo el oxígeno que pudiera haber quedado atrapado durante el proceso de compactación. Al no haber remanente de oxígeno, disminuirá la actividad de los mismos, por lo que en esta etapa de fermentación homoláctica los microorganismos actuantes serán exclusivamente anaeróbicos, y se logrará una acidificación gradual del silo. Esta acidificación promueve la proliferación de bacterias ácido-lácticas, que se convertirán en la población predominante. Esto permitirá acelerar los procesos de fermentación y producción de ácidos, acumulándose principalmente ácido láctico, y en menor medida ácido acético. Esta fase dura algunas semanas, y se observa una brusca reducción del pH pudiendo llegar a valores de entre 3,8 y 4,5.

4- Estabilización

La acumulación de ácidos provoca que los microorganismos reduzcan lentamente su actividad, por lo que el material entra en una fase de estabilización, en donde ocurre quiescencia microbiológica. El proceso de inactivación de estos microorganismos se da aproximadamente entre los 14 y 21 días de ensilado, y el pH se mantiene estable alrededor de 4.

Luego de estabilizado el silo, puede comenzar una quinta fase, la fase de deterioro aeróbico, que puede darse por la apertura del silo o por rotura de la bolsa por insectos, animales o inclemencias del tiempo, lo que lleva a que el material entre en contacto con el aire. Por otra parte, si se realiza una mala compactación del grano, también pueden darse reacciones indeseadas debido a la excesiva presencia de aire. En ambos casos, el silo entra en contacto con el oxígeno. Dependiendo de la densidad, porosidad y compactado del material ensilado, el oxígeno penetra a través de las partículas del silo, promoviendo la multiplicación de microorganismos aeróbicos o facultativos que degradan los ácidos grasos volátiles, lo que aumenta levemente el pH. Al ascender el pH, entran en acción otros microorganismos que provocan el deterioro del grano almacenado, pudiéndose encontrar en esta etapa el desarrollo de hongos filamentosos, levaduras y bacterias que promueven procesos indeseados, tales como degradación de los granos por consumo de nutrientes, producción de toxinas o

fermentaciones cuyos productos alteran la calidad del silo (Chalkling, 2016; Dunière *et al.*, 2013; Rovira & Velazco 2012).

La **Figura 4** resume la evolución teórica de los principales parámetros fisicoquímicos de un silo correctamente procesado, como así también su población microbiana.

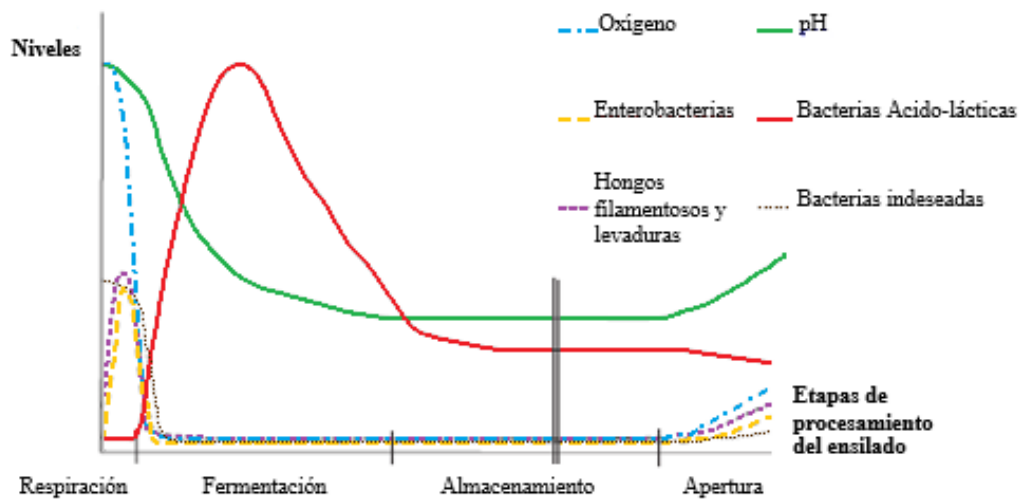


Figura 4. Cambio teórico en el contenido de oxígeno, pH y diferentes poblaciones microbianas en las diferentes etapas del ensilado. Fuente: Dunière *et al.*, 2013.

1.2. Ensilados de sorgo de grano húmedo

En Uruguay, el grano de preferencia para ensilar es el sorgo, ya que presenta ventajas interesantes respecto al maíz en lo que se refiere al bajo costo, versatilidad y menor riesgo, combinado con la rusticidad y buen comportamiento del cultivo en zonas marginales (Rovira & Velazco, 2012). Si bien el grano de maíz tiene un mayor valor nutritivo que el sorgo, no se han encontrado diferencias significativas en parámetros productivos como la ganancia de peso o la producción y calidad de carne y leche para niveles de suplementación de la dieta menores al 40%. En estos casos, resulta más importante la producción de mayor cantidad de suplemento más que el grano suministrado y su presentación física (Scarpitta, 2008). Por otra parte, el grano de sorgo tiene el potencial para producir un excelente ensilaje ya que dispone de suficiente cantidad de azúcares simples, que son utilizados como sustrato por las bacterias fermentadoras, lo que permite un buen proceso de ensilaje. Además, contiene bajos niveles de proteína cruda, nutriente que en altas concentraciones actúa dificultando el rápido descenso

del pH (Rovira y Velazco, 2012). A esto se agrega que el sorgo presenta menor costo con respecto al maíz, y es el grano que más responde al procesamiento, presentando mejoras hasta un 15% con respecto al grano seco, ya que aumenta su digestibilidad (Baldi *et al.*, 2008).

El sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) es una gramínea tropical que se originó en África hace alrededor de 3000-5000 años. A través de programas de mejoramiento, se han desarrollado variedades que han permitido su cultivo en todo el mundo, especialmente en zonas templadas, siendo el quinto cereal cosechado a nivel mundial (Taylor & Belton, 2002). Su producción está mayormente asociada a la alimentación animal, aunque en algunos países se utiliza para consumo humano, producción de bebidas, alcohol y productos industriales (Dicko *et al.*, 2006; Amusa & Falola, 2004).

Es una planta muy similar al maíz en muchos aspectos, como su estructura, crecimiento, apariencia general y época de cultivo, siendo ambos cultivos de verano. Sin embargo, presenta múltiples ventajas frente a este cultivo (Undersander, 1990). El sorgo es un cultivo rústico que se adapta a diferentes tipos de suelo, con una gran tolerancia a condiciones de sequía debido a su menor requerimiento de humedad. Es más eficiente en el uso de agua que el maíz debido a su particular sistema radicular extensivo, con raíces fibrosas, muy numerosas, extremadamente ramificadas, tanto en superficie como en profundidad, que extrae los elementos nutritivos y agua a una superficie foliar funcional que es aproximadamente la mitad de la del maíz. Por otra parte, presenta mecanismos y características morfológicas que le permiten conservar la humedad frente a condiciones de estrés hídrico, como la reducción de la transpiración mediante el enrollamiento de sus hojas y cierre de estomas, producción de niveles de cera epicuticular más elevados de lo normal que reducen las pérdidas de agua por evaporación, y numerosos estomas pequeños (50% más que el maíz, un tercio más pequeños) que le permiten un control muy eficiente del intercambio gaseoso con el exterior. Estas características le brindan al sorgo resistencia a la sequía, pudiendo pasar períodos críticos en un estado casi latente, pudiendo reanudar su actividad cuando las condiciones vuelvan a ser favorables. También parece tener mayor capacidad que el maíz para ajustarse osmóticamente al estrés hídrico mediante la acumulación de azúcares y aminoácidos en las células, lo que le permite retener el agua y mantener la presión de turgencia. Se ha demostrado que el sorgo presenta mayores rendimientos que el maíz bajo condiciones de sequía (Irigoyen & Perrachon, 2007; Taylor & Belton, 2002). Por otra parte, el sorgo presenta las flores femeninas y masculinas en una misma panoja, a diferencia del

maíz que se encuentran en diferentes partes de la planta, por lo que el 95% de las flores son auto polinizadas, lo que lleva a mayores rendimientos que el maíz (Undersander, 1990).

Con la aparición de la tecnología del grano húmedo y la siembra directa, este cultivo está sustituyendo al área de maíz debido a las ventajas anteriormente mencionadas. Los fuertes cambios que se están produciendo en la agricultura nacional, así como la intensificación ganadera como respuesta a la competencia por tierras, encuentran en el sorgo una opción interesante para la suplementación animal. Por otra parte, es un cultivo que deja un alto volumen de rastrojo y de lenta descomposición, lo que en siembra directa es una ventaja muy importante. De esta forma se logra incorporar materia orgánica al suelo, permitiendo la recuperación de suelos degradados, actuando como un “mejorador de estructura del suelo”, donde además responde con mayor productividad respecto a otros cultivos de verano (Marsalis, 2011; Irigoyen & Perrachon, 2007).

2. Contaminación microbiológica asociada a los cultivos de cereales

La colonización de las partes aéreas de las plantas empieza tan pronto como sus partes comienzan a emerger de la tierra. Las primeras en colonizarlas son generalmente las bacterias, luego son seguidas por levaduras y finalmente por hongos filamentosos muchos de los cuáles pueden ser patógenos. Éstos mantienen su desarrollo a lo largo de la vida de la planta, pudiendo colonizar los granos incluso antes de emerger las inflorescencias a partir de las cuáles se formarán. Una vez que la planta llega a la senescencia y los granos maduran, ocurren una serie de cambios fisiológicos que llevan a un cambio en la micobiota presente. La cosecha marca luego un profundo cambio en el ecosistema, debido a que se da una importante transición desde las condiciones ambientales fluctuantes del campo a las condiciones relativamente estables del almacenamiento (Lacey & Magan, 1991; Lacey, 1989).

2.1. Hongos

De la gran variedad de microorganismos que colonizan los granos de cereales desde su formación en la planta hasta su utilización o consumo final, los hongos filamentosos son los más importantes. Éstos pueden colonizar los granos en el campo, en diferentes estadios de desarrollo y maduración, dependiendo de las condiciones en las que se encuentre la planta, o bien en las etapas posteriores de almacenamiento o procesamiento. Los principales factores que favorecen el desarrollo de estos hongos son principalmente la temperatura y la humedad, tanto del tejido a colonizar como del ambiente, pero también por otros factores como pH, condiciones del sustrato y concentración de oxígeno presente. La colonización de los granos por hongos filamentosos puede jugar un papel fundamental en la disminución de la calidad nutricional del grano así como también en la contaminación de los mismos por micotoxinas, ya que algunas especies fúngicas que pueden colonizarlos son potencialmente toxicogénicas. Esto lleva a menudo a que ni el grano ni sus derivados sean aptos para consumo humano y/o animal (Pan, 2001).

Según los requerimientos ecológicos, los hongos que contaminan los granos se pueden dividir en tres grupos: de campo, intermedios y de almacenamiento. La distinción se basa principalmente en el momento en que invaden el grano y de las condiciones que requieren para crecer (Lazzari, 1997).

Los hongos de campo que invaden los cultivos lo hacen fundamentalmente mientras éstos están en activo crecimiento, desde las primeras etapas de desarrollo hasta antes de la cosecha. Estos hongos están adaptados a la gran variabilidad de condiciones ambientales a la que están expuestos los cultivos. Requieren para crecer altos contenidos de humedad del grano, mayores al 22%, que corresponden a humedades relativas en equilibrio de 95-100%, altos niveles de oxígeno y bajos niveles de CO₂ (Pan, 2000; Trojanowska, 1991). Esporas y fragmentos de micelio presentes en el suelo, en plantas adyacentes o en residuos contaminados de cosechas anteriores son transportados por el viento, la lluvia e insectos iniciando infecciones en plantas en desarrollo y particularmente en granos inmaduros. El grado de la infección está determinado por el tamaño del inóculo, las condiciones climáticas, daños mecánicos, resistencia y estado nutricional de la planta, daño por otros hongos e infección por invertebrados (Mills, 1989). Estos hongos pueden ser saprófitos o patógenos, provocando daño a los granos que colonizan y a las plantas que crecen a partir de éstos,

pudiendo llegar a causar grandes reducciones en el rendimiento de la cosecha. La invasión por estos hongos puede iniciarse de forma asintomática, pero a medida que avanza la colonización comienzan a aparecer cambios en el aspecto de los granos que indican la presencia del hongo (Fornier de Serres, 1997; Schmidt, 1991). Son muchos los hongos que pueden colonizar los granos en esta etapa, pero los comúnmente encontrados son especies de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium* y *Drechslera*. Estos hongos pueden causar entre otros problemas, disminución de la germinación y decoloración de los granos, además de la producción de micotoxinas, todo lo cual reduce la calidad del grano (**Figura 5**) (Chelkowski, 1991; Meronuck, 1987, Lacey, 1989).

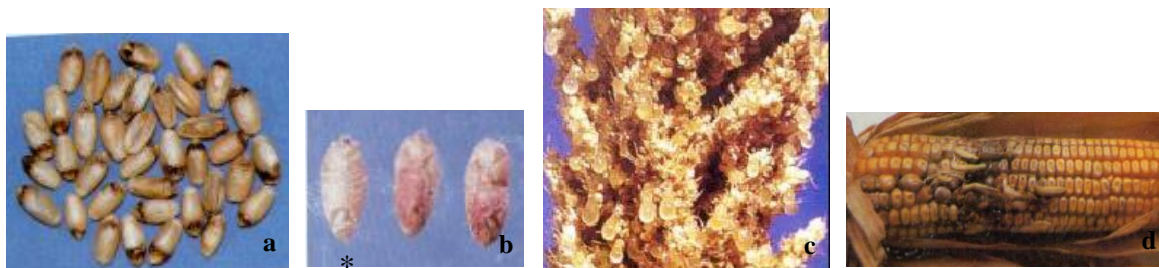


Figura 5. Granos de trigo (**a** y **b**), panoja de sorgo (**c**) y mazorca de maíz (**d**) contaminados por hongos de campo. (*) Grano sano. Fuente: Fernández, 2010; Lazzari, 1997.

Los hongos de almacenamiento están presentes en bajo número antes de la cosecha, pero pueden desarrollarse rápidamente durante el almacenamiento (Magan & Lacey, 1988). Estos hongos están sometidos a condiciones mucho más estables, gobernadas principalmente por la disponibilidad de agua del grano (Lacey & Magan, 1991). Requieren para su desarrollo valores de contenido de humedad del grano de 13-20%, correspondiente a humedades relativas en equilibrio de 65-80% y condiciones de bajo porcentaje de oxígeno y alto porcentaje de CO₂ (Lazzari, 1997; Trojanowska, 1991; Meronuck, 1987). Son generalmente saprófitos y pueden generar grandes pérdidas debido a la disminución en la germinación, decoloración, pérdida de materia seca, cambios nutricionales y producción de micotoxinas (Schmidt, 1991; Sauer, 1988). Los hongos más comúnmente encontrados corresponden a especies de *Penicillium* y *Aspergillus* (**Figura 6**) (Scussel, 1998; Trojanowska, 1991). Si la humedad del grano almacenado aumenta por alguna razón, el crecimiento fúngico se hace más vigoroso, dando lugar al calentamiento espontáneo de la masa del grano y al crecimiento de hongos más termotolerantes como *Absidia*, *Rhizomucor* y *Humicola* (Lacey, 1989). De esta manera, dentro de los hongos de almacenamiento podemos encontrar diferentes géneros con diferentes requerimientos ecológicos, que abarcan desde los xerófilos *Eurotium* spp., los

moderadamente xerófilos *Aspergillus candidus* y *Aspergillus flavus*, los ligeramente xerófilos *Aspergillus fumigatus*, los psicotolerantes *Penicillium corylophilum* y *Penicillium rugulosum*, el termófilo *Talaromyces thermophilus* y los hidrófilos *Fusarium* spp. y mucorales, entre otros (Lacey & Magan, 1991).



Figura 6. Granos de maíz (a), trigo (b) y sorgo (c) contaminados por hongos de almacenamiento. Fuente: BCR, 2016; Lazzari, 1997.

La distinción entre hongos de campo y de almacenamiento es relativa, ya que se ha visto que especies de campo pueden crecer en algunos casos en condiciones de almacenamiento y viceversa. Por esta razón, se designó un tercer grupo denominado “hongos intermedios”. Estos invaden los granos antes de la cosecha y continúan creciendo durante el almacenamiento, cuando la humedad de los granos es de 20-25%, con requerimientos de humedad relativa de 85-90%. Dentro de esta categoría se encuentran algunas especies de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Lazzari, 1997). Se han encontrado especies del género *Aspergillus* (hongo de almacenamiento), especialmente *A. flavus*, que pueden crecer en el campo en zonas cálidas o templadas húmedas (Pelhate, 1968).

A pesar de que la separación entre hongos de almacenamiento, intermedios y de campo no es absoluta, los de campo se mantienen bastante diferenciados por sus hábitos de crecimiento y por los daños que pueden causar antes de la cosecha (Lazzari, 1997).

2.2. Micotoxinas

La palabra “micotoxina” deriva de la palabra griega “*mykes*”, que significa “hongo”, y de la palabra latina “*toxicum*”, que significa “veneno”, por lo que la expresión greco-latina “*mykes toxicum*” significa toxina fúngica, o micotoxina (Scussel, 1998; Lazzari, 1997). Este término describe un grupo de metabolitos secundarios de bajo peso molecular, altamente tóxicos aún en bajas concentraciones, producidos por ciertos hongos filamentosos principalmente al final

de la fase exponencial o durante la fase estacionaria de crecimiento (Zain, 2011; Sweeney & Dobson, 1998; Bullerman & Draughon, 1994). Se han identificado más de 300 compuestos muy heterogéneos en cuanto a su estructura molecular, biosíntesis y toxicidad que se clasifican en términos de su vía biosintética, pero sólo unos pocos son responsables de importantes problemas de seguridad alimentaria (Betina, 1989). Son producidos por una gran variedad de especies fúngicas que pueden tener requerimientos ecológicos diferentes, que van desde parásitos obligados y endófitos de plantas, a saprófitos activos en campo y almacenamiento (Dunière *et al.*, 2013; Moss, 1996).

Las micotoxinas pueden estar presentes en granos contaminados con hongos micotoxicogénicos, prevaleciendo en el sustrato aún luego de que el hongo haya desaparecido, como así también en sub-productos elaborados en base a éstos (Dunière *et al.*, 2013). También pueden estar presentes en leche, carne y huevos derivados de animales que consumieron dichos alimentos, siendo la leche el derivado más importante debido a que los niveles transferidos de micotoxinas pueden ser significativos, mientras que en carne y huevos se encuentran en niveles traza (Lazzari, 1997).

Por su diversidad estructural, las micotoxinas pueden actuar sobre diferentes componentes celulares. Entre ellos, un gran número de receptores, ADN, ARN, proteínas funcionales, cofactores enzimáticos y constituyentes de la membrana celular, ocasionando modificaciones en el citoesqueleto, en la diferenciación celular y en la actividad hormonal, así como también en la síntesis de macromoléculas y en los procesos bioenergéticos (Pan, 2000).

Estos compuestos orgánicos biológicamente activos, de amplio espectro, pueden traer aparejados problemas de intoxicaciones al ser consumidos por vertebrados superiores y otros animales, pudiendo provocar cambios patológicos cuyos síntomas se denominan micotoxicosis (Sweeney & Dobson, 1998). Estas patologías pueden variar según la micotoxina en cuestión y la cantidad en que ésta fue consumida. Por otra parte, dentro de una especie dada, la magnitud de la respuesta está influenciada por la edad, sexo, peso, dieta, estado nutricional, exposición a agentes infecciosos y a la presencia de otras micotoxinas y sustancias farmacológicamente activas (Steciow, 2011; Cullen & Newberne, 1994). Los humanos y animales pueden estar expuestos a las micotoxinas vía ingestión, contacto con la piel o inhalación, provocando intoxicaciones agudas o crónicas (Paterson & Lima, 2010). Las intoxicaciones agudas se producen por el consumo de cantidades relativamente altas de micotoxinas. Éstas se expresan mediante la aparición de síntomas específicos y claros, tales

como hemorragias, necrosis, daños hepáticos, nefrológicos, neurológicos, pulmonares y gastrointestinales, entre otros, que pueden llegar a provocar la muerte (Moreno, 2011; Steciow, 2011; Sweeney & Dobson, 1998). Las intoxicaciones crónicas se deben al consumo prolongado de concentraciones bajas de micotoxinas. La sintomatología de éstas muchas veces se produce a largo plazo y puede ser inespecífica y confundida con otras enfermedades, encontrándose supresión del sistema inmune, aumento de infecciones y desbalances metabólicos y hormonales que enmascaran estas micotoxicosis. También podemos encontrar efectos teratogénicos, mutagénicos, carcinogénicos, estrogénicos, eméticos y alucinógenos. Otros efectos pueden ser problemas en el crecimiento, desarrollo, reproducción y desempeño del animal afectado, como por ejemplo, la producción de carne y leche (Dunière *et al.*, 2013; Moreno, 2011; Hussein & Brasel, 2001; Lazzari, 1997; Moss, 1996; Goto, 1990; Kurata, 1990).

A causa del riesgo que implica la ingestión de alimentos contaminados, muchos países cuentan con legislaciones específicas en cuanto a los niveles máximos permitidos en granos, raciones y otros productos alimenticios dependiendo del uso y destino que se le vaya a dar al producto.

La presencia de micotoxinas en granos y alimentos es un problema de gran importancia a nivel mundial no solo debido a los efectos que puedan causar a nivel de la salud humana y animal si no también por las pérdidas que se producen en cuanto a la utilización y comercialización de los mismos. Se han identificado una gran cantidad de micotoxinas diferentes, sin embargo, las que se encuentran frecuentemente como contaminantes naturales de alimentos son: aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, fumonisinas y tricotecenos entre otros (Gimeno & Martins, 2011). Estas micotoxinas presentan en menor o mayor grado una serie de cuadros clínicos patológicos, trastornos y efectos tóxicos en los animales, por lo cual ocupan un lugar importante (Elmholt, 2008).

Una importante consecuencia del crecimiento fúngico en los granos es la producción de micotoxinas. Si no hay crecimiento fúngico no habrá producción de micotoxinas, pero la presencia del hongo no necesariamente implica la producción de toxinas, ya que pueden o no darse las condiciones adecuadas o ser las cepas de los hongos existentes no toxicogénicas. Sin embargo, la ausencia del hongo no significa que no haya micotoxinas en dicho sustrato, ya que puede ser que el hongo toxicogénico haya estado presente pero que se haya muerto (Santin, 2008).

Más allá del riesgo directo que presentan las micotoxinas en la salud humana o animal, las pérdidas económicas y las implicancias en torno a las micotoxicosis son enormes. Reducir éstas en los alimentos no solo reduce las pérdidas económicas en cuanto a los cuidados sanitarios, sino que brindan ventajas en relación al comercio internacional, como por ejemplo, con los mercados europeos. Dichos países presentan estrictos límites de micotoxinas en productos que ingresan a éstos, por lo que es fundamental la capacidad de cada país de poder proteger sus productos de la contaminación con micotoxinas (Wagacha & Muthomi, 2008).

3. Factores que condicionan la colonización fúngica y producción de micotoxinas

Los hongos pueden desarrollarse debido a diversos factores que pueden ser intrínsecos (inherentes al sustrato) o extrínsecos (inherentes a las condiciones en torno al sustrato) (Scussel, 1998). Tanto antes de la cosecha como en el almacenamiento, el crecimiento de los hongos va a estar determinado principalmente por el entorno, especialmente por la disponibilidad de agua, la temperatura, la composición gaseosa y la interacción con otros microorganismos, como así también la cepa fúngica en cuestión (Scussel, 1998; Lacey, 1989). A esto se le agrega el tiempo de almacenamiento, nivel de impurezas y sustancias extrañas, insectos y condiciones físicas y sanitarias del grano. Estos factores también son muy importantes para la producción de micotoxinas (Lazzari, 1997).

3.1. Disponibilidad de Agua

El agua es probablemente el factor más importante en relación a la colonización de los granos por hongos. La disponibilidad de agua determinará si una célula bacteriana puede prosperar o si una espora fúngica puede germinar, y con qué rapidez, como así también su actividad metabólica, actividad respiratoria y velocidad de crecimiento, la cantidad de calor liberado por la respiración, y la modificación de la temperatura a través del calentamiento espontáneo. De esta forma, este factor determinará qué tipo de microorganismo crecerá en determinado

sustrato. De los microorganismos que colonizan los granos, los hongos filamentosos son los que toleran menor disponibilidad de agua, por lo que son los principales causantes del deterioro de los granos (Lacey & Magan, 1991).

La cantidad de agua existente en el ambiente y en el sustrato son factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas. Dependiendo de la humedad presente en el sustrato y la humedad presente en el ambiente, ocurrirá una ganancia o pérdida de humedad del sustrato, que favorecerá o impedirá el desarrollo fúngico (Scussel, 1998). Pero no sólo influye la cantidad de agua del sustrato sino también la forma en que esta se encuentra, si combinada o libre. El agua en forma combinada es aquella que se encuentra como componente de las células del sustrato, que es indispensable para las funciones vitales de la misma, mientras que el agua en forma libre es aquella que se encuentra en la superficie de células y tejidos del sustrato y que no interfiere en los procesos vitales de éstos. Ésta es la fracción de agua que los hongos pueden utilizar (Gimeno & Martins, 2011; Lazzari, 1997). En base a esto, existen tres criterios que se tienen en cuenta para medir la disponibilidad de agua: la humedad relativa de equilibrio (HRE), la actividad de agua (a_w) y el potencial hídrico (Ψ) (Lacey, 1989).

La HRE es más apropiada cuando la humedad controla el crecimiento fúngico (ej. esporulación de un hongo en el grano antes de la cosecha), la a_w y Ψ son mejores indicadores cuando la disponibilidad de agua del sustrato es quien controla el crecimiento (ej. crecimiento de hongos sobre granos almacenados) (Lacey & Magan, 1991).

Los diferentes requerimientos de a_w que presentan los hongos han permitido dividirlos en 3 grupos según sus requerimientos hídricos, pudiendo clasificarse en xerófilos ($a_w < 0,95$), mesófilos ($a_w = 0,95-1$) y higrófilos (solamente $a_w = 1$) (Zak *et al.*, 2004; Pelhate, 1968).

3.2. Temperatura

La temperatura es un factor muy importante que afecta el crecimiento fúngico (Dix & Webster, 1995). Sin embargo, es menos restrictiva que la humedad en relación al crecimiento fúngico y a la producción de micotoxinas (Scussel, 1998). La mayoría de los hongos son mesófilos y crecen a temperaturas entre 5 y 35°C, con crecimientos óptimos entre 20 y 25°C,

dependiendo de la especie. Algunos hongos pueden crecer a mayores temperaturas, denominando a este grupo termotolerantes y termófilos, que pueden crecer a temperaturas mayores a 45°C, mientras que otros pueden hacerlo a muy bajas temperaturas, incluso hasta -3°C, denominándose psicrotolerantes y psicrófilos (Dix & Webster, 1995).

3.3. Efecto de la actividad de agua y temperatura en el crecimiento fúngico y producción de micotoxinas

Los hongos presentan una amplia variedad de a_w a las que pueden desarrollarse, que van desde valores tan bajos como 0,70 a valores cercanos a 1 (Lacey & Magan, 1991). Los hongos denominados de almacenamiento normalmente pueden germinar y crecer a a_w menores que los hongos denominados de campo (**Figura 7**). El desarrollo de éstos depende en gran parte de la disponibilidad de agua, por lo que conforme aumenta la a_w , mayor número de hongos pueden encontrarse. Por otra parte, la germinación de esporas puede darse a a_w ligeramente menores que las requeridas para el crecimiento micelial, mientras que la esporulación suele darse a valores superiores (Lacey, 1989). Sin embargo, los valores de a_w que requieren los hongos para crecer no sólo dependen de la composición del sustrato, sino que también depende de la temperatura. Esto se debe a que el potencial hídrico del sustrato varía dependiendo de la temperatura. Si ésta aumenta, el potencial hídrico del sustrato descenderá, por lo que se observará menor crecimiento. Ocurre lo contrario cuando la temperatura disminuye. Se ha observado que la mayor tolerancia a a_w bajas se da a temperaturas cercanas a la óptima de crecimiento. Debido a esto, podemos decir que la temperatura tiene tanto un efecto directo como indirecto sobre el crecimiento fúngico (Dix & Webster, 1995; Lacey, 1989).

En cuanto a la temperatura, la mayoría de los hongos que se desarrollan en el cultivo antes de la cosecha, crecen bien entre 0 y 30°C, mientras que los hongos que se desarrollan principalmente durante el almacenamiento toleran mayores temperaturas (**Figura 7**). Sin embargo, la mayoría de los hongos crecen entre 10 y 40°C, con una temperatura óptima de crecimiento de 25-35°C. El descenso de la temperatura provoca un enlentecimiento en las reacciones metabólicas de los hongos, por lo que ésta es una medida que se usa frecuentemente para evitar el deterioro. Por otra parte, la actividad metabólica de hongos

presentes en productos húmedos almacenados libera calor, que de no evacuarse puede producir un calentamiento espontáneo, que provocará aún mayor deterioro (Lacey, 1989).

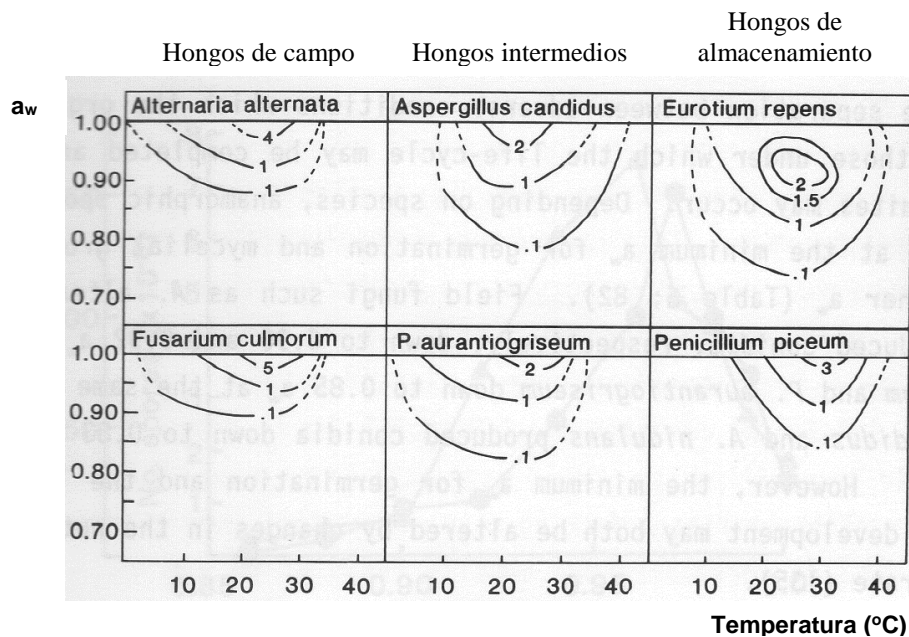


Figura 7. Condiciones de desarrollo de algunos hongos de campo, intermedios y de almacenamiento a diferentes temperaturas y actividades hídricas. Los valores dentro de los gráficos (.1, 1, 2, 2.5, ...) indican el crecimiento del hongo (expresado en mm/día). Fuente: Lacey & Magan, 1991.

En relación a la producción de micotoxinas, si bien los factores que determinan su producción son los mismos que determinan el desarrollo de los hongos (actividad hídrica, temperatura, pH, sustrato y porcentaje de oxígeno disponible), el contenido de humedad del sustrato (a_w) y la temperatura son los dos factores que más inciden. Ambos factores están estrechamente relacionados, siendo la formación de micotoxinas favorecida por condiciones de alta actividad hídrica y temperaturas elevadas (Bullerman *et al.*, 1984). Sin embargo, algunos hongos pueden crecer y producir micotoxinas aún a temperaturas relativamente bajas, como es el caso de algunas especies de *Fusarium* (Mills, 1989). Se ha observado también que las condiciones para la producción de micotoxinas son más restringidas, encontrándose que las condiciones óptimas de producción de micotoxinas en general no coinciden con las condiciones óptimas de crecimiento (Northolt & Bullerman, 1982). Mientras que la mayor parte de los hongos pueden desarrollarse a partir de valores de a_w de 0,70, la producción de micotoxinas es muy baja o nula a a_w inferiores a 0,85 (Tabla 1) (Gimeno & Martins, 2011).

En cuanto a la temperatura, la producción de micotoxinas se da a rangos de temperatura menores que las de crecimiento (**Figura 8**) (Lacey & Magan, 1991). Por otra parte, el efecto que la a_w y la temperatura ejercen sobre la producción de micotoxinas es muy variable, pudiendo diferir incluso para una misma micotoxina producida por distintas especies o diferentes micotoxinas producidas por una misma especie (Velluti, 2002).

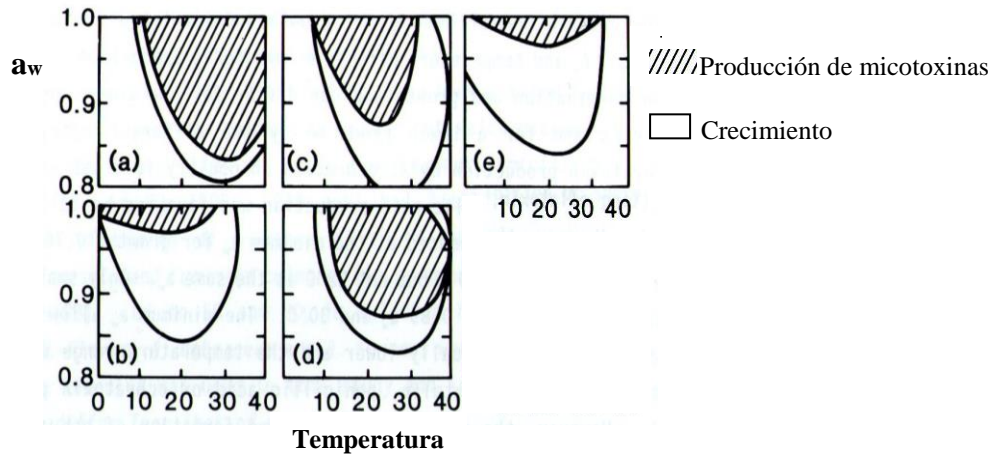


Figura 8. Límites de actividad hídrica (a_w) y temperatura para el crecimiento y producción de micotoxinas. (a) *A. flavus* y aflatoxinas – (b) *A. ochraceus* y ácido penicílico – (c) *P. aurantiogriseum* y ácido penicílico – (d) *A. ochraceus* y ocratoxina A – (e) *P. aurantiogriseum* y ocratoxina A. Las áreas demarcadas en el gráfico representan las condiciones bajo las cuáles estos hongos pueden crecer y producir micotoxinas. Fuente: Lacey & Magan, 1991.

Los hongos son capaces de tolerar un amplio rango de pH (2,5-7,5), desarrollándose mejor a pH moderadamente ácidos más que a pH alcalinos, pudiendo incluso obtener energía a partir de ácidos orgánicos producidos por bacterias durante el proceso de ensilado. Para algunos hongos toxicogénicos se ve favorecida la producción de micotoxinas cuando se encuentran en sustratos ácidos (**Tabla 1**) (Cheli *et al.*, 2013; Gimeno & Martins, 2011). Entre estos podemos destacar los hongos productores de Aflatoxinas, cuya producción óptima se ve favorecida a pH 5-6. Alimentos ácidos o que han sido sometidos a procesos de fermentación pueden ser sustratos propicios para el desarrollo de estos hongos y producción de micotoxinas (Scussel, 1998).

Tabla 1. Valores de temperatura, a_w , y pH para el crecimiento y producción de micotoxinas de algunos hongos toxicogénicos

Especies fúngicas (Micotoxinas)	Temperatura (°C)		a_w óptima		pH	
	Crecimiento	Producción de toxina	Crecimiento	Producción de toxina	Crecimiento	Producción de toxina
<i>Aspergillus parasiticus</i> (Aflatoxinas)	Rango: 10 - 43 Óptima: 32 - 35	12 - 40	0,84	0,87	Rango: 2,1 - 11,2 Óptimo: 3,5 - 8,0	Rango: 3,5 - 8,0 Óptimo: 6,0
<i>A. flavus</i> (Aflatoxinas)	Rango: 10 - 43 Óptima: 32 - 35	12 - 40	0,8	0,82	Rango: 2,1 - 11,2 Óptimo: 3,5 - 8,0	Rango: 3,5 - 8,0 Óptimo: 6,0
<i>A. ochraceus</i> (Ocratoxinas)	Rango: 8 - 37 Óptima: 32 - 35	Rango: 12 - 37 Óptima: 31	0,77	0,85	3,0 - 10,0	N.d
<i>Fusarium</i> spp. (T-2, Deoxinivalenol, Nivalenol, Zearalenona)	24 - 26	24 - 26	0,9	0,9	2,4 a 30°C 3,0 a 25 y 37°C	2,4 - 3,0
<i>Penicillium verrucosum</i> (Ocratoxinas)	Rango: 0 - 31 Óptima: 20	4 - 20	0,8	0,86	Rango: 2,0 - 10,0 Óptimo: 6,0 - 7,0	N.d
<i>P. expansum</i> (Patulina)	Rango: 0 - 40 Óptima: 25 - 35	N.d	0,8	0,95	3,2 - 3,8	3,2 - 3,8

N.d – No determinado.

Fuente: Adaptado de Sweeney & Dobson, 1998

4. Hongos y micotoxinas asociados a los silos de grano húmedo de sorgo

4.1. Micobiota y micotoxinas asociadas al sorgo

Los granos de sorgo pueden ser colonizados por diversos géneros fúngicos durante todo su desarrollo, muchos de los cuáles pueden colonizar además del sorgo diversos cultivos, resultando en granos mohosos o con cambios de coloración (Thakur *et al.*, 2006; Bandopadyay *et al.*, 2000; Ahmed & Ravinder Reddy, 1993). En el sorgo, la contaminación por hongos y micotoxinas son considerados factores bióticos limitantes muy importantes en relación a la producción y calidad del grano (ICRISAT, 1987; Frederiksen *et al.*, 1982). Diversos estudios en diferentes países demuestran que los principales géneros asociados con los granos de sorgo en condiciones de campo, previo a la cosecha, son *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma* y *Curvularia*. También pueden encontrarse en menor medida especies de los géneros *Dreschlera*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Keller *et al.* 2012; Thakur *et al.* 2006; Amusa & Falola 2004; González *et al.*, 1997; Seitz *et al.*, 1983). La infección temprana por algunas especies de estos géneros puede deteriorar el grano, provocando una reducción en la calidad del mismo. Algunos de los efectos de esta

colonización incluyen la reducción en el desarrollo del grano, pérdidas de masa y densidad del grano, decoloración, colonización y degradación del endosperma y germen y una disminución de la capacidad germinativa y vigor de las plántulas. Todo esto puede alterar la calidad del almacenamiento de los granos luego de cosechados, la eficiencia nutricional y las características de procesamiento del mismo. También es probable que los granos se encuentren contaminados con micotoxinas, lo que trae consigo serios problemas tanto sanitarios como económicos (Leslie *et al.*, 2005; Navi *et al.*, 2005; Somani & Indira, 1999; Indira & Rana, 1997; Maiti *et al.*, 1985).

Múltiples estudios han demostrado que las micotoxinas producidas por especies de *Fusarium* son las de mayor implicancia a nivel mundial en cuanto a la contaminación de granos y otros alimentos (Zain, 2011; Elmholt, 2008; Placinta *et al.*, 1999). Dentro de las especies de *Fusarium* que contaminan el sorgo, las que predominan son las pertenecientes al complejo de especies de *Gibberella fujikuroi*, siendo muchas de éstas importantes productoras de fumonisinas. Otra de las especies de *Fusarium* encontrada habitualmente en sorgo es *F. graminearum*, importante productor de tricotecenos como nivalenol (NIV) y deoxinivalenol (DON) (González *et al.*, 1997; Adams, 1977).

4.1.1. Fumonisinias

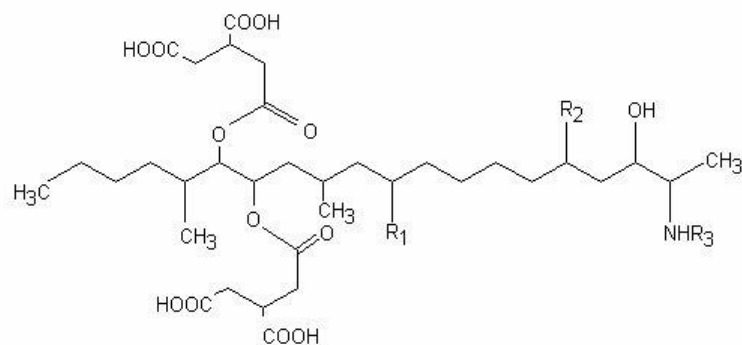
Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas y fitotoxinas producidas por un conjunto de especies de *Fusarium* pertenecientes al complejo *Gibberella fujikuroi*. Dentro de estas podemos encontrar a *F. nygamai*, *F. verticilloides*, *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme*, *F. globosum*, *F. thapsinum*, *F. sacchari*, *F. fujikuroi*, *F. andiyazi* y *F. subglutinans* (Leslie & Summerell, 2006). Muchas de estas especies son importantes patógenos de cereales, principalmente de sorgo y maíz (Fornier de Serres, 1997).

Estas micotoxinas fueron determinadas por primera vez en 1988 a partir de investigaciones en relación a la asociación entre el cáncer esofágico humano y el consumo de maíz contaminado con *F. verticillioides* (Desjardins & Proctor, 2001).

La producción de fumonisinas es más importante en regiones cálidas y está asociada mayormente a años calurosos y secos, y su producción se correlaciona con la incidencia de especies productoras durante la fase de madurez de los cultivos (Visconti *et al.*, 1999). Las principales especies productoras de estas micotoxinas son *F. verticilloides*, *F. proliferatum* y *F. nygamai* (Thiel *et al.*, 1991). Se han identificado hasta el momento 16 compuestos, siendo las de la serie B las más abundantes y conocidas por su toxicidad. La fumonisina B₁ (FB₁) es

la más tóxica y la de mayor incidencia en alimentos contaminados, mientras que las otras fumonisinas de la serie B, menos hidroxiladas, B₂ (FB₂), B₃ (FB₃) y B₄ (FB₄) se encuentran generalmente en bajos niveles (Rodrigues Pozzi *et al.*, 2002; Desjardins & Proctor, 2001).

La estructura química básica de las fumonisinas es de un C-20, diéster del ácido propano-1, 2, 3-tricarboxílico y un pentahidroxi-icosano conteniendo un grupo amino primario (**Figura 9**) (Sweeney & Dobson, 1998).



Fumonisina	R1	R2	R3
B1	OH	OH	H
B2	H	OH	H
B3	OH	H	H
B4	H	H	H
A1	OH	OH	CH ₃ CO
A2	H	OH	CH ₃ CO

Figura 9. Estructura básica de las fumonisinas.
En el cuadro de abajo se indican los sustituyentes de algunas de ellas.
Fuente: Velázquez, 1996.

Las fumonisinas han sido asociadas con un gran número de micotoxicosis ya que actúan principalmente alterando el metabolismo de los esfingolípidos, siendo los principales inhibidores naturales de dos enzimas involucradas en esta biosíntesis. Su modo de acción se debe fundamentalmente a su estructura química, que presenta una gran similitud con la estructura de algunos precursores de los esfingolípidos (**Figura 10**) (Torres & López, 2010; Scussel, 1998).

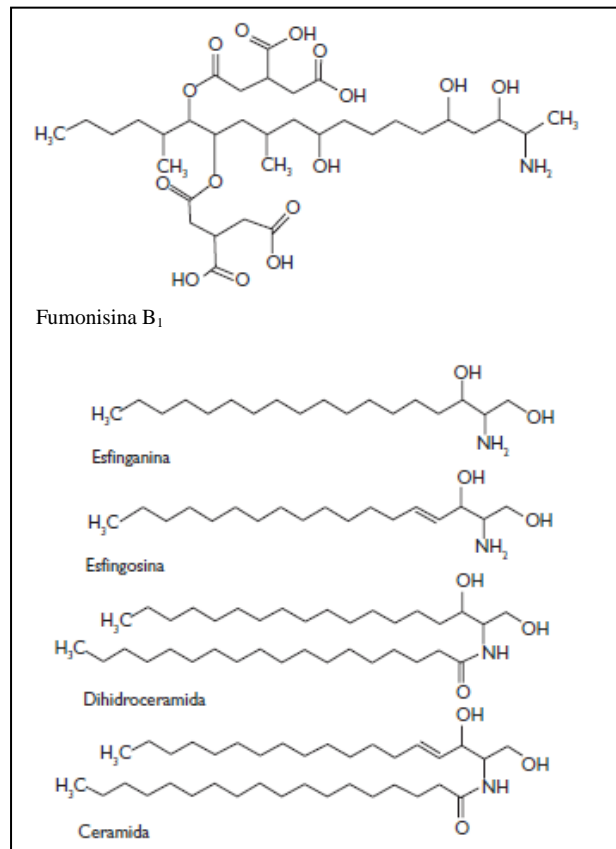


Figura 1. Estructura química de la fumonisina B₁ y los esfingolípidos. Adaptado de Stockmann-Juvala H y Savolainen K, 2008.³

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA FUMONISINA Y LOS ESFINGOLÍPIDOS

La inhibición de la síntesis de estos compuestos puede tener un profundo efecto sobre la célula, ya que estos lípidos juegan un rol muy importante en la estructura de la membrana, en la comunicación celular, en la interacción intracelular y con la matriz celular y en la regulación de factores de crecimiento (Merrill *et al.*, 1993). Esta inhibición también provoca que aumente la concentración de esfinganina y esfingosina libres (sustratos de las enzimas inhibidas). La acumulación de estos compuestos en las células altera entre, otras cosas, algunos mecanismos de transducción de señales, lo cual también tiene efectos adversos y contribuye a la toxicidad de las fumonisinas (Rodríguez Pozzi *et al.*, 2002; Riley & Norred, 1996; Abbas *et al.*, 1993). Por otra parte, la hidrólisis de la fumonisina B₁ puede producir compuestos que se cree pueden tener efecto tóxico debido a su analogía estructural a las bases esfingoides (Humpf *et al.*, 1998).

Debido a esto, las fumonisinas son micotoxinas que causan severos perjuicios tanto a nivel humano como animal. Algunos de los efectos que pueden producir son leucoencefalomalacia en equinos, edema pulmonar e hidrotórax en cerdos, disminución de peso, atrofia de timo, hiperplasia de conductos y vesícula biliar y necrosis hepática, además de ser hepatotóxicas y hepatocarcinógenas en un gran número de animales (Rodríguez Pozzi *et al.*, 2002; Desjardins

& Proctor, 2001; Gelderblom *et al.*, 2001; Marasas *et al.*, 2001; Velázquez, 1996; Nelson *et al.*, 1993; Harrison *et al.*, 1990; Marasas *et al.*, 1988). En humanos, si bien no existe evidencia directa de las consecuencias de estas micotoxinas, se las ha encontrado asociadas con una alta incidencia de cáncer esofágico, por lo que en el 2003, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) las clasificó como posibles carcinógenos humanos (Grupo 2B) (IARC, 2002). También se ha visto que el consumo de esta micotoxina ha sido asociado a defectos de tubos neurales en recién nacidos debido a que la FB₁ reduce la absorción de folatos en diferentes líneas celulares (Marasas *et al.*, 2004).

Por todas estas razones, se han establecido niveles máximos de consumo para estas micotoxinas. Si bien no existen en Uruguay valores límites reglamentados, se tienen en cuenta los niveles máximo permitidos para la Comunidad Europea, en donde se han establecido valores límites para consumo animal de 4000 µg/kg en granos no elaborados y de 1400 µg/kg y 2000 µg/kg para fracciones de molienda de tamaño de partícula > 500 micras y < 500 micras respectivamente (CE, 2006).

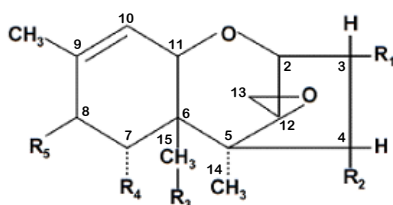
4.1.2. Deoxinivalenol y Nivalenol

Los tricotecenos son una familia muy diversa de compuestos sesquiterpenoides producidos por especies del género *Fusarium* y otros géneros fúngicos como *Trichotecium* (de donde deriva el nombre de estos compuestos), *Stachybotrys*, *Myrothecium* y *Trichoderma*, así como también por plantas superiores del género *Baccharis* (McCormick, 2003; Scott, 1990). Poseen una estructura característica de anillo tricíclico 12, 13-epoxitricotec-9-eno (con un grupo epoxi conformado por el C-12 y C-13 y un doble enlace entre los C-9 y C-10), siendo el grupo epoxi el que le confiere toxicidad al compuesto (McCormick, 2003; Ramos *et al.*, 1997; Basílico, 1995).

Estas micotoxinas pueden agruparse según el tipo de sustituyente en el C-3, en “tricotecenos producidos por *Fusarium*”, que tienen el C-3 oxigenado, y “tricotecenos producidos por otros géneros”, que carecen de dicha oxigenación (McCormick, 2003).

Dentro del grupo de tricotecenos producidos por *Fusarium* podemos encontrar dos subgrupos según el sustituyente que tengan en el C-8 (**Figura 11**) (McCormick, 2003; Sweeney & Dobson, 1998; Basílico, 1995):

- Tricotecenos de tipo A, que pueden tener como sustituyente grupos hidrógeno, hidroxilo o éster (Ej.: T-2, HT-2, diacetoxiscirpenol);
- Tricotecenos de tipo B, que tiene como sustituyente un grupo ceto (Ej.: nivalenol, deoxinivalenol, deoxinivalenol monoacetato).



Tricotecenos	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Tipo A					
T-2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
HT-2	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Diacetoxiscirpenol	OH	OAc	OAc	H	H
Acetil T-2	OAc	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
3'-OH T-2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH ₂ C(OH)(CH ₃) ₂
3'-OH HT-2	OH	OH	OAc	H	OCOCH ₂ C(OH)(CH ₃) ₂
Tipo B					
Deoxinivalenol (DON)	OH	H	OH	OH	=O
Fusarenona-X	OH	OAc	OH	OH	=O
Nivalenol (NIV)	OH	OH	OH	OH	=O
15-acetil DON	OH	H	OAc	OH	=O
3-acetil DON	OAc	H	OH	OH	=O
4,15-diacetil NIV	OH	OAc	OAc	OH	=O

Figura 11. Estructura básica de los tricotecenos. En el cuadro de abajo se detallan los sustituyentes de algunos de los tricotecenos producidos por *Fusarium*.

Mundialmente, los tricotecenos del tipo A y B son los contaminantes más importantes de los granos, encontrándose los del tipo B con más frecuencia que los del tipo A. Éstos merecen mucha atención debido a que son las micotoxinas con mayor actividad inmunosupresora después de las aflatoxinas y pueden presentarse en granos de mucha importancia tanto para la alimentación humana como animal (Devegowda & Murthy, 2008; Lazzari, 1997). Dentro de los tricotecenos de tipo B, los más importantes son nivalenol (NIV) y deoxinivalenol (DON), siendo estos dos últimos los principales tricotecenos encontrados en los granos (Gareis, 1993). DON y NIV difieren entre sí sólo en la oxigenación del C-4 y son producidas por varias especies de *Fusarium*, siendo las especies del complejo de *F. graminearum* y *F. culmorum* las principales especies productoras de estas toxinas en los granos. Otras especies productoras de estos tricotecenos, aunque con menor capacidad, son *F. pseudograminearum*,

F.crookwellense, especies del complejo *F. incarnatum-equiseti* y *F. poae* (Leslie & Summerell, 2006; McCormick, 2003). Estas especies de *Fusarium*, generalmente colonizan los granos cuando éstos se están desarrollando en la planta y producen las micotoxinas bajo condiciones de campo o de almacenamiento si en este último se dan condiciones de baja temperatura (5-15°C) (Cheeke & Shull, 1985).

La contaminación de cereales con estas micotoxinas ha provocado numerosas micotoxicosis en humanos y animales (Yoshizawa & Jin, 1995). Los tricotecenos son compuestos tóxicos que deben su toxicidad no sólo a su grupo epoxi sino a la naturaleza química de sus cadenas laterales (Leal & González de Mejía, 1997). Estos compuestos presentan bajo peso molecular (~200-500D), de forma que pueden difundir rápidamente en las células e interactuar con los ribosomas, más específicamente con el sitio de la subunidad ribosomal 60S que incluye la enzima peptidil transferasa (Ueno, 1984; Carter & Cannon, 1977). Esto provoca un bloqueo de la traducción, que se da en diferentes etapas según el tipo de tricoteceno involucrado (McLaughlin *et al.*, 1977). Por otra parte, el grupo epoxi puede reaccionar con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, afectando el funcionamiento normal de las enzimas. Del mismo modo, hay evidencias de que los tricotecenos pueden unirse a componentes de membrana (Cheeke & Shull, 1985). Se cree que la inhibición de la síntesis de proteínas y la interacción con membranas celulares son los efectos centrales de los tricotecenos en las células y tejidos (Ueno, 1984). Todo esto provoca una amplia variedad de efectos clínicos tanto en humanos como animales afectando principalmente el sistema nervioso, inmunológico y digestivo (Richard, 1998). El grado de severidad de la micotoxicosis va a depender de la toxina en cuestión, el grado y duración de la exposición y de la especie que está expuesta a dicha micotoxina, pero hay algunos síntomas que son comunes a las diferentes especies (Pestka, 2008; Cheeke & Shull, 1985). La exposición aguda a altas dosis provoca diarrea, vómitos, náuseas, rechazo del alimento, leucocitosis, necrosis epitelial, lisis de membranas celulares, abortos y hemorragias, y bajo dosis extremadamente altas pueden provocar la muerte (Miller *et al.*, 2001; Goto, 1990; Cheeke & Shull, 1985; Ueno, 1984). Los tricotecenos también pueden ser tóxicos por contacto, causando escamamiento de la piel, lesiones orales, dermatitis e irritaciones intestinales (Devegowda & Murthy, 2008; Lazzari, 1997). Estas zonas necróticas pueden además ser invadidas por la microbiota normal del organismo, produciendo infecciones que pueden llevar a la muerte (Cheeke & Shull, 1985). En tanto la exposición crónica a los tricotecenos puede causar anorexia, reducción en la ganancia de peso, eficiencia nutricional disminuida, cambios neuroendócrinos, y modulación inmune

(Pestka & Smolinski, 2005; Miller *et al.*, 2001; Goto, 1990; Cheeke & Shull, 1985). Debido a que los tricotecenos inhiben la síntesis proteica y la diferenciación celular, células tales como las hematopoyéticas son más susceptibles que las no proliferativas, por lo que se observa una disminución en el número de eritrocitos y otras células sanguíneas luego de exposiciones prolongadas a estas toxinas (Richard, 1998). Si bien los tricotecenos presentan toxicidad en una amplia variedad de células, las intestinales y linfoides son las que presentan mayor sensibilidad, en comparación con las células renales y hepáticas (Leal & González de Mejía, 1997). Por esta razón, en condiciones de intoxicación aguda se observan daños severos mayormente en tejidos tales como médula ósea, bazo, tejidos linfoides, timo y mucosa intestinal, en células que están en activa división (Devegowda & Murthy, 2008). Los tricotecenos también son conocidos por ser toxinas que provocan rechazo al alimento (Trenholm *et al.*, 1994). Esto se debe a que estos compuestos alteran la neuroquímica del cerebro, provocando un exceso de serotonina, que contribuye a la pérdida de apetito, letargia, somnolencia y pérdida de la coordinación muscular (Prelusky *et al.*, 1992; Prelusky, 1993; Leathwood, 1987.). Además, los tricotecenos son conocidos por su acción como potentes moduladores del sistema inmune, pudiendo ser tanto inmunoestimuladores como inmunosupresivos. A medida que la dosis de micotoxina aumenta, comienza a verse el efecto inmunosupresivo de las mismas, promoviendo la apoptosis de leucocitos, provocando una concomitante inmunosupresión (Pestka, 2008; Richard, 1998).

En general, los humanos y los cerdos parecen ser los más sensibles a DON, mientras que el ganado y las aves son los animales menos sensibles (Scussel, 1998; Prelusky *et al.*, 1994).

Además de ser agentes causales de micotoxicosis, estas micotoxinas son también fitotóxicos muy fuertes, actuando como factores de “virulencia” en algunos granos (Maier *et al.*, 2006; McCormick, 2003).

En la mayoría de los países no existe reglamentación oficial para ningún otro tricoteceno a excepción de DON, que es considerado el tricoteceno de mayor importancia en términos de exposición humana (SCOOP, 2003; Miller *et al.*, 2001). A pesar de su toxicidad relativamente baja en comparación con otros tricotecenos, esta micotoxina constituye de todos modos un gran riesgo debido a su alta frecuencia a nivel mundial, principalmente en alimentos de gran influencia como trigo, maíz y cebada (Hein, 2001). En la **Tabla 2** se muestran las reglamentaciones existentes para DON en algunos países incluido Uruguay.

Tabla 2. Valores máximos permitidos de DON para distintos granos y productos según reglamentaciones de algunos países.

Comunidad Europea	µg/kg
Cereales sin procesar, distintos a trigo duro, avena y maíz	1250
Trigo duro y avena no procesados	1750
Canadá	
Trigo blando sin limpiar nacional	2000
Raciones para ganado y aves de corral	5000
Raciones para porcinos, terneros, ganado lechero	1000
China	
Trigo y harina de trigo, maíz y harina de maíz	1000
Cuba	
Cereales importados	300
EEUU	
Granos y subproductos de granos para rumiantes de carne y bovinos en corral de engorde de más de 4 meses de edad y para gallinas	10000
Granos y subproductos de granos para porcinos	5000
Granos y subproductos de granos para todos los otros animales	5000
Uruguay	
Raciones para bovinos de carne, ovinos y aves	5000
Raciones para bovinos lecheros	2000
Raciones para equinos y porcinos	1000
Raciones para otros animales	2000
Materias primas para raciones	10000

Fuentes: FAO, 2004; MGAP, 2001; MSP, 2001

4.2. Micobiota y micotoxinas asociadas a los ensilados

Los silos, si estos están adecuadamente confeccionados, no presentan condiciones adecuadas para el desarrollo fúngico debido a la ausencia de oxígeno y bajos pH encontrados. Sin embargo, un mal manejo durante su elaboración, almacenamiento o luego de abierto el silo permite que existan zonas con alto contenido de humedad y presencia de oxígeno que son susceptibles de desarrollo fúngico. Los problemas más frecuentes en relación al manejo del silo son el almacenamiento con excesiva o muy poca humedad, mala compactación, pérdida de hermeticidad por roturas de las bolsas, ya sea por efecto de insectos, animales o granizo, que permiten el ingreso de oxígeno o agua, o un mal manejo al retirar el grano del silo, no teniendo las precauciones necesarias para evitar el ingreso de oxígeno al ensilado, entre otros. Todo esto puede provocar un aumento gradual de la humedad u oxígeno en el sustrato, lo que

consecuentemente lleva a una mayor contaminación por diversas especies fúngicas, aumentando la probabilidad de que algunas de las cepas desarrolladas sea potencialmente toxicogénica (Chalkling, 2016; Gimeno & Martins, 2011). Consistentemente con estas observaciones, los silos pueden contener una compleja mezcla de micotoxinas (Cheli *et al.*, 2013). Existen estudios en ensilados de maíz que demuestran que existe contaminación fúngica en la mayoría de los casos, siendo *Aspergillus*, *Penicillium*, y *Mucor* los principales géneros encontrados (Cheli *et al.*, 2013; Keller *et al.*, 2012; Reyes-Velázquez *et al.*, 2006, El-Shanawany *et al.*, 2005). Dentro del género *Aspergillus*, que es el más frecuentemente encontrado, la especie más prevalente es *A. flavus*, la cuál es un importante productor de aflatoxinas (Cheli *et al.*, 2013; El-Shanawany *et al.*, 2005).

4.2.1. Aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos fúngicos altamente tóxicos siendo las micotoxinas más importantes y más conocidas a nivel mundial (EFSA, 2012, Frisvad, 1995; Abramson, 1991). Son producidos principalmente por especies de *Aspergillus* sección *Flavi*, siendo predominante la producción por *A. flavus* y *A. parasiticus* (Peterson *et al.*, 2001). Estas micotoxinas comprenden un grupo de compuestos heterocíclicos estructuralmente relacionados pertenecientes al grupo de difuranocumarinas producidas por la vía de los policétidos (Flores *et al.*, 2015; Peterson *et al.*, 2001; Abramson, 1991). Dentro de este grupo, existen 20 tipos de aflatoxinas conocidas, pero sólo B₁, B₂, G₁ y G₂ son encontradas comúnmente en alimentos (**Figura 12**) (MFDS, 2010). Las aflatoxinas B₁ y G₁ son resultado del metabolismo de los hongos micototoxicogénicos, mientras que B₂, y G₂ se forman a partir de las anteriores, respectivamente, en medios fuertemente ácidos (Juan *et al.*, 2007). Dentro de estos compuestos, la aflatoxina B₁ (AFB₁) es la sustancia más tóxica conocida, tanto en términos de toxicidad aguda como crónica, siendo la sustancia hepatotóxica más potente encontrada, además de ser un importante genotóxico y el carcinógeno natural más potente conocido (Flores *et al.*, 2015; Zain, 2011; Squire, 1981). Por esta razón, ha sido clasificada por la IARC como carcinógeno Grupo 1 para humanos (IARC, 1993). También es la toxina mayormente producida por cepas productoras de aflatoxinas (Squire, 1981).

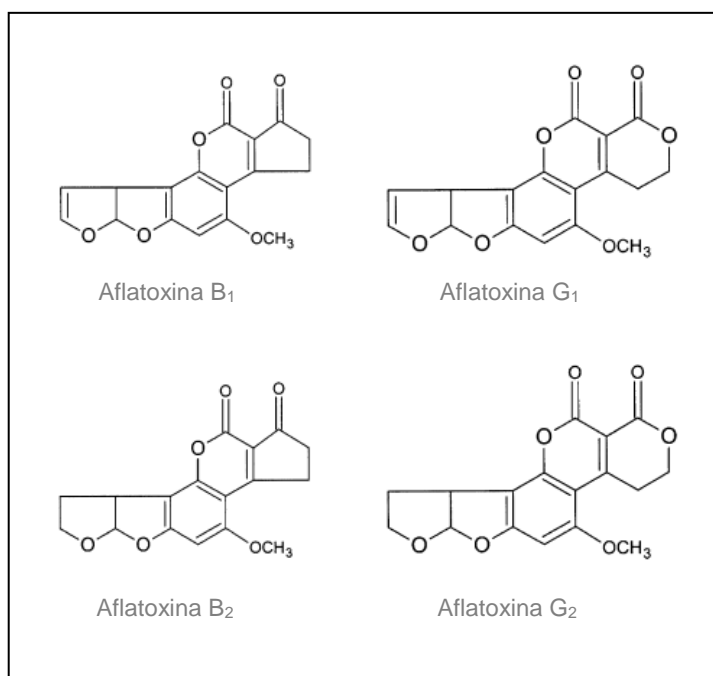


Figura 12. Estructura de Aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂.
Fuente: Zain, 2011.

La exposición a aflatoxinas es típicamente mediante la ingestión de alimentos contaminados, ya que a nivel dérmico, la absorción es muy lenta y poco significativa. Estos compuestos son considerados importantes inmunosupresores, hepatotóxicos, mutagénicos, teratogénicos, y carcinógenos. Dentro de los principales efectos que tienen estas micotoxinas, podemos encontrar cáncer de hígado tanto agudo como crónico, ya que éste es el principal órgano blanco de esta micotoxina. La AFB₁ se absorbe en el intestino delgado y se transporta por los glóbulos rojos y proteínas plasmáticas hasta el hígado. Esta toxina entra en la célula, donde es activada por enzimas del citocromo p450 del retículo endoplasmático, convirtiéndose en epóxidos-8,9-AFB₁. Estos compuestos presentan afinidad por diversas macromoléculas como ácidos nucleicos y proteínas, a las que se une covalentemente, lo que puede dar lugar a interrupciones en la transcripción y traducción, respectivamente. Éstos epóxidos pueden ser luego transferidos al riñón, donde producen un importante efecto carcinógeno mediante la generación de peroxidasas en este órgano (**Figura 13**) (Fink-Gremmels, 2008; Riley & Petska, 2005; Galtier, 1999; Massey *et al.*, 1995; Eaton & Gallagher, 1994).

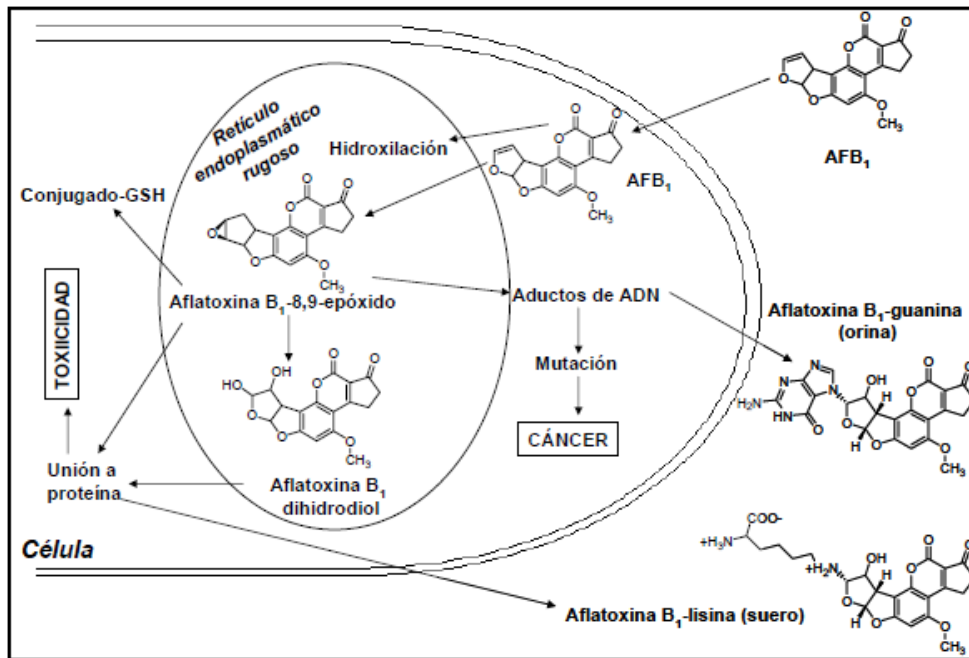


Figura 13. Mecanismo de acción de Aflatoxina B₁
Fuente: Juan, 2008.

En el ganado, la mayoría de las especies expuestas a esta toxina pueden desarrollar hepatitis aguda y enfermedades hemorrágicas. También puede observarse una reducción en la eficiencia alimenticia y en el metabolismo ruminal, disminuyendo la digestión de celulosa, la producción de ácidos grasos volátiles y la motilidad ruminal, lo cual lleva a una disminución en la producción y la tasa de crecimiento (Choudhary *et al.*, 1998; Diekman & Green, 1992; Norred, 1986). Por otra parte, también se han evidenciado cambios en órganos tanto a nivel macro como microscópico e inmunosupresión (Norred, 1986).

La presencia de estas aflatoxinas en los alimentos destinados al ganado no sólo es importante debido a los daños que estas pueda causar en el animal, sino también debido a la posible contaminación de la leche con aflatoxina M₁ y M₂ (EFSA, 2004). En el ganado lechero, ocurre la transformación de AFB₁ y AFB₂ en metabolitos hidroxilados, aflatoxina M₁ y M₂ (**Figura 14**), que son encontrados en la leche y productos lácteos derivados de ganado que consumió alimento contaminado (Boudra *et al.*, 2007). Dentro de éstas, la que presenta mayor toxicidad es la aflatoxina M₁, siendo clasificada por la IARC dentro del Grupo 2B (posible carcinógeno humano) (IARC, 1993). Existen reportes de que esta toxina puede ser encontrada en la leche dentro de 12-24 hs. luego de que el animal ingirió el alimento contaminado, pudiendo perdurar hasta 3 días después de la última ingestión. Se estima que entre 1-6% de AFB₁ consumida es transferida a la leche como aflatoxina M₁, dependiendo

del animal, estación de lactación y rendimiento, entre otros factores (EFSA, 2004; Battacone *et al.* 2003; Stoloff, 1997). También se ha observado la presencia de aflatoxina M1 en leche materna proveniente de madres que consumían dietas contaminados con aflatoxina B1 (Navas *et al.*, 2005; Turconi *et al.*, 2004). Por otra parte, también se ha encontrado aflatoxina M1 en huevos y productos derivados (Abramson, 1991).

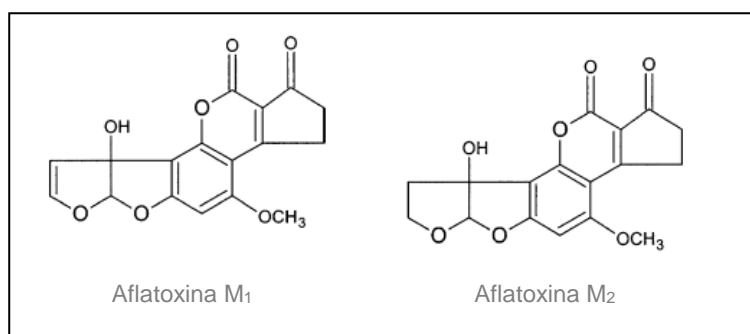


Figura 14. Estructura de Aflatoxina M₁ y M₂.
Fuente: Zain, 2011.

Generalmente, la remoción de las aflatoxinas es muy difícil, ya que éstos son compuestos muy estables y resistentes al calor (MFDS, 2010). En la leche, al ser compuestos muy termoestables, no pueden ser destruidos mediante pasteurización, por lo que aparecen tanto en leche pasteurizada como en productos lácteos fermentados (Iha *et al.*, 2013).

Por todo lo anteriormente mencionado, es de mucha importancia contar con alimentos libres de estas micotoxinas, por lo que se han establecido valores límites para las mismas. Si bien en Uruguay existen niveles máximos permitidos para ciertos alimentos destinados a la alimentación humana, no existen niveles para la alimentación animal. Sin embargo, hay una sugerencia en cuanto a los alimentos para vacas lecheras, estableciéndose un límite de 20 µg/kg de aflatoxinas totales para raciones o sus materias primas (INALE, 2012). Esto es de importancia no solo por las implicancias que puede tener en el animal sino también por la biotransformación de las mismas y posteriores transferencias a la leche. Esto limita en gran parte el consumo e importación de leche y subproductos. En Uruguay, el nivel máximo de M₁ permitido en leche es de 0,5 µg/L (RBU, 1994), mientras que mercados tales como la Unión Europea, uno de sus principales exportadores, aceptan valores de aflatoxina M₁ menores a 0,05 µg/L (Flores *et al.*, 2015; De María, 2011).

5. Problemas asociados a los silos de grano húmedo de sorgo

Concomitantemente al uso de los ensilados de grano húmedo de sorgo en la ganadería y lechería, han aumentado los problemas sanitarios y la disminución de la producción. Estos problemas se han asociado con la calidad nutricional del recurso así como también a la contaminación por micotoxinas, ambos debidos al desarrollo de hongos presentes previamente o durante el ensilado (Chalkling, 2016; Saarisalo *et al.*, 2007; McDonald *et al.*, 1997). La presencia de micotoxinas en los ensilados puede producir una disminución en la producción de leche y en casos graves hasta pueden registrarse problemas de fertilidad e incluso la muerte de animales (Chalkling, 2016; Alonso *et al.*, 2013; Franco *et al.*, 2011). También puede verse afectada la calidad de la leche por la presencia de aflatoxina M1. Existen severas restricciones en cuanto a su presencia en leche y derivados, siendo la limitante principal para la exportación de productos lácteos (Carlson *et al.*, 2014). Para Uruguay, la calidad de la leche es y será un factor clave en la competitividad del sector lácteo que presenta un marcado perfil exportador. Por esta razón, se requiere un estricto control de esta micotoxina para obtener productos con criterios de calidad de exportación exigidos por los mercados con mayor poder adquisitivo como lo es la Unión Europea (De María, 2011).

Si bien la técnica de silos de grano húmedo de sorgo se está utilizando ampliamente en Uruguay desde hace ya algún tiempo, existe muy poca información acerca de la contaminación fúngica que puede encontrarse en los granos de sorgo al momento de ensilar y cómo evoluciona en los silos durante el tiempo que están almacenados. Tampoco se conocen los factores relacionados a su presencia o a la contaminación de los silos con micotoxinas. Observar la microbiota presente en estos granos, previo a su ensilado y durante el almacenamiento, permitirá predecir el riesgo de contaminación por micotoxinas que presenta este alimento, además de predecir el nivel de degradación que presentan luego de cierto tiempo de almacenamiento. Por otra parte, evaluar la ecofisiología de las principales cepas toxicogénicas encontradas, permitirá evaluar cuales son las condiciones de desarrollo y de producción de micotoxinas óptimas que presentan las mismas. Conocer la influencia que tienen la interacción entre la a_w y la temperatura en el crecimiento fúngico y producción de micotoxinas nos permitirá entender la ecología de cada especie individual y la interrelación entre ellas. De esta forma, se podrán proporcionar recomendaciones con respecto a las condiciones óptimas de ensilado que permitan reducir las poblaciones de hongos y la

producción de micotoxinas, de modo de mejorar la calidad nutricional y sanitaria del alimento conservado como silo húmedo.

Dado que no existe práctica aislada alguna que, aplicada en un determinado punto de la cadena de producción es capaz de eliminar el problema de la contaminación con micotoxinas o de asegurar su prevención, conocer las condiciones que favorecen su aparición en silos de sorgo húmedo permitirá obtener productos más seguros y que puedan competir en el mercado internacional.

HIPÓTESIS

La composición de especies de la comunidad fúngica y los niveles de micotoxinas presentes en los granos de sorgo irá variando en relación al tiempo de ensilado.

Las cepas toxicogénicas provenientes de los silos requieren diferentes condiciones de humedad y temperatura para su desarrollo y producción de micotoxinas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la evolución de la composición de las comunidades fúngicas y la presencia de micotoxinas presentes en silos de grano húmedo de sorgo y determinar los factores relacionados a su presencia.

Objetivos específicos

- 1) Conocer la población fúngica presente en el sorgo previo al ensilado y durante el tiempo de ensilado.
- 2) Determinar las principales micotoxinas presentes en el sorgo previo a su ensilado y a diferentes tiempos de almacenamiento.
- 3) Conocer las características ecofisiológicas en las cuales se desarrollan y producen micotoxinas las principales cepas toxicogénicas aisladas en los silos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Ensilados de grano húmedo de sorgo

Muestreo

Se analizaron 5 silos de sorgo de grano húmedo provenientes de 5 establecimientos lecheros de los departamentos de Flores y San José confeccionados con sorgo cosechado en la campaña 2011 (en la **Tabla A_Anexo I** se detalla origen, variedad, tipo y nivel de taninos del sorgo utilizado en cada caso). De cada silo se obtuvieron muestras representativas de sorgo antes de ensilar y de sorgo ensilado durante 30, 90 y 180 días, obteniéndose un total de 50 muestras (se detalla cronograma de muestreo en la **Tabla B_Anexo I**). La obtención del material se hizo mediante el uso de un cilindro calador, en tres puntos diferentes a lo largo del silo, a ambos lados. En cada punto se introdujo el calador con diferentes inclinaciones a fin de tomar granos a tres alturas dentro del silo, sección superior, media e inferior (**Figura 15**), tomándose de cada sección aproximadamente 1 kg de material. Dichas muestras fueron luego homogeneizadas y cuarteadas hasta obtener muestras de alrededor de 1 kg, que fueron almacenadas en bolsas de papel. Se determinaron las propiedades físicas una vez recibidas las muestras en el laboratorio y se almacenaron refrigeradas durante el lapso de 1 semana, mientras se procedía a la determinación de la contaminación fúngica. Luego fueron almacenadas a -20°C para su posterior determinación de micotoxinas.

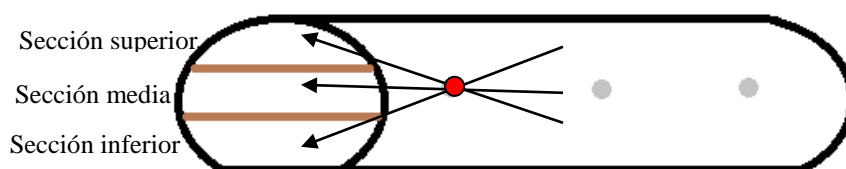


Figura 15. Esquema de muestreo de los silos

Aislamiento e identificación de especies fúngicas

Se tomaron 10 gramos de cada muestra y se mezclaron con 90 ml de agua peptonada al 0.1% por 30 minutos, en un agitador orbital a 150 rpm. Luego se hicieron diluciones seriadas de esta solución, en órdenes de 10^{-2} a 10^{-5} , de las cuales se tomaron alícuotas de 1 ml para ser inoculadas en placas de Petri conteniendo Agar Dicloran-Rosa de Bengala-Clorafenicol (DRBC). La inoculación fue realizada por duplicado. Las placas fueron incubadas a 25°C por

7-10 días, en oscuridad. Solo las placas conteniendo de 10 a 100 unidades formadoras de colonias (UFC) fueron observadas y cuantificadas y los resultados fueron expresados como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de muestra. Una vez contabilizadas, las colonias fúngicas emergentes fueron transferidas a medios específicos para su posterior identificación mediante sus características micro y macromorfológicas de acuerdo las claves de identificación convencionales correspondientes: Ellis (1976), Nelson *et al.* (1983), Klich & Pitt (1988), Klich (2002), Burgess *et al.* (1994), Samson *et al.* (1995) y Leslie & Summerell (2006). Se determinó el porcentaje de las muestras contaminadas con los principales géneros, de la siguiente manera:

$$\% \text{ muestras contam. con género } X = \frac{N^{\circ} \text{ muestras contam. con género } X}{N^{\circ} \text{ total muestras}} \times 100$$

También se determinó la frecuencia relativa de los géneros encontrados a cada tiempo como así también la densidad relativa de los géneros de mayor importancia:

$$\text{Frecuencia relativa} = \frac{N^{\circ} \text{ aisl. de género } X}{N^{\circ} \text{ total de aisl.}} \times 100$$

$$\text{Densidad relativa} = \frac{N^{\circ} \text{ aisl. totales sp. } X}{N^{\circ} \text{ aisl. totales del gro al que pertenece sp. } X}$$

Los aislamientos identificados morfológicamente como *Fusarium graminearum*, *F. nygamai* y *Aspergillus flavus* fueron confirmados mediante técnicas moleculares, ya que posteriormente se seleccionarían cepas de estas especies para estudios ecofisiológicos. Las cepas de *Fusarium* spp. fueron analizadas mediante el uso de los cebadores específicos EF1 (5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3') y EF2 (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3') correspondientes a regiones parciales del factor de elongación 1- α (EF-1 α) de acuerdo a O'Donnell *et al.* 1998. Las cepas de *Aspergillus* spp. fueron analizadas mediante la amplificación de fragmentos de la región transcripcional interna de la subunidad menor ribosomal de la mitocondria ITS1 (5'-TTTCCGTAGGTGAACCTGC -3') y ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), del gen de la β -tubulina Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') y Bt2b (5'-ACCCTCAGTCTAGTGACCC TTGGC-3') y del gen de la calmodulina CL1 (5'-GA(GA)T(AT)CAAGGAGGCCTTC TC-3') y CL2A (5'-TTTTTGCATCATGAGTTGGACO-3'), de acuerdo a Vargas *et al.* 2011.

Para ello el ADN de las cepas fue extraído según el método de Lee & Taylor (1990). Para la reacción de amplificación se utilizaron 25 ng de ADN fúngico, 5 μ L de Buffer 10x, 5 μ L de MgCl (25mM), 1,5 μ L de cada cebador (10 mM), 4 μ L de dNTP(2,5 mM) y 0,25 μ L de Taq Polimerasa Thermo Scientific® (5U/ μ L) en un volumen final de 50 μ L. Para la amplificación el ADN fue inicialmente desnaturalizado a 94 °C por 5 minutos. Luego, se llevaron a cabo un total de 35 ciclos de amplificación en un termociclador (MultiGene Optimax, Labnet international Inc., EEUU) donde cada ciclo consistió en 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto a temperatura de hibridación (55°C) y 1 minuto de amplificación a 72 °C. El último ciclo fue seguido de un último paso de extensión a 72 °C por 10 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron bajo luz UV luego de una electroforesis en gel de agarosa (1,5%), conteniendo el colorante GoodView TM. El tamaño de los amplicones se estimó por comparación con un marcador de peso molecular de 100 pb (Thermo Scientific, Invitrogen C.O., EE.UU). Los productos de PCR obtenidos fueron luego enviados para su secuenciación a MACROGEN Inc. (Seúl, Korea). Las secuencias consenso fueron obtenidas mediante el programa Seqman (Lasergene, Madison, WI) y comparadas con las secuencias almacenadas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) usando la herramienta Nucleotide Blast del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) y con las secuencias almacenadas en la base de datos Fusarium ID (<http://isolate.fusariumdb.org/blast.php>).

Determinación de la humedad y la actividad hídrica (a_w)

Para determinar la humedad, se colocaron 25 gr de cada muestra en placas de Petri y se secaron en estufa a 60° hasta peso constante. El contenido de humedad se determinó como la diferencia entre el peso inicial (25 gr) y el peso final, expresándose como porcentaje de humedad de la muestra (%H). La a_w fue determinada mediante el uso del equipo medidor de actividad hídrica Aqualab CX-2 (Decagon Devices Inc.).

Determinación del pH

Para la determinación de pH de los silos se colocaron 10 gr de silo en un vaso de Bohemia y se le agregaron 100 ml de agua destilada. Esta suspensión fue agitada durante 15 minutos para su homogeneización y luego filtrada para retirar el material particulado. El pH de la

solución filtrada fue determinado mediante el pHímetro Orion Star A211 (Thermo Scientific), a una temperatura ambiente de 21°C.

Determinación de micotoxinas

Dependiendo de las principales especies de hongos toxicogénicos identificados en el silo, se determinaron las posibles micotoxinas presentes en el mismo. Las micotoxinas analizadas fueron fumonisinas y aflatoxinas ya que se encontraron mayormente *Fusarium nygamai* y *Aspergillus flavus*, principales productores de estas micotoxinas, respectivamente.

Las fumonisinas fueron determinadas mediante inmuno-ensayo enzimático (ELISA) competitivo utilizando el kit comercial Ridascreen® Fast Fumonisin (R-Biofarm AG, Darmstadt, Alemania), con un límite de detección de 222 µg/kg. Para ello se mezclaron 25 gr de silo con 125 ml de metanol al 70% en una licuadora a alta velocidad durante 2 minutos y se filtró el extracto a través de un filtro Whatman N° 1. Luego se diluyó el filtrado con agua destilada en una proporción de 1:14. Se sembraron en pocillos de tiras para ELISA 50 µL de cada uno de los estándares y 50 µL de cada uno de los extractos diluidos. Los estándares utilizados corresponden a concentraciones de fumonisinas de 0 µg/kg, 222 µg/kg, 666 µg/kg, 2000 µg/kg y 6000 µg/kg. Luego se agregó a cada pocillo 50 µL del conjugado enzima-fumonisina y 50 µL del anticuerpo anti-fumonisina. Se incubaron los pocillos a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego se descartó el contenido de los pocillos y se le realizaron 3 lavados con agua destilada. Se agregó a cada uno de los pocillos 100 µL de sustrato/cromógeno y se incubaron nuevamente a temperatura ambiente, 5 minutos, en condiciones de oscuridad. Al finalizar este tiempo de incubación se detuvo la reacción mediante el agregado de 100 µL de una solución de H₂SO₄ 1N a cada pocillo y se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de placas Biotek EL301.

La determinación de AFB₁ fue realizada mediante cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Para ello se colocaron 25 gr de silo y 100 ml de acetonitrilo:agua (84:16 v/v) en licuadora a alta velocidad durante 3 minutos. La mezcla fue filtrada a través de papel de filtro Whatman® N°4 y una alícuota de 5 ml de este filtrado se pasó a través de una columna de limpieza MycoSep® 224 (Romer Labs® Inc., Union, MO, EEUU). Dos mililitros de este extracto se llevó a sequedad para luego ser resuspendido en 400 µl de agua:metanol:acetonitrilo a (4:1:1 v/v). Una alícuota de 200 µl fue derivatizada con 700 µl de

ácido trifluoroacético:ácido acético:agua (20:10:70 v/v) y analizada por HPLC de fase reversa (Bomba Shimadzu LC-10ADvp, detector de fluorescencia Shimadzu RF-10 Axl, con longitudes de onda de excitación y emisión de 360 y 440 nm, respectivamente) La columna utilizada fue una columna de C18, de 150 x 4,6 mm y 5µm de tamaño de partícula (Nucleodur®, Macherey-Nagel, Düren, Alemania), conectada a una pre-columna Security Guard (8 x 4 mm, 5µm de tamaño de partícula, Nucleodur®, Macherey-Nagel, Düren, Alemania). La fase móvil utilizada fue una solución de agua:metanol:acetonitrilo a (4:1:1 v/v), con un flujo de 1,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 20 µl y se utilizaron los siguientes estándares: B₁ y G₁ – 50, 100 y 250 µg/kg, B₂ y G₂ – 25, 50 y 100 µg/kg. El límite de detección de la técnica fue de 1 µg/kg.

Análisis de datos

Para el análisis de los datos se realizó un análisis de varianza mediante el test ANOVA. Para comparar el número total de aislamientos, los niveles de micotoxinas y los tiempos de almacenamiento se utilizó el test de Fisher LSD. También se determinó la correlación entre las variables utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software Sigma STAT Versión 2.1 (Chicago).

2. Ecofisiología de cepas toxicogénicas

Selección de cepas

Para los estudios ecofisiológicos se utilizaron 3 aislamientos de *F. graminearum* (Fg1, Fg2, Fg3), 3 de *F. nygamai* (Fn1, Fn2, Fn3) y 3 de *A. flavus* (Af1, Af2, Af3) por ser los hongos toxicogénicos de mayor importancia encontrados en los silos. En el **Anexo II** se detallan las cepas evaluadas.

Producción de micotoxinas por *F. graminearum* y *F. nygamai*

Para la selección de cepas toxicogénicas de *F. graminearum* y *F. nygamai* se utilizó la metodología propuesta por Reynoso *et al.* (2011), con algunas modificaciones. Para ello se colocaron 25 gr de arroz blanco en bolsas de polipropileno y se los humedeció con 10 ml de agua destilada, mezclando bien los granos a fin de proporcionar suficiente humedad a todo el

arroz. Luego se las cerró con tapones de algodón, se las autoclavó durante 30 minutos y se las dejó enfriar al menos 24 hs a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a la inoculación de las bolsas colocando sobre los granos de arroz un disco del cultivo a evaluar. Los cultivos de *F. graminearum* se hicieron crecer en placas de Petri conteniendo Mung Bean Agar (MBA) durante 15 días a 25°C bajo ciclos de 12hs de luz-oscuridad a fin de favorecer la esporulación. Para *F. nygamai* se utilizaron cultivos en placas de Agar-Papa-Dextrosa (APD) incubados a 25°C durante 7 días bajo ciclos de 12hs de luz-oscuridad. Las bolsas inoculadas fueron incubadas a 25°C por 28 días en oscuridad, agitándolas periódicamente a fin de poder homogeneizar el inóculo por todo el arroz. Una vez transcurrido este tiempo, las bolsas fueron guardadas a -20°C hasta su posterior análisis.

Para cuantificar la capacidad de las cepas de *F. graminearum* de producir deoxinivalenol (DON) se utilizó el kit de ELISA competitivo comercial, Ridascreen® Fast DON, de Biopharm, con un límite de detección de 200 µg/kg. Para ello se mezclaron 20 gr de arroz con 400 ml de agua destilada en una licuadora a alta velocidad durante 2 minutos y se filtró el extracto a través de un filtro Whatman N° 1. Se sembraron en pocillos de tiras para ELISA 50 µL de cada uno de los estándares y 50 µL de cada uno de los extractos obtenidos. Los estándares utilizados corresponden a concentraciones de DON de 0 µg/kg, 222 µg/kg, 666 µg/kg, 2000 µg/kg y 6000 µg/kg. Luego se agregó a cada pocillo 50 µL del conjugado enzima-DON y 50 µL del anticuerpo anti-DON. Se incubaron los pocillos a temperatura ambiente por 5 minutos y luego se descartó el contenido de los pocillos y se le realizaron 3 lavados con una solución tampón de fosfatos 10 mM (pH 7,4)-Tween 20 al 0,05 %. Se agregó a cada uno de los pocillos 100 µL de sustrato/cromógeno y se incubaron nuevamente a temperatura ambiente, 3 minutos, en condiciones de oscuridad. Al finalizar este tiempo de incubación la reacción se detuvo mediante el agregado de 100 µL de una solución de H₂SO₄ 1N a cada pocillo y se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de placas Biotek EL301.

Para determinar la producción de fumonisinas por parte de las cepas de *F. nygamai* se utilizó el kit de ELISA competitivo comercial, Ridascreen® Fast Fumonisin (R-Biofarm AG, Darmstadt, Alemania), siguiendo la metodología descrita arriba.

Para ambas especies, se seleccionaron las tres cepas que presentaron mayor producción de micotoxinas.

Producción de micotoxinas por *A. flavus*

Para la selección de cepas de *A. flavus* se utilizó la metodología propuesta por Geisen (1996), con algunas modificaciones. Para ello, se incubaron aislamientos de *A. flavus* en placas de Agar Coco (AC) durante 5 días a 30°C en oscuridad. Luego se colectaron micelio y conidios de las mismas mediante el raspado de la superficie con hojas de bisturí estériles y se transfirieron a tubos Eppendorf. La extracción de aflatoxinas de este material colectado se realizó mediante el agregado de 500 µL de cloroformo y posterior centrifugado a 11000 rpm por 20 minutos. Se extrajo luego la fase clorofórmica y se la transfirió a un tubo limpio, dejando evaporar el extracto hasta sequedad para su posterior resuspensión en 10 µL de cloroformo. Para el análisis de estos extractos por TLC se sembraron 5 µL de los mismos en placas de sílica gel (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Alemania) sin indicador de fluorescencia. También se sembraron en las mismas 5 µL de los estándares de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. La cromatografía se desarrolló a temperatura ambiente en cuba saturada hasta que el frente del solvente alcanzó 10 cm a partir de la línea de siembra. Se utilizó cloroformo:acetona (9:1 v/v) como fase móvil. La presencia de aflatoxinas se determinó mediante la observación de las placas bajo luz UV a una longitud de onda de 365 nm. Se seleccionaron las tres cepas que presentaron mayor producción de AFB1.

Determinación de la velocidad de crecimiento de las cepas seleccionadas

Se determinó el crecimiento de las diferentes cepas toxicogénicas seleccionadas a diferentes actividades hídricas y temperaturas, bajo condiciones de laboratorio. Para esto se utilizaron placas de Agar-Malta (AM) a las que se les modificó la actividad hídrica (a_w) mediante el agregado de diferentes volúmenes de glicerol, evaluándose el crecimiento a actividades hídricas de 0,995 y 0,980. La actividad hídrica de las placas fue verificada mediante el uso del equipo medidor de actividad hídrica Aqualab CX-2 (Decagon Devices Inc.). Las placas fueron inoculadas en el centro e incubadas a 15, 25 30 y 37°C hasta que las colonias alcanzaron el borde de la placa o hasta que no se observó crecimiento durante 2 días consecutivos. Para las cepas de *F. graminearum* y *F. nygamai* se sembraron discos de 7-8 mm tomados a partir del margen de colonias crecidas en APD durante 7 días a 25°C. Para *A. flavus* las placas fueron inoculadas en el centro utilizando una suspensión de conidios en medio semi-sólido a partir de colonias crecidas en AM durante 7 días a 30°C. El crecimiento se evaluó midiendo diariamente dos diámetros perpendiculares de cada

colonia, haciendo luego un promedio de ambos. Cada ensayo se realizó por triplicado.

Producción de micotoxinas de las cepas seleccionadas

Se determinó la producción de DON, NIV, fumonisinas y aflatoxinas de las cepas seleccionadas a diferentes temperaturas. Para esto se utilizaron placas de Agar-Extracto de Levadura-Sacarosa (Agar-YES), evaluándose la producción de micotoxinas a una a_w de 0,995. La actividad hídrica de las placas fue verificada mediante el uso del equipo medidor de actividad hídrica Aqualab CX-2 (Decagon Devices Inc.). Para la inoculación de las placas se procedió de la misma manera que para evaluar la velocidad de crecimiento. Estas fueron incubadas en oscuridad, a 15, 25 30 y 37°C durante 28 días. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a la extracción y cuantificación de las micotoxinas.

DON y NIV

Para la determinación de DON y NIV a partir del medio de cultivo se utilizó la metodología propuesta por Magan *et al.* (2006), con algunas modificaciones. Se tomó todo el agar de la placa de cultivo, se lo transfirió a un matraz de 250 mL y se lo machacó con ayuda de varilla de vidrio a fin de romper todo el agar y el micelio. Se le agregó 40 ml de acetonitrilo:metanol (14:1 v/v) y se lo agitó durante 12 horas a 150 rpm. Una vez transcurrido este tiempo, se tomaron 2 ml del extracto obtenido y se lo llevó a sequedad. Luego se lo resuspendió en 500 μ L de metanol:agua (5:95 v/v) previo a su inyección en el HPLC. Para la determinación y cuantificación de DON se utilizó un HPLC de fase reversa (bomba Shimadzu LC-10ADvp, detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M10 Avp, con detección a 220 nm). La columna utilizada fue una columna de fase reversa C18, de 150 x 4,6 mm y 5 μ m de tamaño de partícula (Nucleodur[®], Macherey-Nagel, Düren, Alemania), conectada a una pre-columna Security Guard (8 x 4 mm, 5 μ m de tamaño de partícula, Nucleodur[®], Macherey-Nagel, Düren, Alemania). La fase móvil utilizada fue metanol:agua (12:88 v/v), con un flujo de 1,5 mL/min. El volumen de inyección fue de 50 μ l y se utilizaron estándares de 5, 10 y 25 mg/kg para ambas micotoxinas. El límite de detección de la técnica fue de 1,5 μ g/kg para DON y de 5 μ g/kg para NIV.

Fumonisin

Para la determinación de fumonisin a partir del medio de cultivo se utilizó la metodología propuesta por Formenti *et al.* (2012), con algunas modificaciones. Se transfirió todo el agar de la placa de cultivo a un matraz de 250 ml y se lo machacó con ayuda de varilla de vidrio a fin de romper todo el agar y el micelio. Se le agregó 20 ml de metanol y se lo agitó durante 45 minutos a 150 rpm. Una vez transcurrido este tiempo, se filtró el extracto a través de papel de filtro Whatman N° 1 para la posterior detección y cuantificación de las fumonisin utilizando el kit de ELISA competitivo comercial, Ridascreen® Fast Fumonisin (R-Biofarm AG, Darmstadt, Alemania), siguiendo la metodología detallada anteriormente.

Aflatoxin

Para la determinación de aflatoxin se utilizó la metodología propuesta por Giorni *et al.* (2008), con algunas modificaciones. A partir de los cultivos en Agar-YES se tomaron tres discos de aproximadamente 8 mm de la región central de la colonia y se los colocó en un vial. Se le agregó luego 1 ml de metanol y se lo dejó 1 hora en reposo. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un nuevo vial. El extracto obtenido fue llevado a sequedad para luego resuspenderlo en 300 µl de metanol. Una alícuota de 200 µl de éste fue luego derivatizada con 700 µl de ácido trifluoroacético:ácido acético:agua (20:10:70 v/v) y analizada por HPLC (Bomba Shimadzu LC-10ADvp, Detector de fluorescencia Shimadzu RF-10 Axl, con longitudes de onda de excitación y emisión de 360 y 440 nm, respectivamente) La columna utilizada fue una columna de fase reversa C18, de 150 x 4,6 mm y 5µm de tamaño de partícula (Nucleodur®, Macherey-Nagel, Düren, Alemania), conectada a una pre-columna Security Guard (8 x 4 mm, 5µm de tamaño de partícula, Nucleodur®, Macherey-Nagel, Düren, Alemania). La fase móvil utilizada fue una solución de agua:metanol:acetonitrilo a (4:1:1 v/v), con un flujo de 1,5 ml/min. El volumen de inyección fue de 20 µl y se utilizaron los siguientes estándares: B₁ y G₁ – 50, 100 y 250 µg/kg, B₂ y G₂ – 25, 50 y 100 µg/kg. El límite de detección de la técnica fue de 1 µg/kg para AFB₁ y AFG₁ y de 0,8 µg/kg para AFB₂ y AFG₂.

RESULTADOS

1. Ensilados de grano húmedo de sorgo

1.1. Humedad y actividad hídrica

En la **tabla 3** se observan los porcentajes de humedad para los cinco silos analizados, a diferentes tiempos de almacenamiento. Dichas muestras presentaron valores en el rango de 11 a 37%. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el % de humedad durante los diferentes tiempos de ensilado ($p > 0,05$).

Tabla 3. Porcentaje de humedad (%) de los silos a diferentes tiempos de almacenamiento

Tiempo (días)	Humedad (%)					Promedio \pm DS
	Silo 1	Silo 2	Silo 3	Silo 4	Silo 5	
0	11	30	30	27	32	26 \pm 8
30	15	25	21	24	30	23 \pm 6
90	17	23	18	26	31	23 \pm 6
180	15	29	17	22	37	24 \pm 9

Si bien el silo 1 presentó una humedad inicial inferior a la sugerida para ensilar (entre 27 y 32%), éste fue considerado de igual forma en este estudio, ya que es común en la práctica el ensilado de materiales con esta humedad, a fin de determinar si esto interfiere en la contaminación fúngica en las diferentes etapas del ensilado.

En cuanto a la actividad hídrica (a_w), no se observaron diferencias significativas durante el tiempo de ensilado ($p > 0,05$), aunque se observa un aumento hacia los 30 días de almacenamiento, con una disminución luego hacia los 90 días, momento en que la a_w parece estabilizarse (**Tabla 4**).

Tabla 4. Actividad hídrica (a_w) de los silos a diferentes tiempos de almacenamiento

Tiempo (días)	Actividad hídrica (a_w)					Promedio \pm DS
	Silo 1	Silo 2	Silo 3	Silo 4	Silo 5	
0	0,796	0,863	0,850	0,695	0,841	0,809 \pm 0,069
30	0,874	0,973	0,935	0,763	0,943	0,898 \pm 0,083
90	0,825	0,824	0,867	0,840	0,931	0,857 \pm 0,045
180	0,863	0,853	0,918	0,749	0,948	0,866 \pm 0,076

1.2. pH

En la **tabla 5** puede observarse la variación que presenta el pH de los silos durante el tiempo de almacenamiento. Para todas las muestras, hay un descenso significativo del pH inicial a los 30 días ($p < 0,05$), para luego estabilizarse a medida que avanza el tiempo de almacenamiento, alcanzándose a los 180 días un pH similar para todas las muestras en torno a 4,50.

Tabla 5. pH de los silos a diferentes tiempos de almacenamiento

Tiempo (días)	pH					Promedio \pm DS
	Silo 1	Silo 2	Silo 3	Silo 4	Silo 5	
0	6,53	5,95	4,89	5,45	4,53	5,47 \pm 0,80
30	5,05	4,71	4,16	4,61	3,84	4,47 \pm 0,48
90	4,23	4,37	4,62	4,25	3,86	4,27 \pm 0,28
180	4,62	4,55	4,49	4,43	4,35	4,49 \pm 0,10

1.3. Contaminación fúngica de los ensilados

Se observó presencia de hongos en todas las muestras analizadas, encontrándose niveles de contaminación que van de $0,2 \times 10^4$ a 4085×10^4 UFC/g. El 80% de las muestras de silo excedieron el límite establecido como estándar de calidad higiénica de acuerdo a los criterios de buenas prácticas de manufactura, que determina un nivel máximo de contaminación de 1×10^4 UFC/g.

La mayor contaminación fúngica se observó a los 180 días de almacenamiento, presentándose diferencias significativas con respecto a los demás tiempos evaluados (0, 30 y 90 días) ($p < 0,05$) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Colonias fúngicas totales presentes en las muestra de los silos a diferentes tiempos de almacenamiento, expresadas en unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (UFC/g)

Tiempo (días)	UFC/g X 10 ⁴					Promedio ± DS
	Silo 1	Silo 2	Silo 3	Silo 4	Silo 5	
0	0,5 x 10 ⁴	12 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	3 x 10 ⁴	0,3 x 10 ⁴	3,4 x 10 ⁴ ± 4,9 x 10 ⁴
30	0,9 x 10 ⁴	10 x 10 ⁴	1 x 10 ⁴	100 x 10 ⁴	0,2 x 10 ⁴	22,4 x 10 ⁴ ± 43,6 x 10 ⁴
90	7 x 10 ⁴	75 x 10 ⁴	470 x 10 ⁴	2960 x 10 ⁴	2 x 10 ⁴	703,0 x 10 ⁴ ± 1276,6 x 10 ⁴
180	2240 x 10 ⁴	3160 x 10 ⁴	210 x 10 ⁴	920 x 10 ⁴	4085 x 10 ⁴	2123,0 x 10 ⁴ ± 1584,7 x 10 ⁴

Del total de las muestras analizadas el 70% presentó contaminación con *Penicillium* spp., el 65% con *Aspergillus* spp., el 40% con *Absidia* spp., el 35% con *Fusarium* spp. y *Paecilomyces* spp. y el 30% con *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Gliocladium* spp., y *Mucor* spp.

Antes del almacenamiento (tiempo 0), los géneros con mayor frecuencia relativa fueron *Aspergillus* (28,7%), *Alternaria* (22,9%), *Penicillium* (13,4%), *Absidia* (9,6%) y *Fusarium* (6,6%). A excepción de *Penicillium* y *Aspergillus*, denominados “hongos de almacenamiento”, los demás géneros encontrados corresponden a hongos denominados “de campo”. *Colletotrichum* (4,9%), *Epicoccum* (3,6%), *Dreschlera* (2,9%), *Phoma* (0,7%) y *Curvularia* (0,4%) no se encontraron a mayores tiempos de ensilado. En cambio, a los 30 días de ensilado, se vio un marcado aumento en la infección por *Aspergillus* y *Penicillium*, duplicando prácticamente su frecuencia relativa de ocurrencia (de 28,7% a 51% y de 13,4% a 29,5%, respectivamente). También aparecieron algunos aislamientos, tal como *Eurotium*, género clasificado como “de almacenamiento”, además de algunos hongos degradadores de tejidos vegetales, con conocida actividad ligno-celulolítica, como *Gliocladium*, *Paecilomyces* y *Myrothecium*. En cuanto a las muestras con 90 días de almacenamiento, los géneros más abundantes fueron *Penicillium* y *Paecilomyces*. También se observó un aumento en la frecuencia de hongos degradadores de tejidos vegetales, como *Gliocladium*, *Myrothecium*, *Graphium* y *Trichoderma*. Por otra parte, a los 180 días predominan principalmente los denominados “hongos de almacenamiento”, siendo *Penicillium* el más abundantes. En cuanto a los géneros con actividad ligno-celulolítica, se encontró nuevamente *Paecilomyces* y *Trichoderma*, que presentaron un marcado aumento en su frecuencia. También comenzaron a aparecer aislamientos de *Schizophyllum commune*, un basidiomycete de conocida actividad ligninolítica (**Figura 16**). En la **Tabla 7** se detallan los principales géneros encontrados, a diferentes tiempos de almacenamiento.

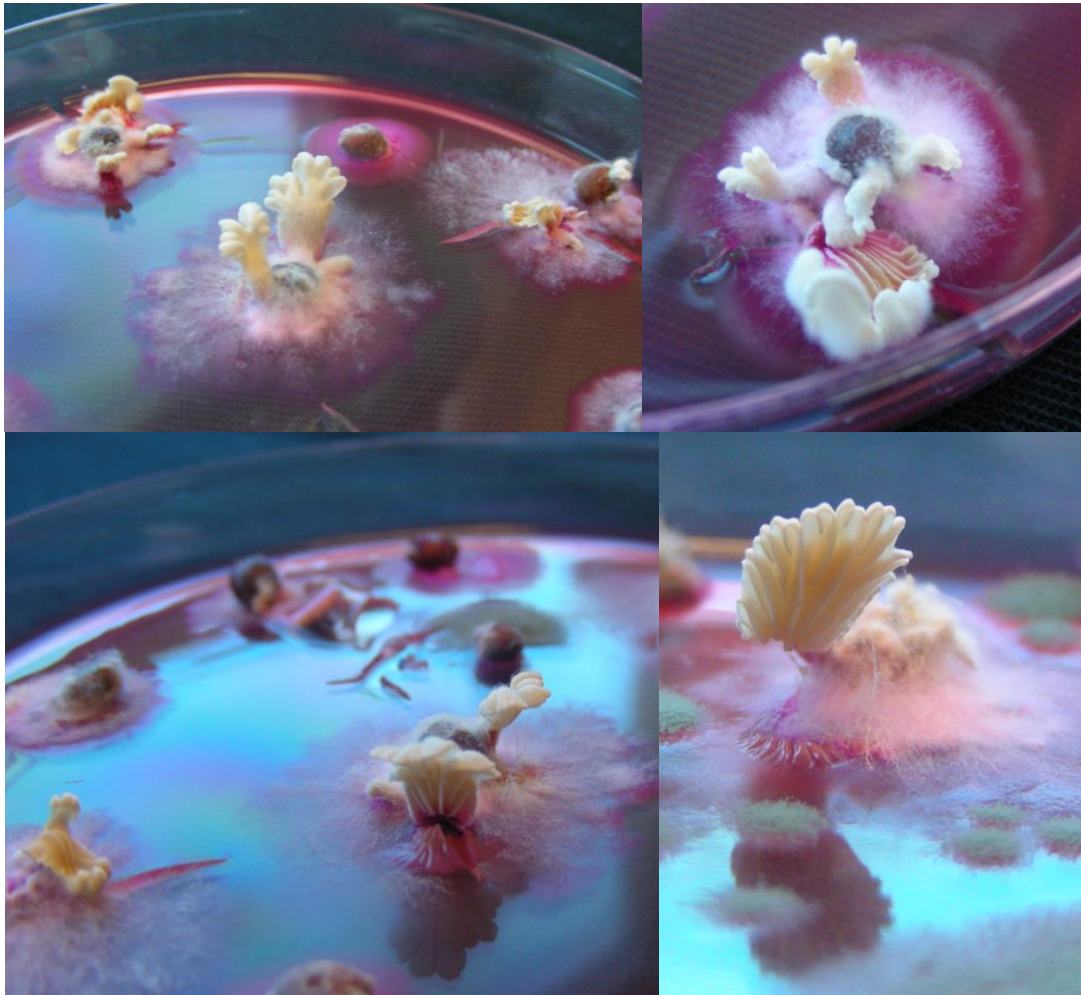


Figura 16. Fructificaciones de *Schizophyllum commune* emergiendo de partículas de silo de sorgo

Tabla 7. Frecuencia relativa de los principales géneros aislados

Frecuencia relativa (%)	Días de almacenamiento			
	0	30	90	180
<i>Penicillium</i>	13,4	29,5	89,3	99,8
<i>Aspergillus</i>	28,7	51	7,2	3,1
<i>Absidia</i>	9,6	8,2	12,4	7,1
<i>Fusarium</i>	6,6	2,1	0,9	3,1
<i>Paecilomyces</i>	0	0,7	20,2	35,3
<i>Alternaria</i>	22,9	0	1,9	0
<i>Cladosporium</i>	3,1	3,2	4,6	0
<i>Gliocladium</i>	0,1	1,5	6,3	2,6
<i>Mucor</i>	4	0	2,6	10,8
<i>Phoma</i>	0,7	0	0	0
<i>Epicoccum</i>	3,6	0	0	0
<i>Colletotrichum</i>	4,9	0	0	0
<i>Dreschlera</i>	2,9	0	0	0
<i>Geotrichum</i>	0	1,5	0,7	0
<i>Trichoderma</i>	0	0	1,3	11,1
<i>Eurotium</i>	0	2,3	0	0
<i>Phomopsis</i>	0	0	1,8	0
<i>Myrothecium</i>	0	0,4	6,2	0
<i>Acremonium</i>	0	0	8,3	0,6
<i>Graphium</i>	0	0	1,7	0
<i>Schizophyllum</i>	0	0	0	6
<i>Monoascus</i>	0	0	0	8,2
<i>Sporotrix</i>	0	0	2,7	0,2
<i>Curvularia</i>	0,4	0	0	0
<i>Scopulariopsis</i>	0	0	0,3	0
<i>Arthriniium</i>	0	0	0,7	0
<i>Aureobasidium</i>	0	0	1,7	0
<i>Geaumannomyces</i>	0	0	0,7	0
<i>Ulocladium</i>	0	0	0,3	0
Otros	0	0	0	0,6

Como ya se mencionó anteriormente, *Penicillium* fue el principal género encontrado contaminando las muestras de silo, identificándose 11 especies, siendo *P. citrinum* y *P. purpurogenum* las predominantes. En el gráfico de la **Figura 17** se observan las densidades relativas de las diferentes especies de *Penicillium* aisladas.

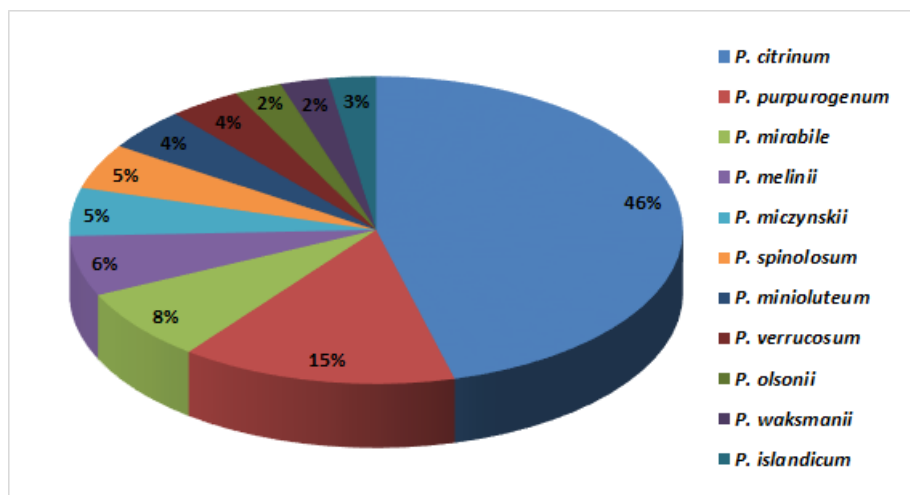


Figura 17. Densidad relativa de las diferentes especies de *Penicillium* aisladas

En cuanto a los géneros que incluyen especies con potencial toxicogénico, se encontraron principalmente *Aspergillus* (65 %) y *Fusarium* (35 %).

Dentro del género *Aspergillus*, se identificaron 7 especies, siendo *A. flavus* la especie predominante (**Figura 18**), siguiéndole *A. fumigatus* y especies del agregado *A. niger*, ambas con un 14%. La mayor incidencia de *A. flavus* se dio a los 30 días de almacenamiento (51 %), disminuyendo luego a los 90 días (3%) ($p < 0,05$).

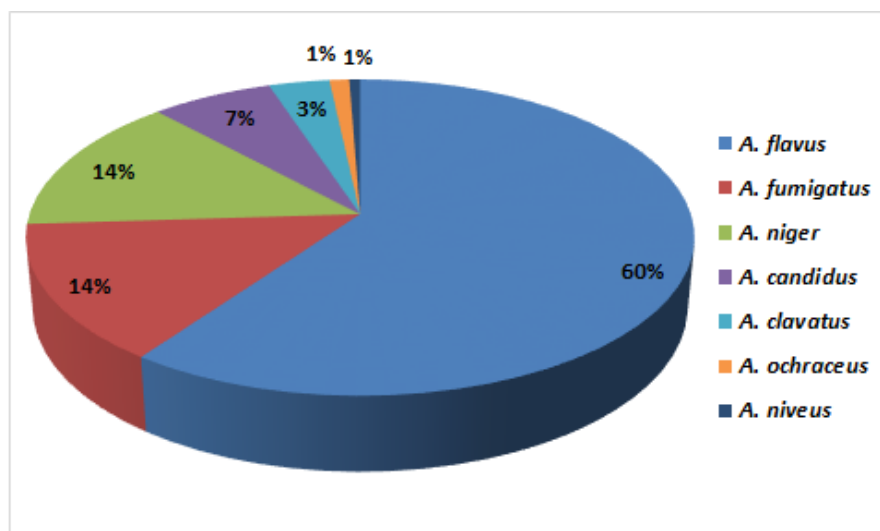


Figura 18. Densidad relativa de las diferentes especies de *Aspergillus* aisladas

Dentro del género *Fusarium*, se aislaron 5 especies, siendo importante la presencia de *F. nygamai* y *F. graminearum*. *Fusarium nygamai* es la especie predominante, con una densidad relativa del 68%, seguido de *F. graminearum*, con una densidad relativa de 27% (**Figura 19**). El mayor número de aislamientos de *F. nygamai* se obtuvo antes del almacenamiento, descendiendo luego a medida que avanza el tiempo de ensilado. Por otra parte, *F. graminearum* se aisló mayormente a tiempo 0, desapareciendo prácticamente a los 30 días de ensilado.

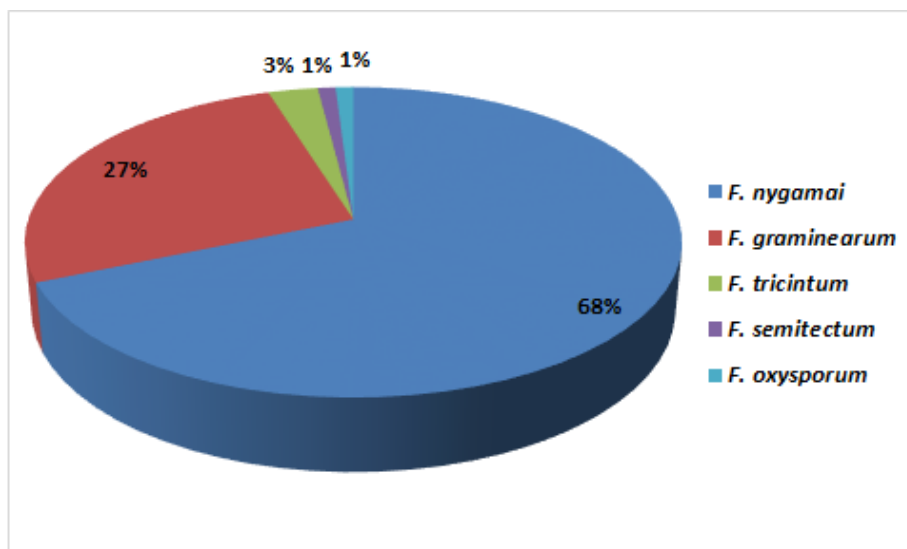


Figura 19. Densidad relativa de las diferentes especies de *Fusarium* aisladas

Al analizar la contaminación fúngica y las propiedades físicas de los silos, se encontró una correlación negativa con el porcentaje de humedad ($r = -0,461$; $p < 0,05$) y una correlación positiva con el pH ($r = 0,504$; $p < 0,05$), no encontrándose correlación alguna con la a_w .

1.4. Contaminación de los ensilados con micotoxinas

Se determinó la contaminación de los silos con aflatoxinas y fumonisinas, ya que las principales especies toxicogénicas encontradas fueron *A. flavus* y *F. nygamai*, importantes productores de estas micotoxinas, respectivamente. Sólo el 20% de las muestras analizadas presentaron contaminación con micotoxinas. Se detectó AFB1 en 2 muestras, una de ellas al momento de la cosecha, con un valor de 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y otra a los 180 días de almacenamiento, con un valor de 14 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Por otra parte, se encontraron fumonisinas en cantidades cuantificables en 2 muestras, ambas al momento de la cosecha, presentando valores de 933 y 530 $\mu\text{g}/\text{kg}$. No

se encontraron diferencias significativas en los niveles de aflatoxinas y fumonisinas entre los diferentes tiempos de almacenamiento muestreados ($p > 0,05$).

2. Ecofisiología de cepas toxicogénicas

2.1. Velocidad de crecimiento

2.1.1. *Fusarium graminearum*

Para *F. graminearum* no se observaron diferencias en el crecimiento para las 2 actividades hídricas estudiadas (**Figura 20**). Esta especie presentó su máximo crecimiento a 25°C en ambas actividades hídricas (13,6 mm/día a 0,980; 14,0 mm/día a 0,995), mientras que no se observó crecimiento a 37°C.

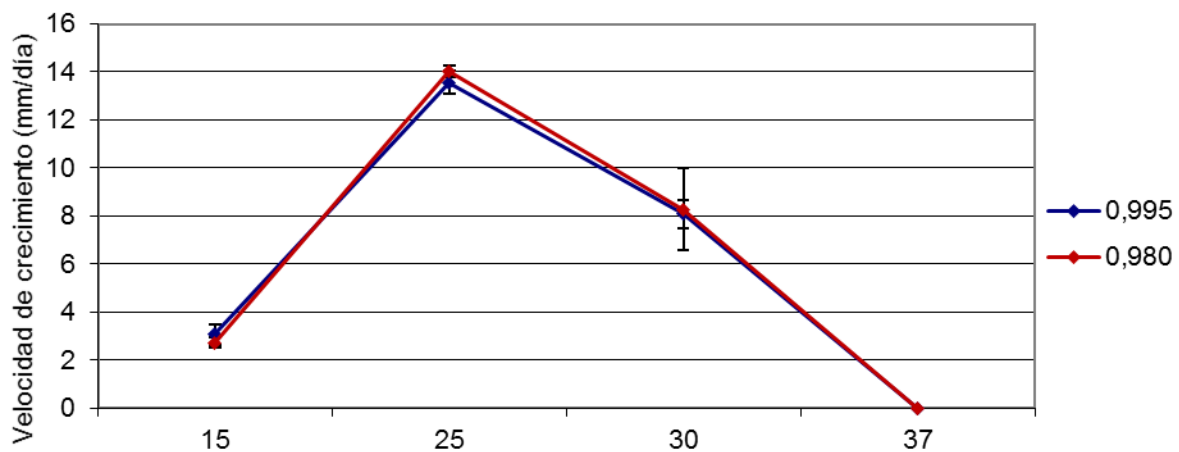


Figura 20. Velocidad de crecimiento promedio de *F. graminearum* a diferentes temperaturas y actividades

En la **Figura 21** se muestra el comportamiento de las 3 cepas de *F. graminearum* estudiadas a diferentes temperaturas y a_w .

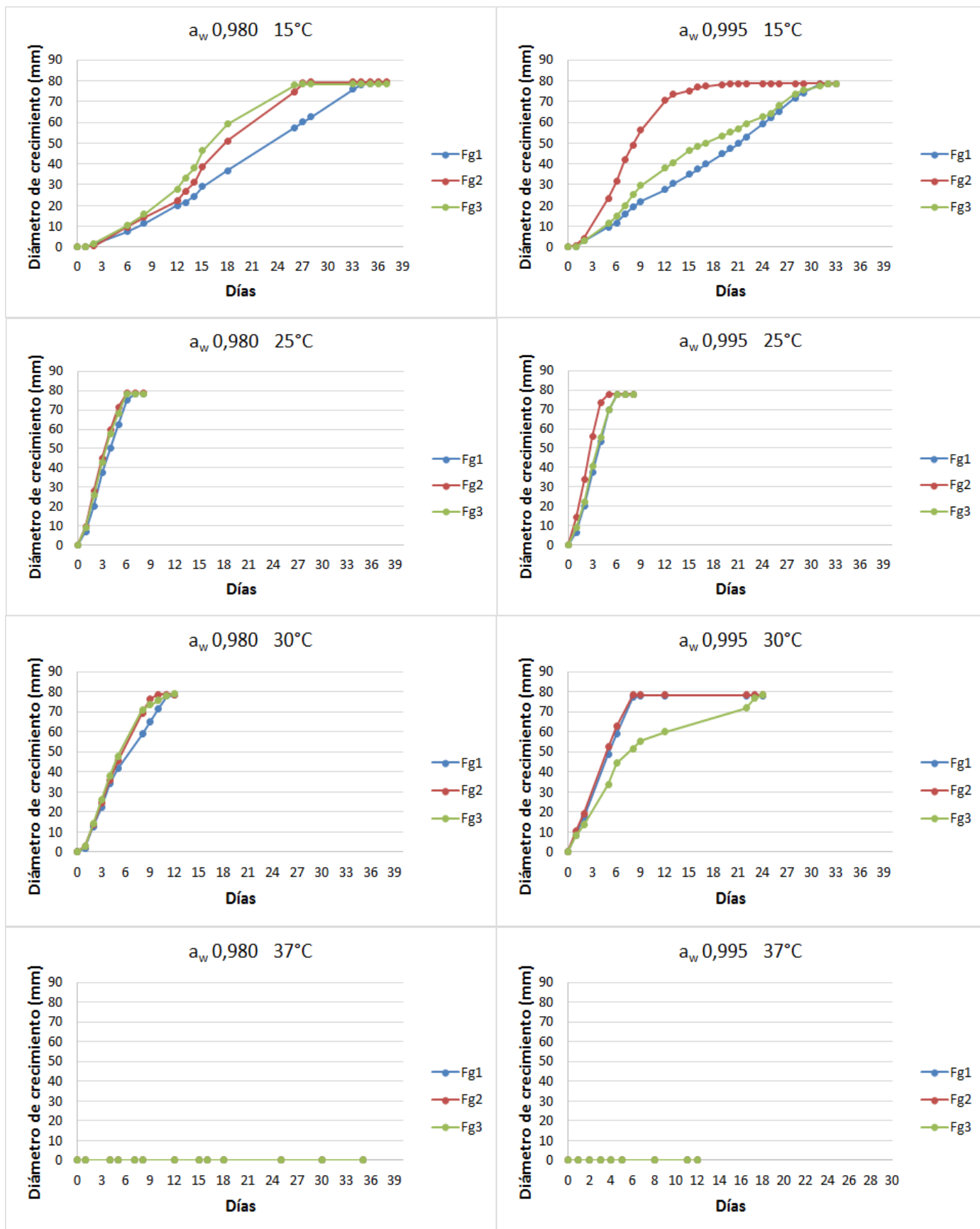


Figura 21. Velocidad de crecimiento de las cepas Fg1, Fg2 y Fg3 de *F. graminearum* a diferentes temperaturas y actividades hídricas

2.1.2. *Fusarium nygamai*

Las cepas de *F. nygamai* presentaron crecimiento en todas las temperaturas y actividades hídricas analizadas, observándose un mayor crecimiento a 0,995 (Figura 22 y 23. Para las dos actividades hídricas evaluadas, se encontró un crecimiento óptimo a temperaturas en torno a 25-30°C. En ambas, el crecimiento fue de 9,5-8,8 mm/día a 0,980 y de 11,2-11,7 mm/día a 0,995 a 25 y 30°C, respectivamente. En cuanto a las temperaturas extremas evaluadas, el crecimiento fue mayor a 15°C (3,5 mm/día a 0,980; 5,1 mm/día a 0,995), mientras que a 37°C el crecimiento fue mínimo (0,3 mm/día a 0,980; 0,5 mm/día a 0,995).

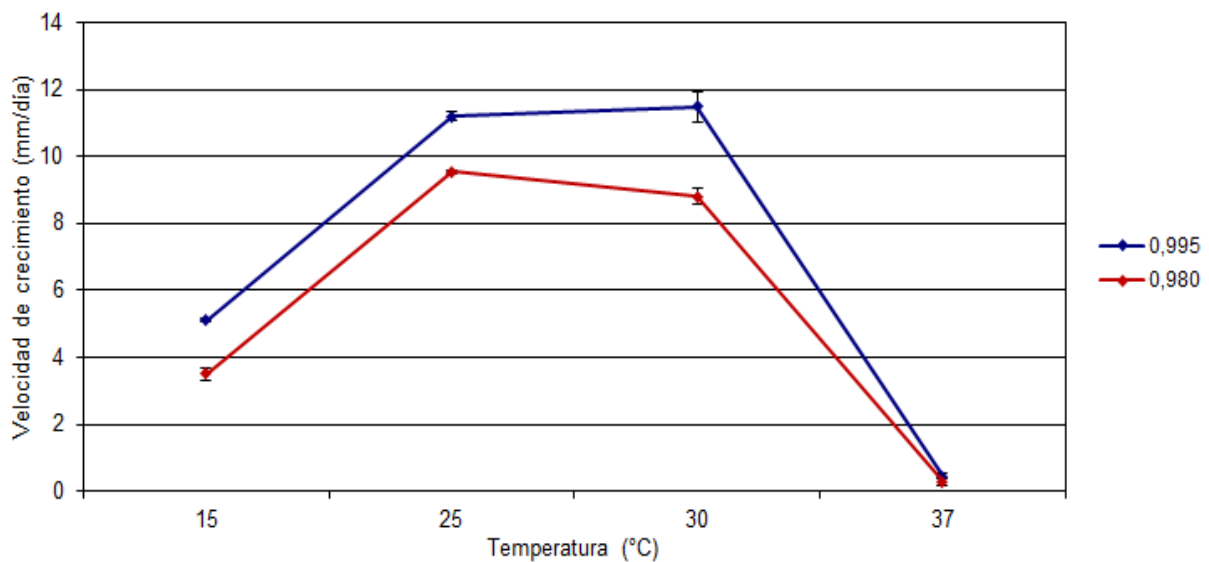


Figura 22. Velocidad de crecimiento promedio de *F. nygamai* a diferentes temperaturas y actividades

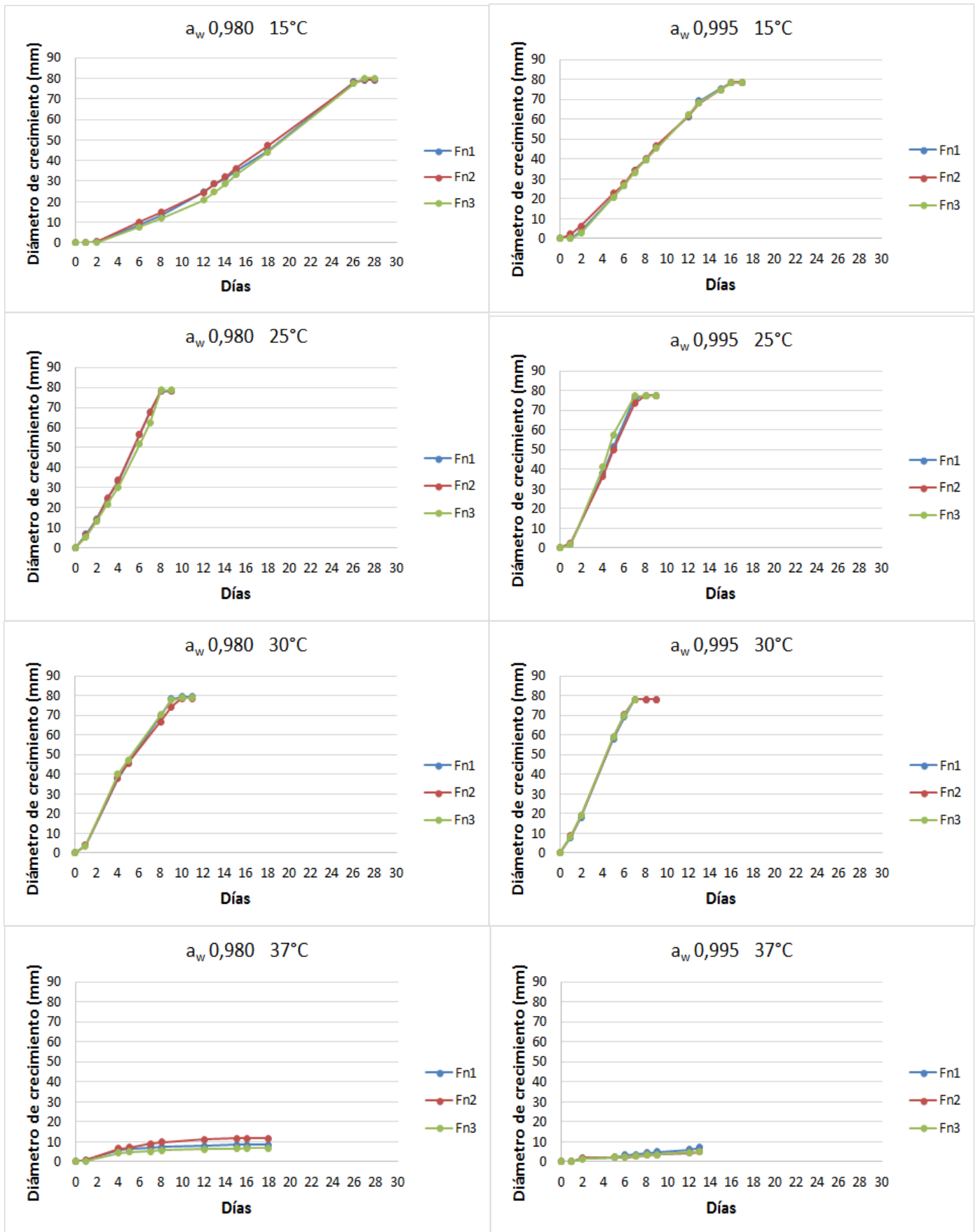


Figura 23. Velocidad de crecimiento de las cepas Fn1, Fn2 y Fn3 de *F. nygamai* a diferentes temperaturas y actividades hídricas

2.1.3. *Aspergillus flavus*

Para *Aspergillus flavus* se observaron diferencias importantes en el crecimiento para ambas actividades hídricas, favoreciéndose su desarrollo a menor actividad hídrica (**Figura 24**).

A una a_w de 0,980, no solo presentó mayores velocidades de crecimiento para una misma temperatura, sino que el rango de temperaturas a las cuales este hongo puede crecer fue mayor. A a_w de 0,995, *A. flavus* no presentó crecimiento a 15°C y el mayor crecimiento se observó entre 25 y 30°C (10,2 mm/día y 11,3 mm/día, respectivamente), mientras que a 37°C el crecimiento disminuyó nuevamente (9,2 mm/día). En cambio, a una a_w de 0,980 esta especie sí presentó desarrollo a 15°C (1,1 mm/día) y el crecimiento óptimo se situó a temperaturas entre 30 y 37°C (19,7 mm/día y 20,7 mm/día, respectivamente). A 25°C también se observó un mayor crecimiento en esta actividad hídrica (12,8 mm/día).

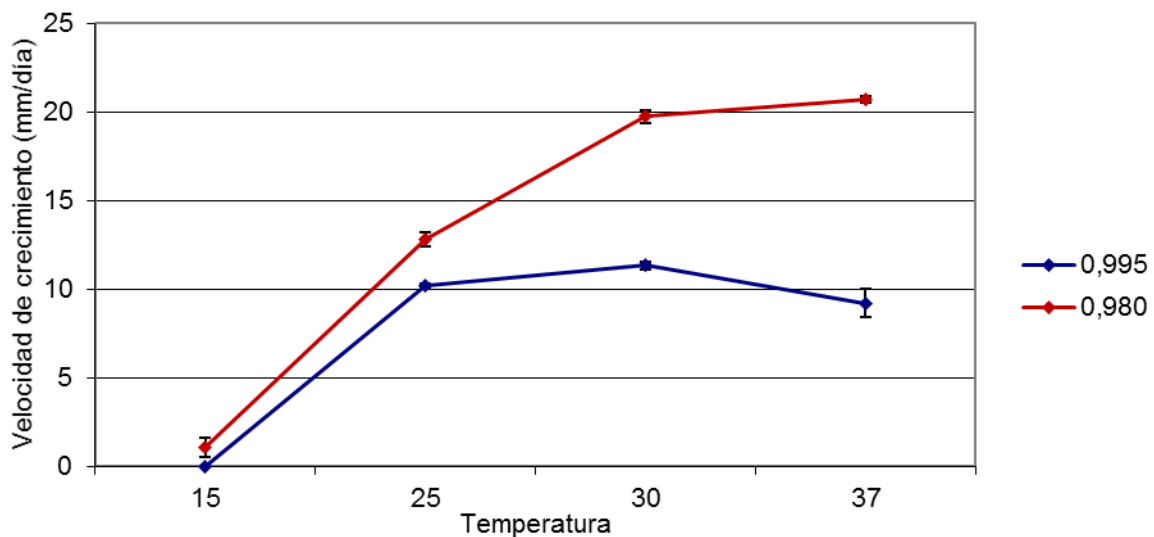


Figura 24. Velocidad de crecimiento promedio de *A. flavus* a diferentes temperaturas y actividades

En la **Figura 25** se muestra el comportamiento de las 3 cepas *A. flavus* estudiadas a diferentes temperaturas y a_w .

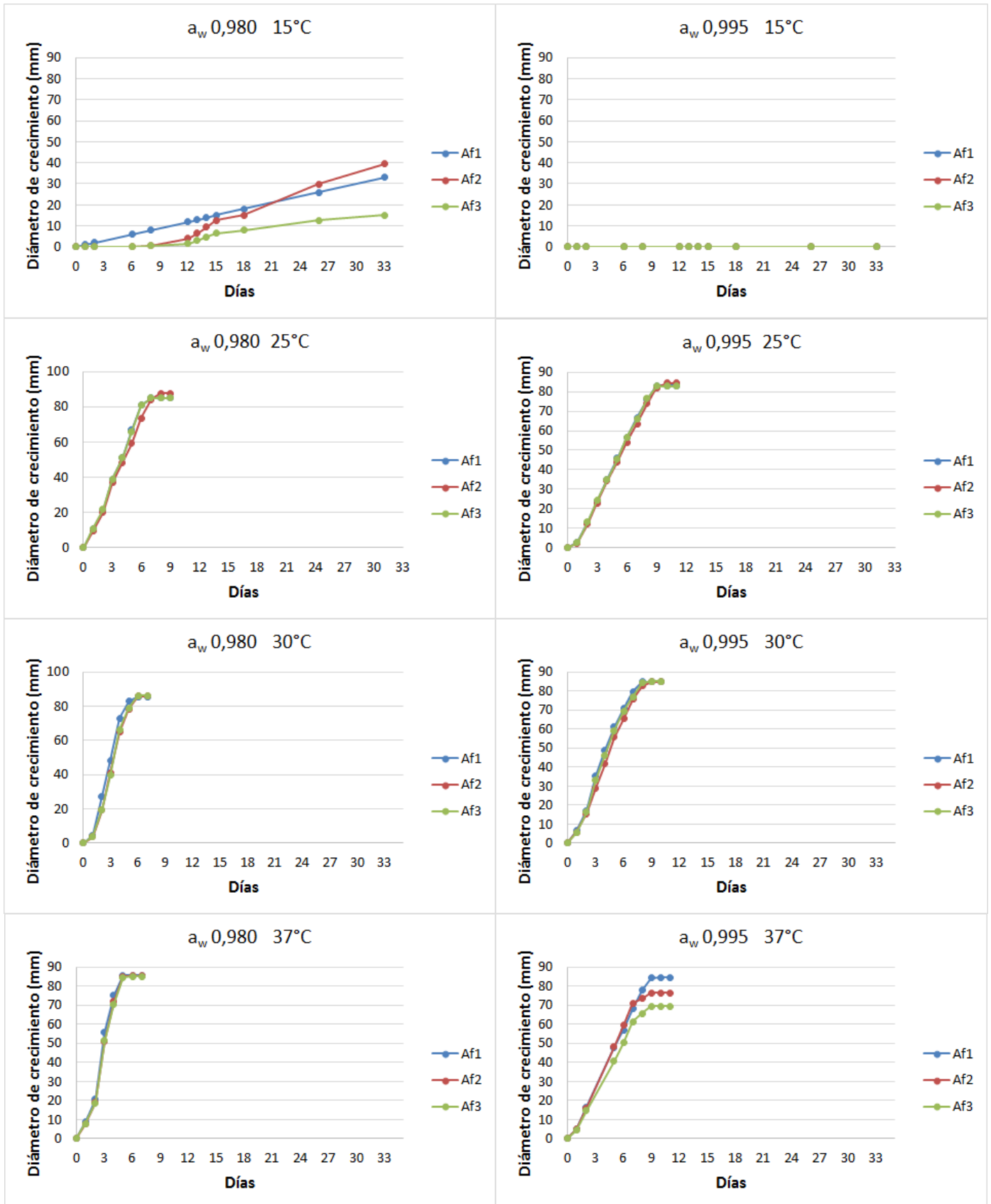


Figura 25. Velocidad de crecimiento de las cepas Af1, Af2 y Af3 de *A. flavus* a diferentes temperaturas y actividades hídricas

2.2. Producción de micotoxinas

2.2.1. Tricotecenos

La evaluación de la producción de micotoxinas por parte de las cepas de *F. graminearum* se realizó a las siguientes temperaturas: 15, 25 y 30°C, por ser las temperaturas en las que estas cepas seleccionadas presentaban crecimiento. Se observó producción tanto de nivalenol (NIV) como de deoxinivalenol (DON), siendo muy similar la producción de ambas micotoxinas (**Figura 26**). La mayor concentración de micotoxinas se produjo a 15°C (201 mg/kg para NIV, 193 mg/kg para DON). A medida que aumentó la temperatura, la producción descendió bruscamente en ambos casos. Sin embargo, a 25 y 30°C se detectó producción de DON, mientras que fue prácticamente nula la producción de NIV (23 y 45 mg/kg para DON, 1 y 0 mg/kg para NIV, a 25 y 30°C respectivamente).

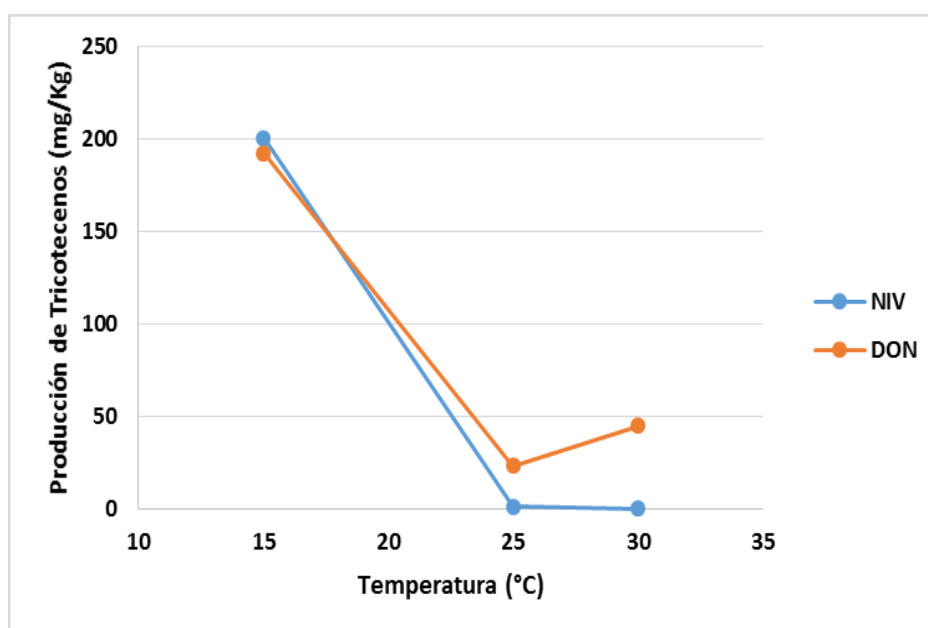


Figura 26. Producción de los tricotecenos DON y NIV por *F. graminearum* a diferentes temperaturas

Por otra parte, se observó que la producción de DON y NIV fue diferente según la cepa en cuestión (**Figura 27**).

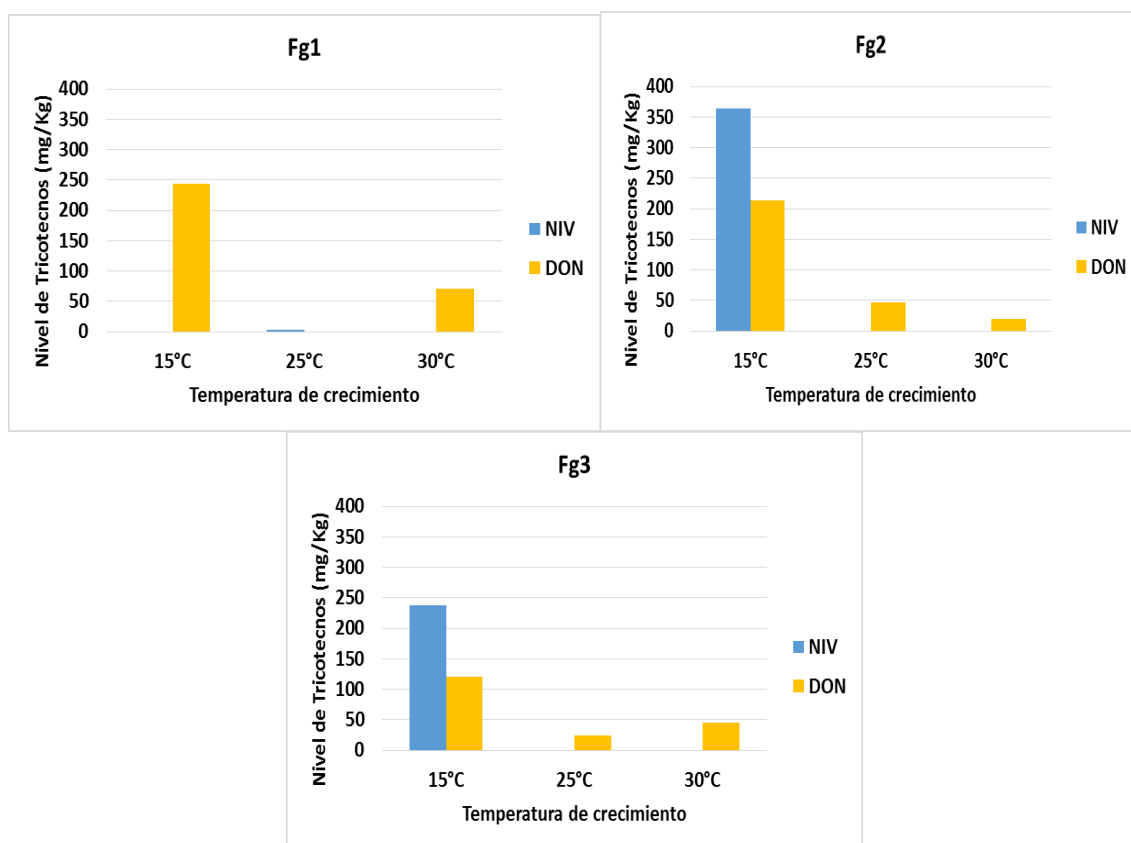


Figura 27. Producción de DON y NIV por las cepas Fg1, Fg2 y Fg3 de *F. graminearum* evaluadas

2.2.2. Fumonisin

Se evaluó la producción de fumonisin a 15, 25 y 30°C por ser éstas las temperaturas en las que se observó mayor desarrollo fúngico por parte de los aislamientos seleccionados. La producción de fumonisin por las cepas de *F. nygamai* presentó un aumento a medida que ascendía la temperatura de crecimiento, con una máxima producción de 13 mg/kg a 30°C. De las temperaturas evaluadas, a 15°C fue donde se observó la menor producción, 12 mg/kg (**Figura 28**).

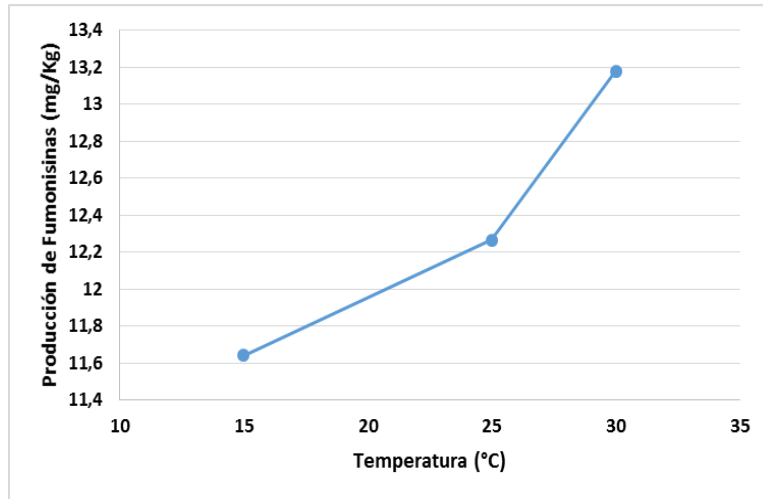


Figura 28. Producción de fumonisinas por *F. nygamai* a diferentes temperaturas

Por otra parte, se observaron diferencias en la producción de fumonisinas por parte de las 3 cepas evaluadas (**Figura 29**).

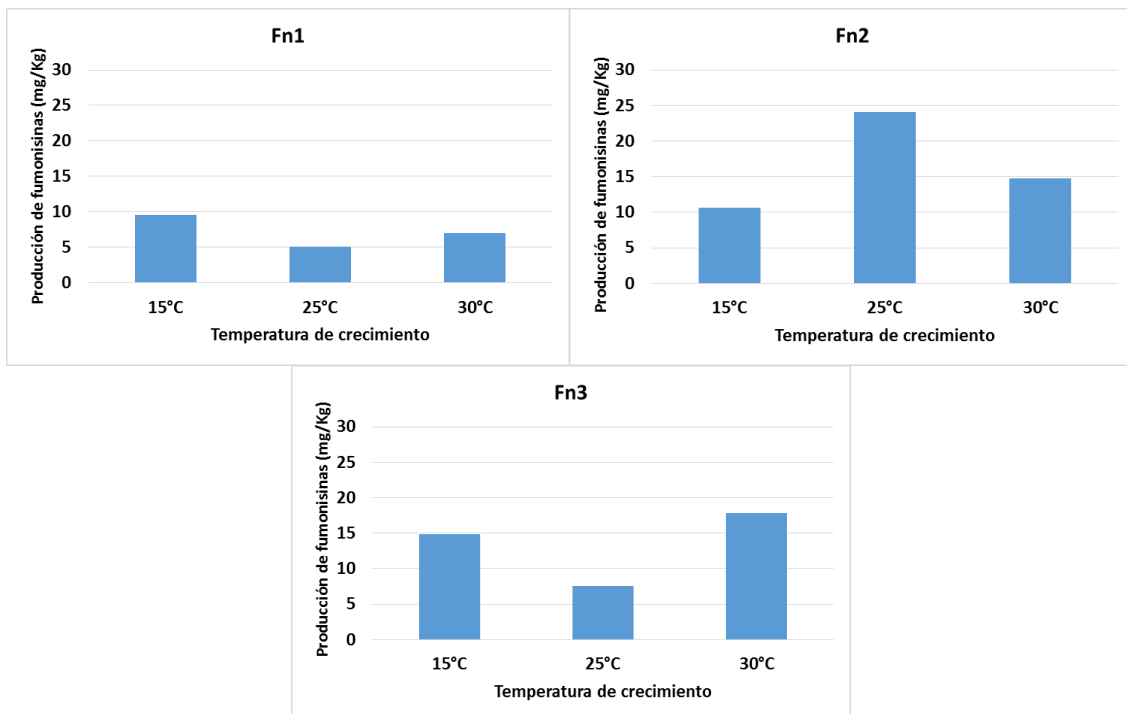


Figura 29. Producción de fumonisinas de las cepas Fn1, Fn2 y Fn3 de *F. nygamai* evaluadas

2.2.3. Aflatoxinas

Se determinó la producción de aflatoxinas a 25, 30 y 37°C, por ser éstas las temperaturas en las que las cepas seleccionadas presentaban crecimiento. Se detectó la producción de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, en todas las temperaturas estudiadas excepto para G₂ a 37°C, en donde la producción fue nula (**Figura 30**). La producción de AFB₁ fue mayor a 25 y 30°C respecto a las demás aflatoxinas analizadas, observándose un descenso en los niveles a medida que aumentó la temperatura (1485 µg/kg, 1095 µg/kg y 14 µg/kg para 25, 30 y 37°C, respectivamente). Lo mismo se observó para la producción de AFB₂, AFG₁ y AFG₂, siendo mayor a 25°C y descendiendo a medida que aumentó la temperatura.

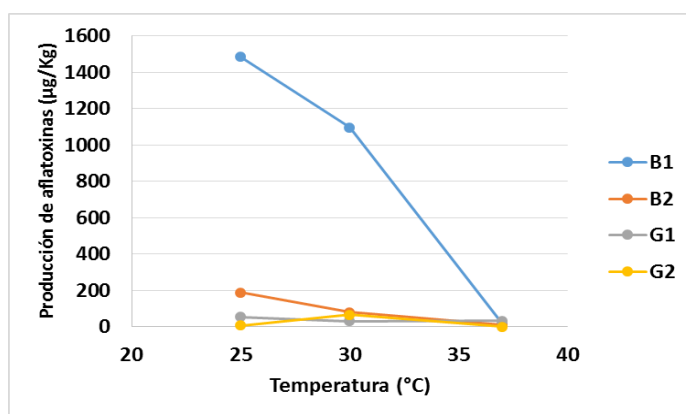


Figura 30. Producción de aflatoxinas por *A. flavus* a diferentes temperaturas

La **Figura 31** muestra la producción de aflatoxinas por parte de las cepas analizadas.

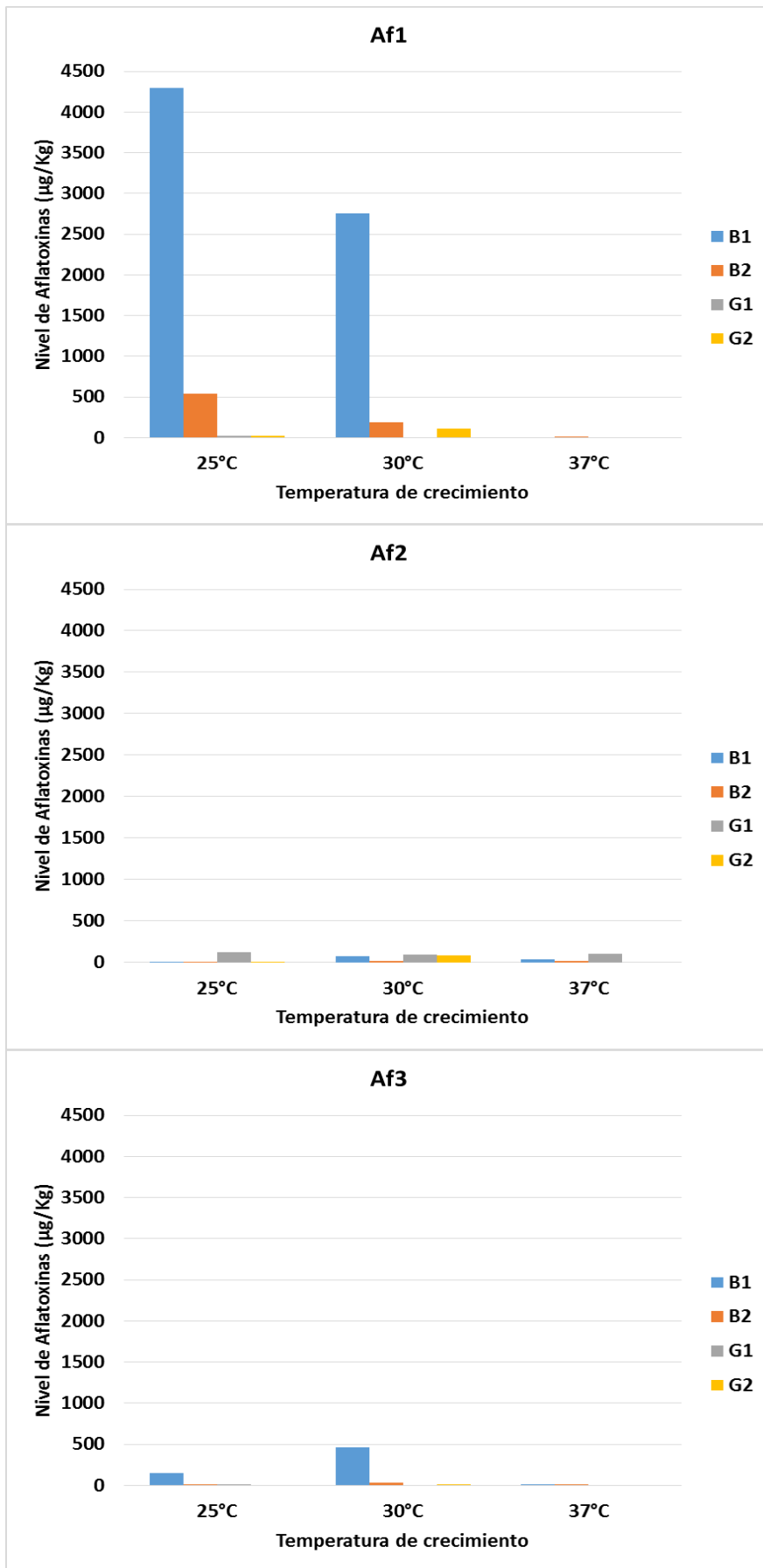


Figura 31. Producción de aflatoxinas por las cepas Af1, Af2 y Af3 de *A. flavus* evaluadas

DISCUSIÓN

1. Ensilados de grano húmedo de sorgo

Diversos autores han reportado alta contaminación fúngica en diversos sustratos almacenados destinados al consumo animal (Keller *et al.*, 2013; Keller *et al.*, 2012; González-Pereyra *et al.*, 2011; Reyes-Velázquez *et al.*, 2008; González-Pereyra *et al.*, 2008; Rosa *et al.*, 2006; El-Shanawany *et al.*, 2005). En este estudio se encontró que el 80% de las muestras superaron el nivel recomendado (1×10^4 UFC/g) (GMP, 2008). Estos resultados sugieren un sustrato que presenta una alta actividad fúngica y que puede provocar efectos diversos en el ganado, como disminución en la palatabilidad del alimento, disminución en la absorción de nutrientes y enfermedades en los animales, detalladas por Alonso *et al.* (2013), con la consiguiente pérdida en el rendimiento de los mismos (O'Brien *et al.*, 2008; Martins & Martins, 2001; Ogundero, 1989). Sin embargo, en este estudio, al igual que Keller *et al.* (2012), que también analizaron sorgo ensilado, encontraron niveles algo menores de contaminación que los encontrados por otros autores en silos de maíz (González-Pereyra *et al.*, 2011; Reyes-Velázquez *et al.*, 2008; González-Pereyra *et al.*, 2008). Esto podría indicar que el sorgo presenta mayor resistencia a la contaminación fúngica que otros granos frecuentemente usados para ensilar como el maíz. Esta resistencia podría deberse a propiedades tanto químicas como físicas de los granos de sorgo. La presencia de taninos condensados y ácidos fenólicos en su cubierta está estrechamente relacionada a la resistencia a la contaminación fúngica (Menkir *et al.*, 1996; Jambunatham *et al.*, 1992; Hahn *et al.*, 1983; Harris & Burns, 1973). Por otra parte, la presencia de un alto porcentaje de endosperma córneo envolviendo al endosperma harinoso, al igual que la superficie rígida y cerosa del grano también han sido asociados con la resistencia al ataque fúngico (Menkir *et al.*, 1996; Jambunatham *et al.*, 1992).

Al analizar las propiedades físicas de los silos y la contaminación fúngica, los resultados obtenidos concuerdan con lo encontrado por Acosta (2010^b) y Baldi *et al.* (2008), quienes sugieren valores de pH menores a 4,6 y de humedad en torno a un 27% para una óptima conservación de los silos. Reyes-Velázquez *et al.* (2006) reafirman que la inhibición de los microorganismos y la conservación del ensilaje ocurren a valores de pH entre 3,7 y 4,2. En el presente trabajo, luego de estabilizado el proceso de ensilado, se obtuvieron valores de pH y humedad en torno a estos valores y no se encontraron cambios significativos en el número de aislamientos durante los primeros 3 meses de almacenamiento, lo cual indicaría una buena

conservación de los silos. Sin embargo, se observó un marcado aumento hacia los 180 días de almacenamiento. Estos resultados concuerdan con Storm *et al.* (2010) y Reyes-Velázquez *et al.* (2008), que encontraron un aumento en el recuento fúngico a mayor tiempo de almacenamiento. Esto podría deberse en parte a las variaciones climáticas estacionales, ya sea por un aumento en la temperatura o un aumento en la humedad relativa ambiental debidas a la transición de estaciones, en este caso de invierno a primavera (Storm *et al.*, 2010). Por otra parte, al analizar en forma individual el Silo 1, que presentaba una humedad inicial inferior a la sugerida para ensilar, se observó contaminación fúngica en niveles similares a los demás silos, que presentaban una humedad inicial óptima para ensilar. Esto podría indicar que una humedad inicial baja no afectaría el proceso de ensilaje, como lo menciona Chalkling (2004). En cuanto a la identificación de los aislamientos obtenidos, se encontraron 30 géneros diferentes, siendo *Penicillium* y *Aspergillus* los principales géneros encontrados. Esto demuestra una gran diversidad fúngica en los silos analizados, ya que en estudios similares el número de géneros encontrados fue mucho menor, independientemente del material utilizado para ensilar. Keller *et al.* (2013), González-Pereyra *et al.* (2011 y 2008) y Reyes-Velázquez *et al.* (2008), que analizaron silos de maíz, encontraron entre 7 y 9 géneros, mientras que Keller *et al.* (2012) y da Silva *et al.* (2000), que analizaron silos de sorgo, encontraron 7 y 13 géneros, respectivamente. Sin embargo, los principales géneros encontrados son similares en todos estos estudios, siendo *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Cladosporium* los principales géneros encontrados. En este trabajo, la mayoría de estos géneros aparecieron en alta frecuencia en las muestras de sorgo antes de almacenar, a excepción de *Penicillium* y *Paecilomyces*, que fueron las especies predominantes durante el almacenamiento. Durante esta etapa puede ocurrir una sucesión de diferentes especies fúngicas dependiendo de las condiciones de almacenamiento y del microambiente establecido dentro del mismo (Cheli *et al.*, 2013; Dunière *et al.*, 2013; Wicklow, 1995). Algunas especies son capaces de crecer a a_w más bajas que otras, y a medida que se van estableciendo, crean microambientes con mayores temperaturas y condiciones de humedad diferentes, donde otros hongos no pueden desarrollarse (Hocking, 2003). En este estudio se observó una sucesión de especies, ya que los denominados “hongos de campo”, como *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Dreschlera*, *Phoma*, *Cladosporium* y *Colletotrichum*, aparecen principalmente antes de ensilar, disminuyendo su frecuencia e incluso desapareciendo a medida que avanza el tiempo de ensilado.

Dentro de los principales géneros encontrados, los que presentan mayor importancia son *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* debido a su poder de colonización del sustrato y a que presentan especies con importante capacidad toxicogénica (Cheli *et al.*, 2013). Dentro del género *Penicillium*, *P. citrinum* fue la especie más frecuente al igual que lo encontrado en sorgo por otros autores (Keller *et al.*, 2012; Lahouar *et al.*, 2015; González *et al.*, 1997). Estos resultados contrastan con lo encontrado por otros autores en maíz almacenado, en donde *P. roqueforti* fue la especie predominante (Alonso *et al.*, 2013; Cheli *et al.*, 2013). La presencia de *P. citrinum* debe ser considerada como un potencial factor de riesgo en los silos de sorgo, ya que es capaz de producir citrinina, un compuesto tóxico para animales domésticos y de laboratorio (Liu *et al.*, 2003).

Por otra parte, *Aspergillus flavus* presentó la mayor frecuencia relativa dentro del género *Aspergillus*, seguido de *A. fumigatus* y de especies del agregado *Aspergillus niger*. Estas especies toxicogénicas también fueron encontradas como mayoritarias por otros autores en sustratos como maíz y sorgo ensilado (Keller *et al.*, 2013 y 2012; González-Pereyra *et al.*, 2011; Alonso *et al.*, 2009; González-Pereyra *et al.*, 2008; Khosravi *et al.*, 2008; 2006; El-Shanawany *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2000). La presencia de las mismas en alimentos constituye un potencial riesgo para la productividad y salud animal, ya que en condiciones inadecuadas de almacenamiento, pueden producir micotoxinas (González-Pereyra *et al.*, 2011; Alonso *et al.*, 2009). *Aspergillus flavus* es un importante productor de aflatoxinas, *A. fumigatus* de gliotoxina y especies del agregado *A. niger*, productoras de fumonisinas y ocratoxinas (Cheli *et al.*, 2013; Frisvad *et al.*, 2011; Garon *et al.* 2006). Por otra parte, la presencia de *A. fumigatus* representa un riesgo no solo por la producción de micotoxinas sino también por la inhalación e ingestión de esporas, ya que éste es un patógeno oportunista que puede producir enfermedades respiratorias y afecciones pulmonares en humanos y animales (Alonso *et al.*, 2013; Keller *et al.*, 2012; González-Pereyra *et al.*, 2008; Garon *et al.* 2006; El-Shanawany *et al.*, 2005). Además, esta especie está más adaptada que otras al ambiente presente en los silos, resistiendo los bajos niveles de O₂ y las altas concentraciones de ácidos características de los productos ensilados (González-Pereyra *et al.*, 2011).

Dentro del género *Fusarium*, algunas especies pertenecientes al complejo *Gibberella fujikuroi* han sido asociadas a la contaminación fúngica de sorgo en diferentes países (Lahouar *et al.*, 2015; Divakara *et al.*, 2014; Alves dos Reis *et al.*, 2010). Dentro de estas especies, *F. verticillioides*, *F. nygamai*, *F. proliferatum*, *F. thapsinum* y *F. andiyazi*, se las ha encontrado como responsables de la contaminación del sorgo con fumonisinas (Leslie *et al.*, 2005). En este estudio, fueron identificadas 5 especies de *Fusarium*, siendo *F. nygamai* la

especie predominante. Estos resultados contrastan con los encontrados por otros autores en silos de sorgo y maíz, en donde *F. verticillioides* es la especie más frecuente (Keller *et al.*, 2013 y 2012; Eckard *et al.*, 2011; González-Pereyra *et al.*, 2008; Garon *et al.* 2006; El-Shanawany *et al.*, 2005; da Silva *et al.*, 2000). *Fusarium nygamai* ha sido encontrado en Argentina, Australia, Malasia, Puerto Rico, Sudáfrica, Sri Lanka y Tailandia, contaminando sorgo, mijo y arroz, en donde habita como colonizador de tejidos vegetales vivos y desechos vegetales (Sapumohotti *et al.*, 2004; Balmas *et al.*, 2000; Magnoli *et al.*, 1999; Marasas *et al.*, 1988; Burgess & Trimboli, 1986). Por otra parte, se ha demostrado que cepas de esta especie son importantes productoras de fumonisinas (Nelson *et al.*, 1992; Thiel *et al.*, 1991). Estos resultados sugieren que esta especie es un importante contaminante del sorgo en nuestro país, y que debe ser tenida en cuenta no solo por su alta frecuencia sino también por su capacidad de contaminar los granos con fumonisinas.

Además de *F. nygamai* otra de las especies de *Fusarium* encontradas fue *F. graminearum*, importante productor de tricotecenos. Estos resultados difieren de lo encontrado en silos de sorgo y maíz por González-Pereyra *et al.* (2011 y 2008) y Keller *et al.* (2013 y 2012), donde esta especie estuvo ausente o en muy baja frecuencia.

A pesar de que en el presente estudio *A. flavus* fue encontrado en alta frecuencia, se encontraron muy pocas muestras contaminadas con aflatoxinas (20%) y ninguna superó el límite recomendado en Uruguay para alimentos destinados a vacas lecheras (20 µg/kg) (INALE, 2012). Resultados similares fueron obtenidos por Roigé *et al.* (2009), González-Pereyra *et al.* (2008), Reyes-Velázquez *et al.* (2008), Ayalew *et al.* (2006), Nkwe *et al.* (2005), da Silva *et al.* (2000), en donde se detectaron bajos niveles de aflatoxinas a pesar de una alta incidencia de *A. flavus*. Esto podría sugerir que las condiciones dentro del silo no fueron las apropiadas para permitir la producción de estas toxinas por parte de las cepas potencialmente productoras presentes en el mismo. Además, existen estudios que demuestran que las aflatoxinas son degradadas lentamente dentro de los silos debido a la actividad de fermentación anaeróbica ácida que ocurre durante el proceso de ensilado, a medida que avanza el tiempo de almacenamiento (Cheli *et al.*, 2013; Richard *et al.*, 2007; Garon *et al.*, 2006). Por otra parte, Karunaratne & Bullerman (1990) y Odamttem *et al.* (1987) plantean que la carga de inóculo presente en un sustrato afecta la producción de aflatoxinas, de manera que a mayor cantidad de inóculo menor producción. Por otra parte, Lahouar *et al.* (2016)

mencionan que la disminución en la concentración de aflatoxinas en un sustrato contaminado por *A. flavus* puede explicarse por la degradación de las mismas causada por el propio hongo.

En cuanto a la producción de fumonisinas, esta micotoxina fue detectada sólo en un 40% de las muestras, particularmente en etapas previas al ensilado, y los niveles detectados estuvieron por debajo del límite recomendado por la Unión Europea para alimentos destinados al consumo animal (1400 µg/kg) (CE, 2006). Estos resultados son consistentes con lo reportado en silos de maíz y arroz (Latorre *et al.*, 2015; Uegaki *et al.*, 2013; González-Pereyra *et al.*, 2011). Estos autores no observaron ningún aumento en los niveles de fumonisinas en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, sugiriendo que las fumonisinas en los granos ensilados son principalmente producidas durante la pre-cosecha y no durante el tiempo de ensilado. Por otra parte, en estudios realizados por otros autores en silos de sorgo y maíz (Reyes-Velázquez *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 2000), si bien el porcentaje de muestras contaminadas es mayor, los niveles de fumonisinas encontrados también son bajos. Por otra parte, Boudra & Morgavi (2008) demostraron que el contenido de materia seca en los ensilados puede afectar la estabilidad de las fumonisinas durante el tiempo de ensilado, siendo la tasa de degradación de dicha toxina mayor en silos con bajo contenido en materia seca.

La presencia de *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Gliocladium*, *Monoascus*, *Graphium*, *Mucor*, *Geotrichum*, *Scopulariopsis* y *Schizophyllum* también deben ser considerada de importancia ya que son géneros muy adaptados a las condiciones de ensilado, además de ser importantes degradadores de tejidos vegetales ligno-celulósicos y potenciales productores de micotoxinas (Garon *et al.*, 2006). Esto puede llevar a una disminución en el valor nutricional del material ensilado no solo por la posible acumulación de micotoxinas sino porque la presencia de estos hongos resulta en un ablandamiento de la cubierta de los granos, lo que provoca una mayor disponibilidad de su contenido para ser degradado por otros microorganismos. Estos géneros fueron encontrados en el presente estudio, principalmente a los 90 y 180 días de almacenamiento, siendo esto similar a lo encontrado por otros autores (Cheli *et al.*, 2013; Garon *et al.*, 2006; Brady *et al.*, 2005 y El-Shanawany *et al.*, 2005).

2. Ecofisiología de cepas toxicogénicas

En este trabajo se evaluó la ecofisiología de las cepas de *F. nygamai*, *F. graminearum* y *A. flavus* que presentaron mayor capacidad de producción de micotoxinas. Los resultados obtenidos muestran que *F. nygamai* tolera un amplio rango de temperaturas en ambas actividades hídricas analizadas, encontrándose el crecimiento óptimo a una a_w de 0,995 y 30°C, lo cual es acorde a lo mencionado en estudios de *F. nygamai* (Burgess *et al.*, 1989; Burgess & Trimboli, 1986). Marín (1998), que estudió cepas de *F. proliferatum* y *F. verticillioides*, ambas pertenecientes al complejo *Gibberella fujikuroi* e importantes productores de fumonisinas, encontró que el óptimo crecimiento se daba en estas mismas condiciones, a_w 0,995 y 30°C, independientemente del sustrato utilizado (maíz, trigo, cebada). Al mismo tiempo encontró una disminución del crecimiento a medida que iba descendiendo la temperatura de incubación (30, 25, 15 y 10°C). En este trabajo, se observó para *F. nygamai* un patrón similar de crecimiento, con la diferencia de que se evaluó el crecimiento a 37°C en lugar de 10°C. Por otra parte, Ferrochio *et al.* (2013) encontraron para *F. proliferatum* un crecimiento óptimo a 25°C cuando la actividad hídrica fue de 0,980, coincidiendo con los resultados obtenidos aquí para *F. nygamai*. La capacidad de estas especies de desarrollarse en un amplio rango de condiciones concuerda con estudios epidemiológicos que asocian estas especies principalmente a cultivos de verano, como sorgo y maíz, y a regiones cálidas, en donde son sometidos a importantes cambios de disponibilidad de agua y altas temperaturas (Cavaglieri *et al.*, 2009; Desjardins *et al.*, 2007 y 2000; De Souza & Formento, 2004).

En cuanto a la producción de fumonisinas por las cepas analizadas, éstas fueron detectadas a todas las temperaturas evaluadas, observándose un aumento de las mismas a mayores temperaturas, con un máximo de producción a 30°C. Este resultado concuerda con el obtenido por Marín *et al.* (2004), quienes encontraron producción óptima entre 20 y 30°C. Sin embargo, otros autores mencionan que las condiciones de producción de fumonisinas no son las mismas que para el crecimiento, y que la síntesis de las mismas se ve inducida a temperaturas marginales, bajo condiciones ambientales de estrés para el hongo, favoreciéndose la producción de fumonisinas a 15°C (Marín *et al.*, 1999; Marín, 1998; Norholt & Bullerman, 1982). Por otra parte, Marín *et al.* (1999) y Le Bars *et al.* (1994) mencionan para *F. verticillioides* una mayor producción a 20°C. Sin embargo, estudios sobre la expresión de genes involucrados en la síntesis de fumonisinas demuestran que hay mayor inducción de los mismos en torno a los 25°C (Marín, 2010), mientras que López-Errasquin

(2007) menciona una correlación positiva entre la expresión de estos genes y la producción de fumonisinas.

Por otra parte, *F. graminearum* parece presentar un menor rango de temperaturas a las que puede crecer, siendo más sensible a cambios de temperatura. Sin embargo, presenta un comportamiento similar a ambas actividades hídricas evaluadas, sugiriendo mayor tolerancia a pequeños cambios en la actividad hídrica. A partir de estos resultados, se podría deducir que para *F. graminearum*, la temperatura sería un factor significativo para el crecimiento, como lo mencionan otros autores (Sautour *et al.*, 2001; Marín *et al.*, 1995; Magan & Lacey, 1984). Esta especie presentó mayor desarrollo que *F. nygamai* a la temperatura óptima de crecimiento (25°C), como también lo observan Marín *et al.* (1998^a), no ocurriendo lo mismo para las demás temperaturas evaluadas. En cambio, se observa un marcado descenso en las velocidades de crecimiento a temperaturas inferiores o superiores a la óptima, además de ausencia de crecimiento a 37°C. Esto último concuerda con lo encontrado por Armando *et al.* (2013) y Marín (2010), que tampoco obtuvieron crecimiento a 37°C, y a lo expresado por Hope (2003), que este hongo presenta crecimiento sólo entre 5 y 30°C, con un óptimo crecimiento a 25°, aw 0,995. Por otra parte, Schmidt-Heydt *et al.* (2011) reportaron un crecimiento muy lento a 15°C para todas las actividades hídricas evaluadas.

En cuanto a la producción de nivalenol (NIV) y deoxinivalenol (DON), todas las cepas estudiadas fueron productoras de ambos tricotecenos. A 15° C, si bien el desarrollo fúngico observado fue mínimo, es donde se observó la mayor producción para ambas toxinas. Esto podría explicarse porque la producción del gen TRI 5, involucrado en la síntesis de tricotecenos, se ve favorecida bajo condiciones diferentes a las de óptimo crecimiento (Marín, 2010). Sin embargo, son muchos los autores que mencionan condiciones contrarias a esto. Audenaert *et al.* (2013), Hope (2003) y Magan *et al.* (2010) consideran que se produce un aumento de DON al aumentar la temperatura de crecimiento, con un máximo de producción a 25°C, descendiendo bruscamente a 15°C, mientras que Kokkonen *et al.* (2010) no detectaron producción a 15°C. Por otra parte, Ramírez *et al.* (2006), Hope *et al.* (2005), Llorens *et al.* (2004) y Vesonder *et al.* (1982) encontraron que las condiciones óptimas para la producción de DON serían entre 25 y 30°C. Para NIV también mencionan una producción óptima a 25°C, aunque en cantidades diez veces menor que para DON (Hope, 2003). Este dato es contradictorio con lo observado en este estudio, en donde la producción de ambas toxinas es prácticamente la misma a la temperatura óptima de producción (15°C). En cuanto a los niveles detectados, estos fueron superiores a los reportados por otros autores. En el presente

trabajo, a las condiciones óptimas de producción (15°C), se encontraron niveles de 201 y 193 mg/kg para NIV y DON respectivamente, mientras que para Hope (2003) la máxima producción obtenida fue de 3 y 16 mg/kg para NIV y DON respectivamente a 25°C, y para Llorens *et al.* (2004) fue de 161 mg/kg para NIV, a 20°C, y de 1,5 mg/kg para DON, a 28°C. Starkey *et al.* (2007) y O'Donnell (2004) explican que estas variaciones podrían estar asociadas a la variabilidad intraespecífica de las cepas o a que los aislamientos no pertenecen a la misma especie dentro del complejo de *Fusarium graminearum*. En este caso todas las cepas utilizadas fueron identificadas como *F. graminearum sensu stricto*.

Aspergillus flavus, presentó grandes diferencias en la velocidad de crecimiento para ambas actividades hídricas evaluadas, con un patrón de crecimiento muy diferente al que presentaron las especies de *Fusarium* evaluadas. En este caso, se observó un crecimiento óptimo a 0,980 y 37°C, por lo que se podría deducir que las mejores condiciones de desarrollo se dan bajo condiciones de estrés hídrico leve. Resultados similares fueron obtenidos por otros autores como Formenti *et al.* (2012), que observaron para cepas aisladas de maíz, un mayor desarrollo a 0,98 frente a 0,99, mientras que Marín *et al.* (2012), para cepas aisladas de pistachos, determinaron que a menores actividades hídricas, se observa un mayor crecimiento a 37°C que para otras actividades hídricas superiores. Por otra parte, Sautour *et al.* (2001) encontraron que *A. flavus* aumentaba su velocidad de crecimiento a medida que descendía la actividad hídrica. Sin embargo, en estudios similares para aislamientos de *A. flavus* obtenidos de sorgo (Lahouar *et al.*, 2016) y de maíz (Marín *et al.*, 1998^b) se encontró que el óptimo desarrollo de *A. flavus* se daba 37°C y a actividades hídricas mayores a 0,99, observándose mayores velocidades de crecimiento bajo condiciones de altas temperaturas y humedad (Mohale *et al.*, 2013; Ramakrishna *et al.*, 1993).

Al analizar la capacidad toxicogénica, se observó producción de las cuatro aflatoxinas evaluadas por parte de todas las cepas estudiadas. La temperatura óptima de producción de B₁, B₂ y G₁ se situó a 25°C, mientras que para G₂ fue a 30°C. Para todas las aflatoxinas, se observó una disminución en la producción de las mismas a medida que aumentaba la temperatura de crecimiento, excepto para G₂. Este comportamiento es similar al encontrado por muchos autores, que mencionan que las temperaturas óptimas de producción de toxinas son diferentes a las óptimas de crecimiento, disminuyendo la producción al aumentar la temperatura hacia las condiciones óptimas de desarrollo fúngico (Gallo *et al.*, 2016; Asurmendi *et al.*, 2015; Medina *et al.*, 2014; Abdel-Hadi *et al.*, 2012; Giorni *et al.*, 2007; Kheiralla *et al.*, 1992; Northolt & Bullerman (1982). De esta forma, la producción de aflatoxinas podría considerarse como una adaptación a condiciones de estrés abiótico, siendo

favorecida por condiciones de estrés intermedio (Gallo *et al.*, 2016; Schmidt-Heydt *et al.*, 2008, Schmidt-Heydt *et al.*, 2009). Solo unos pocos estudios encontraron resultados diferentes a estos, en donde la mayor producción se da a mayor temperatura, coincidiendo con las condiciones de mayor desarrollo fúngico (Lahouar *et al.*; 2016; García *et al.*, 2013; Schmidt-Heydt *et al.*, 2010).

La principal aflatoxina producida en todos los casos fue B₁, en niveles del orden de 1000 µg/kg a las temperaturas de mayor producción. Para las demás aflatoxinas, el nivel más alto encontrado fue para B₂, representando solo un 13% de la producción de B₁, mientras que para las demás toxinas, los niveles fueron mucho menores. Giorni *et al.* (2008) evaluaron la presencia de las cuatro aflatoxinas, pero solo B₁ y B₂ fueron detectadas, representando B₂ el 0,5% de B₁. Esto explicaría por qué en la mayoría de los estudios ecofisiológicos analizan sólo la producción de B₁ (Gallo *et al.*, 2016; Lahouar *et al.*; 2016; Asurmendi *et al.*, 2015; Medina *et al.*, 2014; Abdel-Hadi *et al.*, 2012; Giorni *et al.*, 2011; Etcheverry *et al.*, 1998), y solamente algunos la producción de más de una aflatoxina (García *et al.*, 2013; Schmidt-Heydt *et al.*, 2011). En cuanto a los niveles de B₁ encontrados, estos superan los encontrados por Asurmendi *et al.* (2015) y Giorni *et al.* (2008), para cepas aisladas de cebada (328 µg/kg) y maíz (713 µg/kg), mientras que Lahouar *et al.* (2016) y Schmidt-Heydt *et al.* (2011) reportan valores que duplican los encontrados en este trabajo.

Dado que el principal destino de los silos de grano húmedo de sorgo es la alimentación animal, es de mucha importancia conocer la presencia de especies productoras de micotoxinas presentes en el mismo, como así también su ecofisiología y capacidad toxicogénica. El presente trabajo muestra la gran diversidad fúngica y los niveles de contaminación con micotoxinas que presentan este tipo de silos en el Uruguay. Los resultados obtenidos sugieren que cuando se utilizan buenas prácticas de manejo de los silos, el ambiente interno del silobag permite preservar durante el almacenamiento las condiciones higiénicas iniciales del grano, sin variaciones significativas de contaminación fúngica o con micotoxinas durante los primeros meses. Luego de los 6 meses de almacenamiento, estas condiciones parecen cambiar, por lo que se recomendaría el consumo del alimento en un período menor, o elaborar silos más pequeños que permitan este tiempo de consumo. Mayor investigación es necesaria sobre los factores que determinan el desarrollo fúngico y la composición microbiana dentro de los silos, particularmente en períodos mayores a 6 meses. Por otra parte, los estudios ecofisiológicos de cepas toxicogénicas aisladas de los mismos apoyan la distribución de estas especies dentro de los diferentes estadios del silo, aportando nuevos conocimientos sobre las condiciones óptimas en las que se podrían acumular

micotoxinas producidas por estas especies. Esto permitirá un mejor manejo del alimento, a fin de poder evitar futuros problemas en la salud animal e indirectamente en la salud humana, debido a que algunas micotoxinas pueden ser metabolizadas por el animal y transferidas a la leche, con la consiguiente contaminación de sus derivados.

CONCLUSIONES

El 80% de las muestras de silos presentó contaminación fúngica mayor a la recomendada para alimentación animal.

Los principales géneros fúngicos encontrados fueron *Penicillium* y *Aspergillus*.

Se encontraron en los silos importantes especies toxicogénicas como ser *Aspergillus flavus*, *Fusarium nygamai* y *F. graminearum*.

Se encontraron además importantes géneros degradadores de compuestos ligno-celulósicos que pueden deteriorar el alimento, disminuyendo su valor nutricional.

A pesar de la alta contaminación de las muestras con especies toxicogénicas, no se detectaron niveles de micotoxinas que superaran los límites establecidos para consumo animal.

El desarrollo de las principales especies toxicogénicas encontradas como también su capacidad de producción de micotoxinas se ve alterado por factores ecofisiológicos como disponibilidad de agua y temperatura, siendo este último el factor más importante.

Las condiciones óptimas de producción de micotoxinas no siempre coinciden con las condiciones óptimas de crecimiento, por lo que la ausencia de desarrollo fúngico no sería indicativo de ausencia de micotoxinas.

La producción de aflatoxinas por *A. flavus* y la producción de NIV y DON por *F. graminearum* se ve favorecida por condiciones de estrés leve, mientras que la producción de fumonisinas por *F. nygamai* se ve favorecida bajo condiciones favorables de desarrollo fúngico.

Se plantean recomendaciones sobre buenas prácticas de elaboración y manejo de los silos, sugiriendo el consumo de los mismos en períodos menores a 6 meses.

Es necesario un mayor monitoreo de los ensilados en diferentes etapas de almacenamiento a fin de evitar el consumo de micotoxinas por parte del ganado vacuno, principal destino de este alimento.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H. K., Duke, S. O. & Tanaka, T., 1993. Phytotoxicity of fumonisin and related compounds. *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, 12:225-251.
- Abdel-Hadi, A. Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R. & Magan, N., 2012. A systems approach to model the relationship between aflatoxin gene cluster expression, environmental factors, growth and toxin production by *Aspergillus flavus*. *Journal of the Royal Society Interface*, 9:757-767.
- Abramson, D., 1991. Development of molds, mycotoxins and odors in moist cereals during storage. En: *Cereal Grain. Micotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Developments in Food Science*, vol. 26 (ed. Chelkowski, J.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda. pp. 119-147.
- Acosta, Y., 2010^a. Ensilaje de Grano Húmedo de Sorgo: Detalles de confección y su aspecto sobre el valor nutricional. *Actividades de Difusión N° 604*, INIA Treinta y Tres, Treinta y Tres, Uruguay. pp. 1-8.
- Acosta, Y., 2010^b. Ensilaje de Grano Húmedo de Sorgo: detalles de confección y su efecto sobre el valor nutricional. *Jornada de Divulgación de Ensilaje de Grano Húmedo de Sorgo*, INIA Treinta y Tres, Treinta y Tres, Uruguay.
- Adams, J. M., 1977. A review of the literature concerning losses in stored cereals and pulses. *Tropical Science*, 19:1–27.
- Ahmed, K. M. & Ravinder Reddy, C., 1993. A pictorial guide to the identification of seedborne fungi of sorghum, pearl millet, chickpea, pigeonpea and groundnut. *Information Bulletin No. 34*. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), India.
- Alonso, V., Pereyra, C., Keller, L., Dalcerno, A., Rosa, C., Chiacchiera, S. & Cavaglieri, L., 2013. Fungi and mycotoxins in silage: an overview. *Journal of Applied Microbiology*, 115:637-643.
- Alonso, V., Monge, M., Dalcero, A., Keller, K., Rosa, C., Cavaglieri, L. & Chiacchiera, S., 2009. Contribution of raw materials on dairy cattle feedstuff aflatoxin contamination in central Argentina. *Revista Brasileira de Medicina Veterinaria* 31: 92–99.
- Alves dos Reis, T., Zorzete, P., Rodrigues, Pozzi, C., Nascimento da Silva, V., Ortega, E. & Correa, B., 2010. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian sorghum from sowing to harvest. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 90:1445-1451.

- Amusa, N. & Falola O., 2004. Pre-harvest fungal infection of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) cultivars in the humid forest agroecological zones of Nigeria. *Acta Fytotechnica et Zootechnica*, 7:7-10.
- Armando, M. R., Dogi, C. A., Poloni, V., Rosa, C. A., Dalcerno, A. M. & Cavaglieri, L. R., 2013. *In vitro* study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3):182-188.
- Asurmendi, P., Barberis, C., Pascual, L., Dalcero, A. & Barberis, L., 2015. Influence of *Listeria monocytogenes* and environmental abiotic factors on growth parameters and aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Journal of Stored Products Research*, 60:60-66.
- Audenaert, K., Vanheule, A., Höfte, M. & Haesaert, G., 2013. Deoxynivalenol: A major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. *Toxins*, 6:1-19.
- Ayalew, A., Fechrmann, H., Lepschy, J., Beck, R. & Abate, D., 2006. Natural occurrence of mycotoxins in staple cereals from Ethiopia. *Mycopathologia*, 162:57-63.
- Baldi, F., Mieres, J. M. & Banchero, G., 2008. Utilización de Ensilaje de grano húmedo de sorgo en la recría y engorde vacuno. Jornada de Divulgación sobre Silo de Grano Húmedo de Sorgo, Aiguá, Treinta y Tres, Uruguay.
- Balmas, V., Corda, P., Marcello, A. & Bottalico, A., 2000. *Fusarium nygamai* associated with Fusarium Foot Rot of rice in Sardinia. *Plant Disease*, 84:807.
- Bandopadyay, R., Butler, D. R., Chandrasekhar, A., Reddy, R. K. & Navi, S. S., 2000. Biology, epidemiology and management of sorghum grain mold. En: Technical and institutional options for sorghum grain mold management: proceedings of an international consultation (eds. Chandrasekhar, A., Bandopadyay, R. & Hall, A. J.). International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), India. pp. 34-71.
- Basílico, J. C., 1995. Micotoxinas en Alimentos. Centro de Publicaciones Universidad Nacional Del Litoral, Santa Fe, Argentina. pp: 8-9.
- Battacone, G., Nudda, A. Cannas, A., Cappio Borlino, A., Bomboi, G. & Pulina, G., 2003. Excretion of aflatoxin M1 in milk of dairy ewes treated with different doses of aflatoxin B1. *Journal of Dairy Science*, 86(8):2667-2675.
- BCR, 2016. Catálogo de Daños y Defectos Comerciales de Granos. Bolsa de Comercio de Rosario.
- Consultado on-line: <http://www.bcr.com.ar/Pages/Laboratorios/verCatalogo.aspx>

- Betina, V., 1989. *Mycotoxins-Chemical, Biological and Enviromental Aspects*. Elsevier, Amsterdam, Holanda.
- Boudra, H., Barnouin, J., Dragacci, S. & Morgavi, D. P., 2007. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in raw bulk milk from French dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 90:3197-3201.
- Boudra, H. & Morgavi, D. P., 2008. Reduction in fusarium toxin levels in corn silage with low dry matter and storage time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12):4523-4528.
- Brady, K., O'Kiely, P., Forristal, P. & Fuller, H., 2005. *Schizophyllum commune* on big-bale grass silage in Ireland. *Mycologist*, 19(1):30-35.
- Bullerman, L. & Draughon, F., 1994. Fusarium moniliforme and fumonisin symposium. Introduction. *Journal of Food Protection*, 57(6):523.
- Bullerman, L., Schroeder, L. & Park, K., 1984. Formation and control of mycotoxins in food. *Journal of Food Protection*, 47:637.
- Burgess, L., Summerell, B., Bullock, S., Gott, K. & Backhouse, D., 1994. *Laboratory manual for Fusarium research*. 3rd Edition. University of Sydney. pp 156.
- Burgess, L. W., Nelson, P. E. & Toussoun, T. A., 1989. Stability of Morphological Characters of *Fusarium nygamai*. *Mycologia*, 81(3):480-482.
- Burgess, L. W. & Trimboli, D., 1986. Characterization and Distribution of *Fusarium nygamai*, sp. nov. *Mycologia*, 78(2):223-229.
- Carlson, M., Ensley, S., Grant, R. & Smith, D., 2014. Aflatoxina M1 en Leche. Engormix. Consultado on-line:
<http://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/sanidad/articulos/aflatoxina-leche-t315/p0.htm>
- Carter, C. J. & Cannon, M., 1977. Structural requirements for the inhibitory action of 12,13-epoxytrichothecenes on protein synthesis in eukaryotes. *Biochemical Journal*, 166:399-409.
- Cavaglieri, L. R., Keller, K. M., Pereyra, C. M., González Pereyra, M. L., Alonso, V. A., Rojo, F. G., Dalcero, A. M. & Rosa, C. A. R., 2009. Fungi and natural incidence of selected mycotoxins in barley rootlets. *Journal of Stored Products Research*, 45:147-150.
- CE, 2006. Reglamento Comunidad Europea (CE) N° 1881/2006. Consultado on-line:
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1881:20121203:ES:PDF>
- Chalkling, D., 2016. *Ensilaje de Grano Húmedo*. INIA.

- Consultado on-line:
http://www.inia.org.uy/estaciones/la_estanzuela/actividades/silos/g_humedos_08.pdf
- Chalkling, D., 2004. Problemática del almacenaje de granos con humedades intermedias.
Consultado on-line:
<http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/15630051107124828.pdf>
- Cheeke, P. & Shull, L., 1985. Mycotoxins. En: Natural Toxicants in Feeds and Poisonous Plants. AVI Publishing Company, Westport, Connecticut, Estados Unidos. pp. 393- 476.
- Chelkowski, J., 1991. Fungal pathogens influencing cereal seed quality at harvest. En: Cereal Grain. Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Developments in Food Science, vol. 26 (ed. Chelkowski, J.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda. pp. 53-66.
- Cheli, F., Campagnoli, A. & Dell'Orto V., 2013. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 183:1-16.
- Choudhary, P. L., Sharma, R. S., Borkhataria, V. N. & Desai, M. C., 1998. Effect of feeding aflatoxin B₁ on feed consumption through naturally contaminated feeds. *The Indian Journal of Animal Sciences*, 68:400-401.
- Cullen, J. M. & Newberne, P. N., 1994. Acute hepatotoxicity of aflatoxins. En: The Toxicity of Aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance (eds. Eaton, D. L. & Groopman, J. J.). Academic Press, San Diego, Estados Unidos. pp. 3-26.
- da Silva, J., Pozzi, C., Mallozzi, M., Ortega, E. & Correa, B., 2000. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ during storage of brazilian sorghum. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48:4352-4356.
- De María, P., 2011. Aflatoxinas. En: Correo Lechero N° 144. CONAPROLE, Montevideo, Uruguay.
- De Souza, J. C. & Formento, A. N., 2004. Estudio de anthesis en trigo y su relación con la fusariosis. En: VI Congreso Nacional de trigo. IV Simposio Nacional de Cultivos de Siembra Otoño-Invernal. INTA (Eds.). Buenos Aires. Pág. 221.
- Desjardins, A. E., Busman, M., Muhitch, M. J. & Proctor, R., 2007. Complementary host-pathogen genetic analyses of the role of fumonisins in the *Zea mays-Gibberella moniliformis* seedling interaction. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 70:149-160.
- Desjardins, A. E. & Proctor, R. H., 2001. Biochemistry and genetics of *Fusarium* toxins. En: *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium (eds. Summerell, B. A., Leslie, J. F.,

- Backhouse, D. Bryden, W. L. & Burgess, L. W.). APS Press, Minnesota, Estados Unidos. pp. 50-69.
- Desjardins, A. E., Manandhar, H. K., Plattner, R. D., Manandhar, G. G., Poling, S. M. & Maragos, C. M. 2000. *Fusarium* species from Nepalese rice and production of mycotoxins and gibberellic acid by selected species. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:1020-1025.
- Devegowda, G. & Murthy, T. N. K., 2008. Micotoxinas: sus efectos en aves y algunas soluciones prácticas. En: *El Libro Azul de Micotoxinas* (ed. Díaz, D.). Nottingham University Press, Nottingham, Reino Unido. pp. 27-60.
- Dicko, M., Gruppen, H., Traoré, A., Voragen, A. & van Berkel, W., 2006. Sorghum grain as human food in Africa: relevance of content of starch and amylase activities. *African Journal of Biotechnology*, 5(5):384-395.
- Diekman, M. A. & Green, M. L., 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science*, 70:1615-1627.
- Divakara, S., Santosh, P., Aiyaz, M., Ramana, M., Hariprasad, P., Nayaka, S. & Niranjana, S., 2014. Molecular identification and characterization of *Fusarium* spp. associated with sorghum seeds. *Journal of the Sciences of Food Agriculture*, 94:1132-1139.
- Dix, N. J. & Webster, J., 1995. Structure of Fungal Communities. En: *Fungal Ecology*. Chapman & Hall, Londres, Inglaterra. pp. 39-84.
- Dunière, L., Sindou, J., Chaucheyras-Durand, F., Chevallier, I. & Thévenot-Sergentet, D., 2013. Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*, 182:1-15.
- Eaton, D.L. & Gallagher, E.P., 1994. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34:135-170.
- EFSA, 2012. Modelling, predicting and mapping the emergence of aflatoxins in cereals in the EU due to climate change. *Reporte Científico Externo de EFSA*, European Food Safety Authority, Unión Europea.
- EFSA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal*, 39:1-27.
- Eckard, S., Wettstein, F., Forrer, H. & Vogelgsang, S., 2011. Incidence of *Fusarium* species and mycotoxins in silage maize. *Toxins* 3:949-967.
- Ellis, M., 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. C.A.B. International Mycological Institute Kew, Surrey, England.

- El-Shanawany, A., Eman Mostafa, M. & Barakat., A., 2005. Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic *Aspergillus* toxins. *Mycopathologia*, 159:281–289.
- Elmholt, S., 2008. Mycotoxins in the Soil Environment. En: *Secondary Metabolites in Soil Ecology*. *Soil Biology*, vol 14 (ed. Karlovsky, P.). Springer, Heidelberg, Alemania. pp. 167-203.
- Etcheverry, M., Magnoli, C., Dalcero, A., Chulze, S. & Lecumberry, S., 1998. Aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol production by *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium graminearum* in interactive cultures on irradiated corn kernels. *Mycopathologia*, 142:37–42.
- FAO, 2004. Reglamentos a nivel mundial para las Micotoxinas en los alimentos y las raciones en el año 2003. Estudio FAO Alimentación y Nutrición N° 81. Cuadernos técnicos de la FAO.
Consultado on-line: <http://www.fao.org/docrep/007/y5499s/y5499s00.html>
- Fernández, J., 2010. “Ergot” o rocío azucarado del sorgo. Consultado on-line: <http://sergiolacorte.blogspot.com.uy/2010/03/sorgo-ergot-o-rocio-azucarado.html>
- Ferrochio, L., Cendoya, E., Farnochi, M. C., Massad, W. & Ramirez, M. L., 2013. Evaluation of ability of ferulic acid to control growth and fumonisin production of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on maize based media. *International Journal of Food Microbiology*, 167:215-220.
- Fink-Gremmels, 2008. Micotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 25(2):172-180.
- Flores, M., Lizarraga, E., López de Cerain, A. & González, E., 2015. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. *Food Control*, 53:163-176.
- Formenti, S., Magan, N., Pietri, A. & Battilani, P., 2012. In vitro impact on growth, fumonisins and aflatoxins production by *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus flavus* using anti-fungal compounds and a biological control agent. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(1):247-256.
- Fornier de Serres, G., 1997. Micotoxinas producidas por los contaminantes fúngicos de los granos de cebada. Trabajo especial I de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
- Franco, T. S., Garcia, S., Hirooka, E. Y., Ono, Y. S. & dos Santos, J. S., 2011. Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. *Journal of Applied Microbiology*, 111:739-748.

- Frederiksen, R. A., Castor, L. L. & Rosenow, D. T., 1982. Grain mold, small seed and head blight: the *Fusarium* connection to head in sorghum. Proceedings of the 37th annual corn and sorghum industry research conference 37:26-36.
- Frisvad, J., Larsen, T., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J. Samson, R. & Nielsen, K., 2011. Fumonisin and Ochratoxin Production in Industrial *Aspergillus niger* Strains. PLoS One, 6(8): e23496.
- Frisvad, J., 1995. Mycotoxins and Mycotoxigenic Fungi in Storage. En: Stored-Grain Ecosystems (eds. Jayas, D., White, N. & Muir, W.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Estados Unidos. pp. 251-288.
- Gallo, A., Solfrizzo, M., Epifani, F. Panzarini, G. & Perrone, G., 2016. Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. International Journal of Food Microbiology, 217:162-169.
- Galtier P. 1999. Biotransformation and fate of mycotoxins. Journal of Toxicology: Toxin Reviews, 18:295-312.
- García, D., Ramos, A., Sanchis, V. & Marín, S., 2013. Modeling kinetics of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize based medium and maize grain. International Journal of Food Microbiology, 162:182–189.
- Gareis, M., 1993. Fusarium mycotoxins in animal feeds and effects on livestock. En: Occurrence and significance of mycotoxins. Proceedings of UK workshop (ed. Scudamore, K. A.). University of West London, Londres. pp. 7-15.
- Garon, D., Richard, E., Sage, L., Bouchart, V., Pottier, D. & Lebailly, P., 2006. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silages: experimental study. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54:3479-3484.
- Geisen, R., 1996. Multiplex polymerase chain reaction for the detection of potential aflatoxin and sterigmatocystin producing fungi. Systematic and Applied Microbiology, 19: 388–392.
- Gelderblom, W. C., Abel, S., Smuts, C. M., Marnewick, J., Marasas, W. F., Lemmer, E. R. & Ramljak, D., 2001. Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: Mechanisms related to cancer initiation and promotion. Environmental Health Perspectives, 109:291–300.
- Gimeno, A. & Martins, M. L., 2011. Introducción. En Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos. Special Nutrients, INC., Miami, Florida, Estados Unidos. pp. 13-16.

- Giorni, P., Battilani, P., Pietri, A. & Magan, N., 2008. Effect of controlled atmospheres on growth and aflatoxin production in vitro and in stored maize. *International Journal of Food Microbiology*, 122:209-213.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A. & Battilani, P., 2011. Growth and aflatoxin production of an Italian strain of *Aspergillus flavus*: influence of ecological factors and nutritional substrates. *World Mycotoxin Journal*, 4:425-432.
- Giorni, P., Magan, N., Pietri, A., Bertuzzi, P. & Battilani, P., 2007. Studies on *Aspergillus* section *flavi* isolated from maize in northern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 113:330-338.
- GMP, 2008. Certification Scheme Animal Feed Sector. Appendix 1: Product Standards (Including Residue Standards). The Hague: Productschap Dirvoeder 1-39.
- González, H. H. L., Martínez, E. J. & Resnik, S. L., 1997. Fungi associated with sorghum grain from Argentina. *Mycopathologia*, 139:35-41.
- González-Pereyra, M., Chiacchiera, S., Rosa, C., Sager, R., Dalcerno, A. & Cavaglieri, L., 2011. Comparative analysis of the mycobiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 91:1474-1481.
- González Pereyra, M. L., Alonso, V. A., Sager, R., Morlaco, M. B., Magnoli, C. E., Astoreca, A. L., Rosa, C. A. R., Chiacchiera, S. M., Dalcero, A. M. & Cavaglieri, L. R., 2008. Fungi and selected mycotoxins from pre- and postfermented corn silage. *Journal of Applied Microbiology*, 104:1034-1041.
- Goto, T., 1990. Mycotoxins: Current situation. *Food Reviews International*, 6(2):265-290.
- Hahn, D., Faubion, J. & Rooney, L. 1983. Sorghum phenolic acids, their high performance liquid chromatography separation and their relation to fungal resistance. *Cereal Chemistry*, 60:255-259.
- Harris, H. & Burns, R. 1973. Relationship between tannin content of sorghum grain and preharvest seed molding. *Agronomy Journal*, 65:957-959.
- Harrison, L. R., Colvin, B. M., Greene, J. T., Newman, L. E. & Cole Jr, J. R., 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2:217-221.
- Hein, V., 2001. Micoflora perteneciente al género *Fusarium* asociada a granos de cebada. Evaluación de especies potencialmente productoras de deoxinivalenol. Informe de pasantía de la Licenciatura en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

- Hocking, A., 2003. Microbiological facts and fictions in grain storage. Stored grain in Australia 2003. Proceedings of the Australian Postharvest Technical Conference, Canberra, 25–27 June 2003.
- Hope, R., 2003. Ecology and control of *Fusarium* species and mycotoxins in wheat grain. Tesis de doctorado, Universidad de Cranfield, Reino Unido.
- Hope, R., Aldred, D. & Magan, N., 2005. Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *F. culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain. Letters in Applied Microbiology, 40:295-300.
- Humpf, H. U., Schmelz, E. M., Filmore, F. I., Vesper, H., Vales, T. R., Wang, E., Menaldino, D. S., Liotta, D. C. & Merrill, A. H., 1998. Acylation of naturally occurring and synthetic 1-deoxysphinganine by ceramide synthase. Journal of Biological Chemistry, 273: 19060-19064.
- Hussein, H. S. & Brasel, J. M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, 167:101-134.
- IARC, 2002. Fumonisin B1. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. World Health Organization, 82:301–366.
- IARC, 1993. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Amines and Mycotoxins. IARC Press, Lyon, Francia. pp. 245-395.
- ICRISAT, 1987. ICRISAT Annual Report 1986. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (ICRISAT), India.
- Iha, M. H., Barbosa, C. B., Okada, I. A. & Trucksess, M. W., 2013. Aflatoxin M₁ in milk and distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yogurt and cheese. Food Control, 29(1):1-6.
- INALE, 2012. Algunas micotoxinas de importancia para la producción lechera. Niveles máximos indicados en distintos países. Instituto Nacional de la Leche. Consultado on-line: http://inale.org/innovaportal/file/2141/1/limites_micotoxinas_2012.pdf
- Indira, S. & Rana, B. S., 1997. Variation in physical seed characters significant in grain mold resistance of sorghum. En: Proceedings of the International Conference on Genetic improvement on Sorghum and Pearl Millet, Lubbock, 23-27 September 1996. INTSORMIL and ICRISAT. pp. 652-653.
- Irigoyen, A. & Perrachon, J., 2007. Sorgo Granífero. Revista Plan Agropecuario N° 123:52-55.

- Jambunatham, R., Kherdekar, M. & Stenhouse, J., 1992. Sorghum grain hardness and its relationship to mold susceptibility and mold resistance. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 40:1403–1408.
- Juan, C., 2008. Análisis de aflatoxinas y ocratoxina A en alimentos y evaluación de la ingesta poblacional. Tesis de doctorado. Universidad de Valencia, Valencia, España.
- Juan, C., Burdaspal, P. & Soriano, J., 2007. Aflatoxinas del grupo B y G. En: *Micotoxinas en Alimentos* (ed. Soriano del Castillo, J.). Díaz de Santos, Madrid. pp. 167-181.
- Karunaratne, A. E. & Bullerman, L. B., 1990. Interactive effects of spore load and temperature on aflatoxin production. *Journal of Food Protection*, 53:227-229.
- Klich, M., 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- Klich, M. & Pitt, J., 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *Aspergillus parasiticus* and other closely related species. *Transaction of British Mycological Society* 91: 99–108.
- Kheiralla, Z. H., Hassanin, N. I. & Amra, H., 1992. Effect of incubation time, temperature and substrate on growth and aflatoxin production. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 30:17-27.
- Keller, L., González-Pereyra, C., Keller, K., Alonso, V., Oliveira, A., Almeida, T., Barbosa, T., Nunes, L., Cavaglieri, L. & Rosa, C., 2013. Fungal and mycotoxins contamination in corn silages: monitoring risk before and after fermentation. *Journal of Stored Products Research*, 52: 42-47.
- Keller, L. A. M., Pereyra, C. M., Cavaglieri, L. R., Keller, K. M., Almeida, T. X., Deveza, M. V., Assad, R. Q. & Rosa, C. A. R., 2012. Fungi and aflatoxin B1 in pre and post-fermented sorghum trech type silos destined to bovine intensive-rearing in Brazil. *Revista Bio Ciencias*, Año 3, 2(1):81-91.
- Kokkonen, M., Ojala, L., Parikka, P. & Jestoi, M., 2010. Mycotoxin production of selected *Fusarium* species at different culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 143:17-25.
- Khosravi, A., Dakhili, M. & Shokri, H., 2008. A mycological survey on feed ingredients and mixed animal feeds in Ghom Province, Iran. *Pakistan Journal of Nutrition* 7: 31–34.
- Kurata, H., 1990. Mycotoxins and Mycotoxicosis: Overview. En: *Microbial Toxins in Foods and Feeds. Cellular and Molecular Modes of Action* (eds. Pohland, A. E., Dowell Jr., V. R. & Richard, J. L.). Springer, Estados Unidos. pp 249-259.
- Lacey, J., 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of food and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology. Symposium Supplement*, 11S-25S.

- Lacey, J. & Magan, N., 1991. Fungi in cereal grains: their occurrence and water and temperature relationships. En: Cereal Grain. Micotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage, Developments in Food Science, vol. 26. (ed. Chelkowski, J.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda. pp. 77-118.
- Lahouar, A., Marín, S., Crespo-Sempere, A., Said, S. & Sanchis, V., 2016. Effects of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and aflatoxin B1 production by toxigenic *Aspergillus flavus* isolates on sorghum seeds. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(1):78-85.
- Latorre, A., Dagnac, T., Fernández, B. & Llompert, M., 2015. Occurrence and stability of masked fumonisins in corn silages samples. *Food Chemistry*, 189:38-44.
- Lazzari, F. A., 1997. Fungos. En: Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de Sementes, Grãos e Rações. Paranaset, Curitiba. pp. 23-38.
- Le Bars, J., Le Bars, P., Dupuy, J., Boudra, H. & Cassini, R., 1994. Biotic and abiotic factors in fumonizin B1 production and stability. *Journal of AOAC International*, 77:517-521.
- Leal, M. & González de Mejía, E., 1997. Review: Toxicological and nutritional implications of T-2 toxin. *Food Science and Technology International*, 3(4):241-250.
- Leathwood, P. D., 1987. Tryptophan availability and serotonin synthesis. *Proceedings of Nutrition Society*, 46:143-156.
- Lee, S. & Taylor, J., 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. En: PCR protocols: a guide to methods and applications (eds. Gelfand, M., Snindky, D. & White, J.), Academic Press, San Diego. pp. 282-287.
- Leslie, J. F. & Summerell, B. A., 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing, Estados Unidos.
- Leslie, J. F., Zeller, K. A., Lamprecht, S. C., Rheeder, J. P., & Marasas, W. F. O., 2005. Toxicity, pathogenicity, and genetic differentiation of five species of *Fusarium* from sorghum and millet. *Phytopathology*, 95:275-283.
- Liu, B., Yu, F., Wu, T., Li, S., Su, M., Wang, M. & Shih, S., 2003. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicology Applied and Pharmacology*, 191:255-263.
- Llorens, A., Mateo, R., Hinojo, M. J., Valle-Algarra, F. M. & Jiménez, M., 2004. Influence of environmental factors on the biosynthesis of type B trichothecenes by isolates of *Fusarium* spp. from Spanish crops. *International Journal of Food Microbiology*, 94:43-54.

- López-Errasquín, E., Vázquez, C., Jiménez, M. & González-Jaén, M. T., 2007. Real-Time RT-PCR assay to quantify the expression of *fum1* and *fum19* genes from the Fumonisin-producing *Fusarium verticillioides*. *Journal of Microbiological Methods*, 68:312-317.
- Maier, F. J., Miedaner, T., Hadel, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., Kassner & H., Schäfer, W., 2006. Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology*, 7(6):449-461.
- Maiti, R. K., Raju, P. S. & Bidinger, F. R., 1985. Studies on germinability and some aspects of pre-harvest physiology of sorghum grain. *Seed Science and Technology*, 13:27-35.
- Magan, N., Aldred, D., Mylona, K. & Lambert, R.J.W., 2010. Limiting mycotoxins in stored wheat. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 27:644–650.
- Magan, N., Hope, R. & Aldred D., 2006. Ecophysiology of *Fusarium culmorum* and mycotoxin production. En: *Advances in Food Mycology. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 571 (eds. Hocking, A., Pitt, J., Samson, R. & Thrane, U.). Springer, Estados Unidos. pp. 123-138.
- Magan, N. & Lacey, J., 1984. Water relations of some *Fusarium* species from infected wheat ears and grain. *Transactions of the British Mycological Society*, 83:281-285.
- Magan, N. & Lacey, J., 1988. Ecological determinants of mould growth in stored grain. *International Journal of Food Microbiology*, 7:245-256.
- Magnoli, C., Saenz, M., Ferrero, S., Chiacchiera, S. & Dalcerio, A., 1999. Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisins production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, 145:35-41
- Marasas, W. F. O., Riley, R. T., Hendricks, K. A., Stevens, V. L., Sadler, T. W., Van Waes, J. G., Missmer, S. A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W. C. A., Allegood, J., Martínez, C., Maddox, J., Miller, J. D., Starr, L., Sullards, M. C., Roman, A. V., Voss, K. A., Wang, E. & Merrill Jr, A. H., 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and *in vivo*: A potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated Maize. *The Journal of Nutrition*, 134:711-716.
- Marasas, W. F. O., Miller, D. J., Riley, R. T. & Visconti, A., 2001. Fumonisin— Occurrence, toxicology, metabolism and risk assessment. En: *Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium* (eds. Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D., Bryden, W. L. & Burgess L. W.). APS Press, St. Paul, Minnesota. pp. 332-359.

- Marasas, W. F. O., Kellerman, T. S., Gelderblom, W. C., Coetzer, J. A., Thiel, P. G. & Van der Lugt, J. J., 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 55:97–203.
- Marín, P., 2010. Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de “*Fusarium*”. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, España.
- Marín, S., Ramos, A. & Sanchis, V., 2012. Modelling *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production in pistachio nuts. *Food Microbiology*, 32:378-388.
- Marín, S., Magan, N., Ramos, A. J. & Sanchis, V., 2004. Fumonisin-producing strains of *Fusarium*: A review of their ecophysiology. *Journal of Food Protection*, 67:1792-1805.
- Marín, S., Magan, N., Belli, A., Ramos, A. J., Canela, R., & Sanchis, V., 1999. Two-dimensional profiles of fumonisin B-1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, 51:159-167.
- Marín, S., 1998. Ecofisiología de cepas de *Fusarium* productoras de fumonisinas. Tesis de doctorado. Universidad de Lleida, España.
- Marín, S., Companys, E., Sanchis, V., Ramos, A. J. & Magan, N., 1998^a. Effect of water activity and temperature on competing abilities of common maize fungi. *Mycological Research*, 120:950-964.
- Marín, S., Sanchis, V., Sáenz, R., Ramos, A., Vinas, I. & Magan, N., 1998^b. Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. *Journal of Applied Microbiology*, 84:25-36.
- Marín, S., Sanchis, V., & Magan, N., 1995. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. *Canadian Journal of Microbiology*, 41:1063-1070.
- Marsalis, M., 2011. Advantages of forage sorghum for silage in limited input systems. En: *Proceedings, 2011 Western Alfalfa & Forage Conference, Las Vegas, Nevada*. Consultado on-line: <http://alfalfa.ucdavis.edu/+symposium/proceedings/2011/11-66.pdf>
- Martins, M.L. & Martins, H.M., 2001. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 98: 179-183.
- Massey, T. E., Stewart, R. K., Daniels, J. M. & Liu, L., 1995. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B-1 Carcinogenicity. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 208(3):213-227.

- McCormick, S., 2003. The Role of DON in Pathogenicity. En: *Fusarium Head Blight of Wheat and Barley* (ed. Leonard, K. J. & Bushnell, W. R.). APS Press, Minnesota, Estados Unidos. pp. 165-183.
- McDonald, P., Henderson, A. R. & Heron, S. J. E., 1991. *The Biochemistry of Silage*. Chalcombe Publications, Kingston, Reino Unido.
- McLaughlin, C. S., Vaughan, M. H., Campbell, L. M., Wei, C. M., Stafford, M. E. & Hansen, B. S., 1977. Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. En: *Mycotoxins in Human and Animal Health* (eds. Rodricks, J. V., Hesseltine, C.W. & Mehlman, M. A.). Pathotox Publishers, Park Forest South, Illinois, Estados Unidos. pp. 262–272.
- Medina, A., Rodríguez, A. & Magan, N., 2014. Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B₁ production. *Frontiers in Microbiology*, 5(348):1-7.
- Menkir, A., Ejeta, G., Butler, L. & Melakeberhan, A., 1996. Physical and chemical kernel properties associated with resistance to grain mold in sorghum. *Cereal Chemistry*, 73: 613-617.
- Merrill, A. H., Van Echten, G., Wang, E. & Sandhoff, K., 1993. Fumonisin B₁ inhibits sphingosine (sphinganine) *N*-acyltransferase and *de Novo* sphingolipid biosynthesis in cultured neuron *in Situ*. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(36):27299-27306.
- Meronuck, R., 1987. The significance of fungi in cereal grains. *Plant Disease*, 71:287-292.
- MFDS, 2010. Aflatoxin Risk Profile. Ministry of Food and Drug Safety.
Consultado on-line: http://www.foodnara.go.kr/foodnara/board-read.do?boardNo=1309162875941&command=READ&mid=S07_05_03&boardId=series
- MGAP, 2001. Decreto 26/12/01, ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Montevideo, Uruguay.
- Miller, J. D., ApSimon, J. W., Blackwell, B. A., Greenhalgh, R. & Taylor, A., 2001. Deoxynivalenol: A 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance. En: *Fusarium*. Paul E. Nelson Memorial Symposium (eds. Summerell, B. A., Leslie, J. F., Backhouse, D. Bryden, W. L. & Burgess, L. W.). APS Press, Minnesota, Estados Unidos. pp. 310-320.
- Mills, J., 1989. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. Citado por: Fornier de Serres, G., 1997. Micotoxinas producidas por los contaminantes fúngicos de los granos de cebada. Trabajo especial I de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay.

- Mohale, S., Magan, N. & Medina, A, 2013. Comparison on growth, nutritional utilisation patterns, and niche overlap indices of toxigenic and atoxigenic *Aspergillus flavus* strains. *Fungal Biology*, 117:650-659.
- Montiel, M. D. & Depetris, G., 2007. Silos de Grano Húmedo de Sorgo. *Producir XXI*, 15(183):20-24.
- Moreno, E., 2011. Micotoxicosis en aves.
Consultado on-line: <http://www.timbrado.com/micotoxicosis.shtml>
- Moss, M., 1996. Mycotoxins, centenary review. *Mycological Research*, 100(5):513-523.
- MSP, 2001. Decreto 533/01, Ministerio de Salud Pública. Montevideo, Uruguay.
- Navas, S. A., Sabino, M. & Rodriguez-Amaya, D. B., 2005. Aflatoxin M(1) and ochratoxin A in a human milk bank in the city of Sao Paulo, Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 22(5):457-462.
- Navi, S. S., Bandyopadhyaya, R., Reddy, R. K., Thakur, R. P. & Yang, X. B., 2005. Effects of wetness duration and grain development stages on sorghum grain mold infection. *Plant Disease*, 89:872-878.
- Nelson, P. E., Desjardins, A. E. & Plattner, R. D., 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry, and significance. *Annual Review of Phytopathology*, 31:233-252.
- Nelson, P., Plattner, D., Shackelford, D. & Desjardins, E., 1992. Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in section *Liseola* and some related species. *Applied Environmental Microbiology*, 58:984-989.
- Nelson, P., Toussoun, T. & Marasas, W., 1983. *Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification*. Pennsylvania State University Press, Pennsylvania, USA.
- Norred, W. P., 1986. Occurrence and clinical manifestations of aflatoxicosis. En: *Diagnosis of Mycotoxicosis* (eds. Richard, J. L. & Thurston, J. R.). Martinus Nijhoff Publishers, Boton, Estados Unidos. pp. 11-29.
- Northolt, M. & Bullerman, L., 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environments conditions. *Journal of Food Protection*, 45:519-526.
- Nkwe, D., Taylor, J. & Siame, B., 2005. Fungi, aflatoxins, fumonisin B and zearalenone contaminating sorghum-based traditional malt, wort and beer in Botswana. *Mycopathologia*, 160:177-186.
- O'Brien, M., Egan, D., O'kiely, P., Forristal, P.D., Doohan, F.M. & Fuller, H.T., 2008. Morphological and molecular characterisation of

- P. roqueforti* and *P. paneum* isolated from baled grass silage. *Mycological Research*, 112, 921–932.
- O'Donnell, K., Ward, T. J., Geiser, D. M., Kistler, H. C. & Aoki, T., 2004. Genealogical concordance between mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum* clade. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 600-623.
- O'Donnell, K., Kistler, H., Cigelnik, E. & Ploetz, R., 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 95:2044-2049.
- Odamttem, G. T., Appiah, V. & Langerak, D. I., 1987. Influence of the inoculum size of *Aspergillus flavus* Link on the production of aflatoxin B1 in maize medium before and after exposure to combination treatment of heat and gamma radiation. *International Journal of Food Microbiology*, 4:119-127.
- Ogundero, V.W. ,1989. Toxigenic fungi and deterioration of Nigerian poultry feeds. *Mycopathologia*, 100: 75–83.
- Pan, D., 2000. Contaminantes fúngicos y micotoxinas en granos de trigo. Trabajo especial I de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
- Pan D., 2001. Contaminantes fúngicos y micotoxinas contaminantes de granos de maíz almacenados. Trabajo especial II de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
- Paterson, R. R. M. & Lima, N., 2010. How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 43:1902–1914.
- Pelhate, J., 1968. *Mycopathology*. Citado por: Marín, S., 1998. *Ecofisiología de cepas de Fusarium productoras de fumonisinas*. Tesis de doctorado. Universidad de Lleida, España.
- Pelhate, J., 1977. Maize silage: incidence of moulds during conservation. *Folia Veterinaria Latina*, 7:1-16.
- Pestka, J. J., 2008. Mechanisms of Deoxynivalenol-Induced Gene Expression and Apoptosis. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 25(9):1128-1140.
- Pestka, J. J. & Smolinski, A. T., 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 8(1):39-69.

- Peterson, S. W., Ito, Y., Horn, B. W. & Goto, T., 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia*, 93:689-703.
- Placinta, C. M., D'Mello, J. P. F. & MacDonald, A. M. C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78:21-37.
- Prelusky, D. B., 1993. The effect of low-level of deoxynivalenol on neurotransmitter levels measured in pig cerebral spinal fluid. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 28:731-761.
- Prelusky, D. B., Rotter, B. A. & Rotter, R. G., 1994. Toxicology of Mycotoxins. En: *Mycotoxins in Grain. Compounds Other Than Aflatoxin* (eds. Miller, J. & Trenholm, H.). Eagan Press, St. Paul, Minnesota, Estados Unidos. pp. 359-403.
- Prelusky, D. B., Yeung, J. M., Thompson, B. K. & Trenholm, H. L., 1992. Effect of deoxynivalenol on neurotransmitters in discrete regions of swine brain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 22:36-40.
- Ramakrishna, N., Lacey, J. & Smith, E., 1993. Effects of water activity and temperature on the growth of fungi interacting on barley grain. *Mycological Research*, 97(11):1393-1402.
- Ramírez, M. L., Chulze, S. & Magan, N., 2006. Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grains. *International Journal of Food Microbiology*, 106:291-296.
- Ramos, A., Sanchis, V., Hukié, M. & Jasié, M., 1997. Mycotoxins in food. A review. Citado por: Pan, D., 2000. Contaminantes fúngicos y micotoxinas en granos de trigo. Trabajo especial I de la Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR, Montevideo, Uruguay.
- RBU, 1994. Reglamento bromatológico Nacional. Consultado on-line: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/315-1994>
- Reyes-Velázquez, W., Espinoza, V., Rojo, F., Jimenez, C., de Lucas, E., Hernández, J. & Ramírez, A., 2008. Occurrence of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25:182-185.
- Reyes-Velázquez, W., Jiménez, C., Rojo, F., Figueroa, M., Hernández, J., Landeros, P., López, Y., Isaías, V., Palacios, E. & Juárez, C., 2006. Evaluación de la calidad nutricional y contaminación por hongos y micotoxinas en el ensilado destinado al consumo animal.

- Avances en la Investigación Científica en el CUCBA, XVII Semana de la Investigación Científica, 813-818.
- Reynoso, M., Ramirez, M., Torres, A. & Chulze, S., 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 145, 444-448.
- Richard, J. L., 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses – An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119:3-10.
- Richard, J. L., 1998. Mycotoxins, toxicity and metabolism in animals-A system approach overview. En: *Mycotoxins and phycotoxins-Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety* (eds. Miraglia, Van Egmond, Brera & Gilbert). Alaken Inc., Fort Collins, Colorado, Estados Unidos. pp. 363-398.
- Riley, R. & Norred, W., 1996. Mechanisms of mycotoxicity. En: *The Mycota VI. Human and Animal Relationships* (eds. Howard D. H. & Miller, J. D.). Springer-Verlag, Berlín, Alemania. pp. 193-211.
- Riley, R.T. & Pestka, J., 2005. Mycotoxins: metabolism, mechanism and biochemical markers. En: *The mycotoxin blue book* (ed. Duarte Díaz). Nottingham University Press. pp. 279-294.
- Rodrigues Pozzi, C., Rodrigues Pozzi, J., Arcaro, I., Fagundes, H. & Correa, B., 2002. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. *Ciencia Rural*, 32(5). pp. 901-907.
- Consultado on-line: <http://www.scielo.br/pdf/cr/v32n5/11885.pdf>
- Roigé, M., Aranguren, S., Riccio, M., Pereyra, S., Soraci, A. & Tapia, M., 2009. Mycobiota and mycotoxins in fermented feed, wheat grains and corn grains in Sotheastern Buenos Aires Province, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26:233-237.
- Rosa, C., Ribeiro, J., Fraga, M., Gatti, M., Cavaglieri, L., Magnoli, C., Dalcero, A. & Lopes, C., 2006. Mycoflora of poultry feeds and ochratoxin-producing ability of isolated *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Veterinary Microbiology*, 113:89-96
- Rovira, P. & Velazco, J., 2012. Ensilaje de Grano Húmedo de Sorgo: Guía Práctica para su uso en la alimentación de ganado en regiones ganaderas. *Boletín de Divulgación* N° 101, INIA, Montevideo, Uruguay.
- Saarisalo, E., Skytta, E., Haikara, A., Jalava, T. & Jaakkola, S., 2007. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *Journal of Applied Microbiology*, 102:327–336.

- Samson, A., Hoekstra, E., Frisvad, J. & Filtenborg, O., 1995. Mycological media for food-borne fungi. Introduction to Food-Borne Fungi. Fourth Edition (eds. Samson, A., Hoekstra, E., Frisvad, J. & Filtenborg, O.) Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, The Netherlands. pp.308.
- Santin, E., 2008. Crecimiento de los hongos y producción de micotoxinas. En: El Libro Azul de Micotoxinas (ed. Diaz, D.). Nottingham University Press, Nottingham, Reino Unido. pp. 239-250.
- Sapumohotti, W., 2004. Existence of *Fusarium nygamai* in the southern region of Sri Lanka and a key for their characterization. Tropical Agricultural Research and Extensión, 7:50-154.
- Sauer, D. B., 1988. Mold invasion in relation to grain damage. Cereal Foods World, 33:489-490.
- Sautour, M., Dantigny, P., Divies, C. & Bensoussan, M., 2001. A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity. International Journal of Food Microbiology, 67:63-69.
- Scarpitta, N., 2008. ¿Qué necesitamos conocer sobre el silo de grano húmedo de sorgo? Revista Plan Agropecuario N° 126:48-54.
- Schmidt, H. L., 1991. Cereal grain structure and the way in which fungi colonize kernel cells. En: Cereal Grain. Micotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Developments in Food Science, vol. 26. (ed. Chelkowski, J.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda. pp. 1-22.
- Schmidt-Heydt, M., Abdel-Hadi, A., Magan, N. & Geisen, R., 2009. Complex regulation of the aflatoxin biosynthesis gene cluster of *Aspergillus flavus* in relation to various combinations of water activity and temperature. International Journal of Food Microbiology, 135:231-237.
- Schmidt-Heydt, M., Magan, N. & Geisen, R., 2008. Stress induction of mycotoxin biosynthesis genes by abiotic factors. FEMS Microbiology Letters, 284: 142-149.
- Schmidt-Heydt, M., Parra, R., Geisen, R. & Magan, N., 2011. Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species. Journal of the Royal Society Interface, 8:117–126.
- SCOOP, 2003. Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by population of EU Member States. Report on tasks for Scientific Cooperation. Consultado on-line: <http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/task3210.pdf>

- Scott, P. M., 1990. Trichothecenes in grains. *Cereal Foods World*, 35(7):661-666.
- Scussel, V. M., 1998. Fatores que favorecem o desenvolvimento de fungos e produção de toxinas. En: *Micotoxinas em Alimentos* (ed. Rolim de Moura, N.). Editora Insular Ltda., Florianópolis, Brasil.
- Seitz, L. M., Mohr, H. E., Burroughs, R. & Glueck, J. A., 1983. Preharvest Fungal Invasion of Sorghum Grain. *Cereal Chemists*, 60(2):127-130.
- Starkey, D. E., Ward, T. J., Aoki, T., Gale, L. R., Kistler, H. C., Geiser, D. M., Suga, H., Tóth, B., Varga, J. & O'Donnell, K., 2007. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity. *Fungal Genetics and Biology*, 44:1191-1204.
- Steciow, M., 2011. Micotoxicosis.
Consultado on-line: <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Micotoxi.htm>
- Somani, R. B. & Indira, I., 1999. Effect of grain mold on grain weight in sorghum. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 29:22-24.
- Squire, R. A., Ranking Animal carcinogens: a proposed regulatory approach. *Science*, 214:877-880.
- Stoloff, L., 1997. Aflatoxins: an overview. En: *Proceedings of a conference on mycotoxins in human and animal health*. Pathotox Publisher Inc., Park Forest South, Illinois, Estados Unidos. pp. 7-28.
- Storm, I., Kristensen, N., Raun, B., Smedsgaard, J. & Thrane, U., 2010. Dynamics in the microbiology of maize silage during whole-season storage. *Journal of Applied Microbiology*, 109:10171026.
- Sweeney, M. & Dobson, A., 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 43:141-158.
- Taylor, J. & Belton, P., 2002. Sorghum. En: *Pseudocereals and Less Common Cereals. Grain Properties and Utilization Potential* (eds. Belton, P. & Taylor, J.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Nueva York, Estados Unidos. pp. 25-91.
- Thakur, R.P., Rao, V. P., Agarkar, G. D., Solunke, R. B., Bhat, B. & Navi, S. S., 2006. Variation in occurrence and severity of major sorghum grain mold pathogens in India. *Indian Phytopathology*, 59(4):410-416.
- Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Sydenham, E. W., Shephard, G. S., Gelderblom, W. C. A. & Nieuwenhuis, J. J., 1991. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Applied Environmental Microbiology*, 57:1089-1093.

- Torres, L. & López, L., 2010. Consumo de fumonisinas y daños a la salud humana. Salud Pública de México, 52(5). Consultado on-line:
http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342010000500014
- Trenholm, H. L., Foster, B. C., Charmley, L. L., Thompsom, B. K., Hartin, K. E., Coppock, R. W. & Albassam, M. A., 1994. Effects of feeding diets containing *Fusarium* (naturally) contaminated wheat or pure deoxynivalenol (DON) in growing pigs. Canadian Journal of Animal Science, 74(2): 361-369.
- Trojanowska, K., 1991. Evaluation of cereal grain quality using microbiological methods. En: Cereal Grain. Micotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage. Developments in Food Science, vol. 26 (ed. Chelkowski, J.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Holanda. pp. 185-215.
- Turconi, G., Guarcello, M., Livieri, C., Comizzoli, S., Maccarini, L., Castellazi, A. M., Pietri, A., Piva, G. & Roggi, C., 2004. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn-an epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). European Journal of Nutrition, 43:191-197.
- Uegaki, R., Kobayashi, H., Inoue, H., Tohno, M. & Tsukiboshi, T., 2013. Changes of fumonisin production in rice grain during ensiling. Animal Science Journal, 84:48-53.
- Ueno, Y., 1984. Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. Citado por: Pestka, J. J., 2008. Mechanisms of Deoxynivalenol-Induced Gene Expression and Apoptosis. Food Additives and Contaminants: Part A, 25(9):1128-1140.
- Undersander, D., Smith, L., Kaminski, A., Kelling, K. & Doll, J., 1990. Sorghum-Forage. Alternative Field Crops Manual.
Consultado on-line: <https://hort.purdue.edu/newcrop/afcm/index.html>
- Vargas, J., Frisvad, J. & Samson, R., 2011. Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. Studies in Mycology 69:57-80.
- Velázquez, C. A., 1996. Análisis de Micotoxinas aminopolihidroxiladas. Servicio de Publicaciones, Universidad de Lleida. Consultado on-line:
http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UdL/AVAILABLE/TDX-0423101-174437/cavelazquez.pdf
- Velluti, A., 2002. Ecofisiología de especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas, zearalenona y deoxinivalenol en maíz. Aceites esenciales como inhibidores fúngicos. Tesis de doctorado. Universidad de Lleida, España.

- Vesonder, R. F., Ellis, J. J., Kwolek, W. F. & DeMarini, D. J., 1982. Production of vomitoxin on corn by *Fusarium graminearum* NRRL 5883 and *Fusarium roseum* NRRL 6101. *Applied and Environmental Microbiology*, 43:967-970.
- Visconti, A., Marasas, W. F. O., Miller, J. D. & Riley, R., 1999. Mycotoxins of growing interest: Fumonisin. Joint FAO/WHO/UNEP International Conference on Mycotoxins, 3, Tunis, 3-6 Marzo, Roma, Italia.
- Wagacha, J. M. & Muthomi, J. W., 2008. Mycotoxin problem in Africa: current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology*, 124:1-12.
- Wicklow, D.T., 1995. The mycology of stored grain: An ecological perspective. En: *Stored Grain Ecosystems* (eds. Jayas, D. S., White, N. D. G. & Muir, W. E.), Marcel Dekker, New York, pp 197-249.
- Yoshizawa, T. & Jin, Y. Z., 1995. Natural occurrence of acetylated derivatives of deoxinivalenol in wheat and barley in Japan. *Food Additives and Contaminants*, 12:689-694.
- Zain, M., 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15:129-144.
- Zak, J. & Wildman, H., 2004. Fungi in stressfull environments. En: *Biodiversity of Fungi. Inventory and Mornitorin Methods* (eds. Mueller, G., Bills, G. & Foster, M.). Elsevier Academic Press, Estados Unidos. pp. 303-314.

ANEXO I – Silos de grano húmedo de sorgo

Tabla A. Ubicación, variedad, tipo y contenido de taninos del sorgo utilizado en los silos

		Variedad de sorgo	Tipo de sorgo	Nivel de taninos	Lugar
Silo	1	556	Granífero	Bajo	San José
	2	ACA 558	Híbrido	Alto	San José
	3	Morgan 108	Híbrido	Alto	Flores
	4	ACA 558	Híbrido	Alto	San José
	5	Flash 10	Granífero	Bajo	Flores

Tabla B. Cronograma de muestreo de los silos utilizados

		Fecha de muestreo				
		Silo 1	Silo 2	Silo 3	Silo 4	Silo 5
Tiempo de almacenamiento	0 días	9/06/2011	4/05/2011	14/05/2011	4/05/2011	11/05/2011
	30 días	12/07/2011	8/06/2011	15/06/2011	8/06/2011	15/06/2011
	90 días	11/09/2011	9/08/2011	18/08/2011	9/08/2011	18/08/2011
	180 días	11/12/2011	9/11/2011	18/11/2011	9/11/2011	18/11/2011

ANEXO II – Selección de cepas toxicogénicas

Se analizaron 19 cepas de *Fusarium graminearum*, 30 cepas de *F. nygamai* y 56 cepas de *Aspergillus flavus* provenientes de diferentes muestras de acuerdo al siguiente esquema:

Número de aislamientos de *F. graminearum* analizados

		Tiempo de almacenamiento			
		0 días	30 días	90 días	180 días
Silo	1	18	-	-	-
	2	-	-	-	-
	3	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5	1	-	-	-

-_No se dispone de aislamientos

Las 3 cepas que presentaron mayor producción de deoxinivalenol (Fg1, Fg2 y Fg3) pertenecieron al silo 1, a tiempo 0 de almacenamiento.

Número de aislamientos de *F. nygamai* analizados

		Tiempo de almacenamiento			
		0 días	30 días	90 días	180 días
Silo	1	5	6	-	10
	2	-	5	-	-
	3	-	-	-	3
	4	1	-	-	-
	5	-	-	-	-

-_No se dispone de aislamientos

Las cepas seleccionadas, que presentaron mayor producción de fumonisinas pertenecen a **Silo 1 – 0 días** (Fn1 y Fn2) y **Silo 2 – 30 días** (Fn3).

Número de aislamientos de *A. flavus* analizados

		Tiempo de almacenamiento			
		0 días	30 días	90 días	180 días
Silo	1	1	15	-	-
	2	17	11	-	-
	3	1	-	-	1
	4	1	4	-	1
	5	1	2	1	-

-_No se dispone de aislamientos

Las cepas seleccionadas, que presentaron mayor producción de aflatoxina B₁ pertenecen a **Silo 2 – 30 días** (Af2), **Silo 3 – 180 días** (Af3) y **Silo 4 – 180 días** (Af1).

ANEXO III – Medios de cultivo

Dicloran Rojo de Bengala Cloranfenicol (DRBC)

Peptona	5 g
Glucosa	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
Dicloran	0,002 g
Rosa de Bengala	0,025 g
Agar	15 g

Agua destilada hasta volumen final de 1 L

Mezclar bien y fundir el agar. Colocar por último el Cloranfenicol (0,1 g). Esterilizar 15 minutos a 121°C.

Mung Bean Agar (MBA)

Porotos de Soja	40 g
Agar	15 g

Hervir los porotos con 500 ml de agua destilada hasta que se desprenda la cubierta de los mismos. Filtrar y agregar el agar, previamente fundido en 500 ml de agua destilada. Llevar a 1 litro con agua destilada. Esterilizar 15 minutos a 121°C.

Agar Papa Dextrosa (APD)

Papas blancas	250 g
Dextrosa	20 g
Agar	20 g

Lavar las papas, cortarlas en pequeños cubos y ponerlas a hervir en aproximadamente 500 ml de agua destilada durante 45 minutos. Filtrar y agregar el agar, previamente fundido en 500 ml de agua destilada. Agregar dextrosa y llevar a 1 litro con agua destilada. Esterilizar 15 minutos a 121°C.

Agar Coco (AC)

Coco rallado	200 g
Agar	15 g

Agua destilada hasta volumen final de 1 L

Mezclar bien y fundir el agar. Esterilizar 15 minutos a 121°C.

Agar Malta (AM)

Malta 20 g

Agar 20 g

Agua destilada hasta volumen final de 1 L

Disolver bien la malta y fundir el agar antes de la esterilización. Esterilizar 15 minutos a 121°C.

Mediante el agregado de glicerol se logra modificar la actividad hídrica del medio.

a_w 0,995 – sin agregado de glicerol

a_w 0,980 – 102,02 g de glicerol/L de medio de cultivo

Agar Extracto de levadura Sacarosa (Agar-YES)

Extracto de levadura 20 g

Sacarosa 150 g

Agar 15 g

Agua destilada hasta volumen final de 1 L

Mezclar bien y fundir el agar. Esterilizar 15 minutos a 121°C.