



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

UDELAR [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

# **Evolución temporal de las poblaciones fúngicas y micotoxinas en ensilajes de granos de trigo húmedo.**

*Agustina del Palacio Flangini*

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Opción Biotecnología

Tutor: Dra. Dinorah Pan

Facultad de Ciencias

Universidad de la Republica

Montevideo, Uruguay

2012

## INDICE

1. Introducción .....	2
1.1. Trigo, generalidades .....	2
1.2. Micotoxinas .....	2
1.2.1. Toxinas de Aspergillus .....	3
1.2.2. Toxinas de Fusarium .....	5
1.2.3. Toxinas de Penicillium .....	7
1.2.4. Reglamentación .....	8
1.3. Hongos y micotoxinas del almacenamiento .....	8
1.4. Ensilados .....	9
2. Objetivos .....	11
3. Materiales y Métodos .....	12
3.1. Identificación fúngica .....	12
3.2. Humedad .....	13
3.3. Determinación de micotoxinas y caracterización de cepas .....	13
3.4. Análisis de datos .....	14
4. Resultados .....	15
5. Discusión .....	23
6. Bibliografía .....	29

## 1 – INTRODUCCION

### *1.1 - Trigo, generalidades.*

En el Uruguay el trigo es uno de los principales cereales cultivados y de significancia económica. La mayor parte de la producción está destinada a la fabricación de harinas para panificadoras y pastelería. El trigo se usa también para fabricar cereales de desayuno y, en menor medida, en la elaboración de cerveza, whisky y alcohol industrial. Los trigos de menor calidad y los subproductos de la molienda y de la elaboración de cervezas y destilados se utilizan como raciones para el ganado.

Los granos de cereales desde su formación en la planta hasta su utilización o consumo final están expuestos a la colonización por una gran variedad de microorganismos, de los cuales los hongos filamentosos son los más importantes. La colonización fúngica de los granos provoca su deterioro, este puede implicar retención o pérdida de viabilidad del grano, pérdida de peso seco, aumento de ácidos grasos, calentamiento del grano y germinación (Jayas et al. 1995). Los hongos pueden colonizar los granos en estadios tempranos de su desarrollo o bien en posteriores etapas de almacenamiento o procesamiento. Algunas de las especies fúngicas que contaminan los granos son potenciales productoras de micotoxinas (Pan et al., 2009).

### *1.2 - Micotoxinas.*

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos, principalmente, al final de la fase exponencial o al inicio de la fase estacionaria de crecimiento de los hongos (Bullerman & Draughon, 1994) y son sintetizadas por grupos

taxonómicos restringidos como ser *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Las micotoxinas son compuestos biológicos activos capaces de causar diversos desordenes clínicos en humanos y animales cuando son ingeridas, además de generar grandes pérdidas a nivel económico. La presencia de micotoxinas en los granos está directamente relacionada al crecimiento fúngico, si no hay desarrollo de hongos no habrá formación de toxinas. Sin embargo, la existencia de hongos no implica su producción ya que las condiciones pueden no ser adecuadas para su síntesis o las cepas pueden no ser toxicogénicas. En general, la síntesis de micotoxinas se asocia a condiciones de estrés, tales como cambios en la temperatura, humedad o aeración y presencia de agentes agresores (Santin, 2008). La producción de micotoxinas se ve favorecida por condiciones de humedad elevada (Bullerman, 1982), siendo los cultivos de climas húmedos y calurosos de regiones tropicales y subtropicales los mas propensos a la contaminación con micotoxinas en relación con los de zonas templadas (Mills, 1989). La presencia de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> también influyen en el crecimiento y producción de micotoxinas. Por ejemplo, un nivel de 20% de CO<sub>2</sub> disminuye el crecimiento y la producción de aflatoxinas, pero solo a niveles de O<sub>2</sub> menores del 1% el crecimiento y la producción de aflatoxinas se inhibe completamente (Northolt & Bullerman, 1982).

### 1.2.1 - Toxinas de *Aspergillus*.

Dentro del género *Aspergillus*, *Aspergillus flavus* es una de las principales especies productoras de aflatoxinas, las cuales pertenecen a una familia de compuestos derivados de la bisfuranocumarina (Figura 1). El grupo de

aflatoxinas comprende las toxinas B1, B2, G1 y G2, siendo la B1 la de mayor toxicidad. A partir de la ingesta de alimento contaminado con aflatoxina B1 o B2, se produce el derivado metabólico M1 y M2 respectivamente, los cuales son formados y excretados en leche de animales y humanos (Sweeny & Dobson, 1998).

Las aflatoxinas son las micotoxinas más importantes debido a su propiedad hepatocarcinogénica y alta toxicidad en comparación a otros compuestos químicos. Afectan a animales y humanos cuando son ingeridas en gran cantidad o de manera sostenida durante un largo periodo de tiempo. La aflatoxina más comúnmente encontrada en los alimentos es la B1. Las aflatoxinas B1 y M1 son las más tóxicas y los daños resultantes del consumo de granos contaminados van desde daño agudo al hígado, incluyendo necrosis y hemorragia, hasta cáncer hepático. En animales también ocasionan disminución en la tasa de crecimiento y baja productividad (leche, huevos, etc). Son también inmunosupresoras, teratogénica y mutagénicas. Cabe destacar que las aflatoxinas B1 y M1 están clasificadas como carcinógenos grado 1 por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC). Pueden estar presentes en leche y derivados, carne de cerdo o huevos si el animal consume suficiente cantidad de alimento contaminado. Este tipo de micotoxina es producido se desarrollan principalmente durante la etapa de almacenamiento del grano (Creppy, 2002) a temperaturas entre 12 y 40°C y altos niveles de humedad (Satin, 2008). El perfil de aflatoxinas y su concentración dependen del sustrato, la cepa y las condiciones ambientales como humedad y temperatura. *A. flavus* es capaz de producir únicamente aflatoxinas B1 y B2 y

contiene un gran porcentaje de cepas no toxicogénicas (Sweeny & Dobson, 1998).

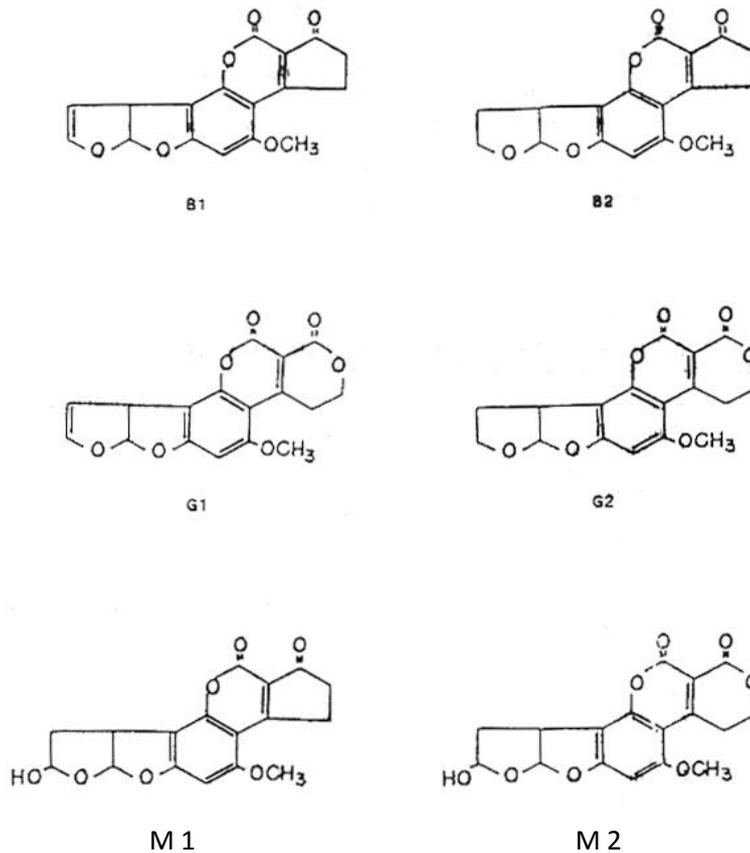


Figura 1. Estructura de las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y los derivados metabólicos M1 y M2

### 1.2.2 - Toxinas de *Fusarium*.

Los hongos del género *Fusarium* son los principales contaminantes de cereales y oleaginosas en nuestro país debido a sus características climáticas ya que estos hongos requieren de temperaturas más bajas que *Aspergillus* para su crecimiento y producción de micotoxinas (Satin, 2008). La producción de micotoxinas por *Fusarium*, puede ocurrir antes, durante y también después de

la cosecha, si el material no es tratado y secado adecuadamente. Estos hongos son los más prevalentes durante el desarrollo de los cultivos en el campo y pueden producir una gran variedad de micotoxinas, siendo las principales los tricotecenos, la zearalenona y las fumonisinas (Diekman & Green, 1992; Satin, 2008). Los tricotecenos son un grupo con más de 150 metabolitos relacionados estructuralmente, siendo las principales especies productoras *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* y *F. sporotrichioides*. En función de sus diferencias en la estructura química estos pueden ser divididos en cuatro subgrupos (Figura 2); grupo A, en la posición C-8 presentan un grupo funcional diferente al carbonilo, dentro de este grupo se encuentran las toxinas T-2, HT2, diacetoxiscirpenol entre otras; grupo B, en la posición C-8 presentan un grupo carbonilo, por ejemplo nivelenol (NIV), deoxinivalenol (DON) y Fusarenol- X (FUS-X); grupo C, tienen un segundo grupo epoxi en la posición C-7, C-8 o C-9, C-10 (baccharin); grupo D, contienen un anillo macrocíclico entre el C-4 y el C-5 con doble enlace éster, por ejemplo roridina A, D y E. A nivel mundial, en los granos prevalecen los tricotecenos del tipo A y B siendo más frecuentes los primeros. Causan gran variedad de efectos tóxicos, disturbios gastrointestinales, vómitos, diarrea, rechazo al alimento, aborto y anemia, entre otros (Diekman & Green, 1992; Coulombe, 1993; Osweiler, 2000). Este grupo de micotoxinas está caracterizado por inhibir la síntesis proteica, afectando la función mitocondrial y generando consecuencias a nivel de membrana y división celular (Yazar & Omurtag, 2008). En la micotoxicosis aguda causada por estas micotoxinas se producen daños en los tejidos hematopoyéticos, en el sistema nervioso, gastrointestinal y cardiovascular (Vildes, 1998).

Las cepas de *F. graminearum* pueden producir tres tipos de tricotecenos; NIV y sus acetilados (quimiotipo NIV), DON y 3-acetildeoxinivalenol (quimiotipo 3-AcDON) o DON y 15-acetildeoxinivalenol (quimiotipo 15-AcDON). En Norte América, Europa Central y el sur de Rusia el quimiotipo predominante es el 15-AcDON mientras que el quimiotipo 3-AcDON es el predominante en el norte de Europa, algunas partes de Asia, incluida China, Austria y Nueva Zelanda (Reynoso et al., 2011).

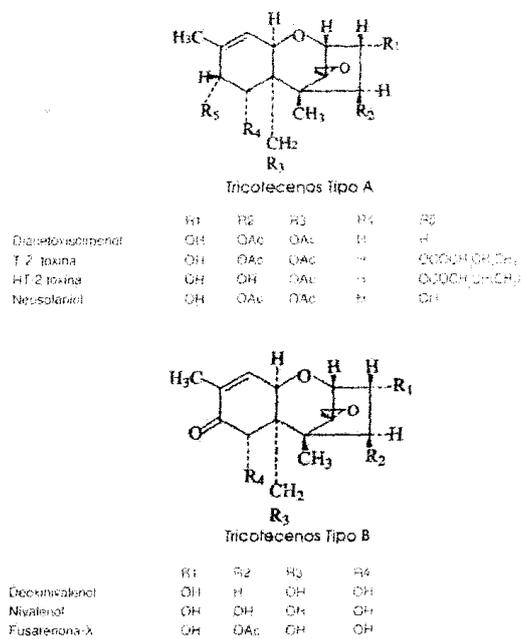


Figura 2. Estructura de los tricotecenos del tipo A y B.

### 1.2.3 - Toxinas de *Penicillium*.

Las especies de *Penicillium* son capaces de producir una gran variedad de micotoxinas pero en general no son las principales sintetizadas sobre granos.

#### 1.2.4 - Reglamentaciones.

En el MERCOSUR y en el Código Bromatológico Uruguayo existen reglamentaciones que determinan los niveles máximos aceptables de micotoxinas en granos destinados a consumo humano. Para DON el límite permitido es de 2000µg/kg en trigo y subproductos de trigo, mientras que para las aflatoxinas se establece como límite 20µg/kg en maíz, harina de maíz y maní (Pan, 2000).

#### 1.3 - Hongos y micotoxinas del almacenamiento.

La FAO ha estimado que el 25% de los granos de cereales en el mundo están, anualmente, contaminados con micotoxinas (Ramos et al., 1997), y su frecuencia está determinada tanto por factores propios de la planta como los climáticos del año de la cosecha. Por ello, la incidencia de especies micotoxigénicas puede variar anualmente de acuerdo a la magnitud de las precipitaciones y la temperatura prevalente a lo largo del desarrollo de las plantas. A su vez, las condiciones de almacenamiento pueden favorecer el desarrollo de algunas especies fúngicas provenientes del campo o instaladas en los sitios de almacenamiento que alteran la calidad nutricional de los granos y el grado de contaminación con micotoxinas. Se considera a los hongos del almacenamiento como la principal causa del deterioro de los granos. Se estima que entre un 5 y un 10% de la producción mundial de cereales y oleaginosas se pierden durante esta etapa (Jayas et al. 1995, Satin, 2008). Las condiciones óptimas para el desarrollo de los hongos y para la producción de micotoxinas están determinadas principalmente por los niveles de humedad y temperatura durante el almacenamiento, que varían según la especie.

#### *1.4 - Ensilados.*

El ensilado es una de las practicas convencionales de la conservación de alimentos para animales (Fink-Gremmels, 2008), es una técnica de conservación que se basa en procesos químicos que se producen en los tejidos vegetales cuando se encuentran bajo condiciones anaeróbicas adecuadas y con una humedad entre el 23 y 40% para los silos graníferos. Para los silos de planta entera los requerimientos de humedad son entre 60 y 80% sin previo secado y en donde se garantiza la conservación por una reducción del pH, entre 4 y 4,5. La evolución del material dentro del silo depende de la humedad inicial del grano (óptimo entre 28 y 35%), el grado de ruptura del grano, su compactación y de la conservación de la estructura del contenedor, para impedir el ingreso de aire y/o agua. La formación de ácido láctico que se produce, como consecuencia del desarrollo de bacterias acidolácticas, actúa como agente conservador (Olivarez, 2002). En condiciones óptimas de almacenamiento, el medio ácido y la anaerobiosis generan un ambiente desfavorable para el desarrollo de hongos y micotoxinas.

El ensilaje de grano húmedo puede realizarse en silos tipo torta, trinchera, silos verticales o silos tipo bolsa (silobag), siendo ésta última la opción más difundida en Uruguay. La alternativa del silobag tiene como principal ventaja la facilidad operativa, baja inversión relativa y buenas condiciones de conservación (Repetto et al., 2005). En trabajos experimentales se ha observado que desde el punto de vista nutritivo prácticamente no existen diferencias entre el grano ensilado con alta humedad y el seco (Clark & Harshbarger, 1972; Clark et. al.,

1974 a y b, Chandler et. al., 1975, Dhimian & Satter, 1992; Alvarez et. al., 1995 y Romero et. al., 1997). Sin embargo, hay varios factores que hacen que los requerimientos necesarios para una buena conservación del grano no se cumplan a campo. Así, la presencia de bolsones de aire como consecuencia de la mala compactación, perforaciones en el revestimiento que pueden ser causadas por animales silvestres o trozos del forraje, o exposición demasiado prolongada al aire en el frente de extracción de los silos afectan la buena conservación. La presencia de oxígeno puede permitir un rápido crecimiento fúngico en presencia de alta humedad y a la gran riqueza nutritiva del material ensilado (Olivarez, 2002). Esto a su vez lleva aparejado la reducción del valor nutricional del grano y la posible producción y acumulación de micotoxinas.

La reducida información acerca de las poblaciones toxicogénicas y las micotoxinas en ensilados de trigo húmedo llevaron a realizar el estudio de la evolución de las poblaciones fúngicas y las micotoxinas presentes.

## 2 - OBJETIVOS

- Identificar y determinar el porcentaje de infección por las especies fúngicas presentes en granos de trigo
- Evaluar si existe variación en la composición de las comunidades fúngicas antes de ensilar, a los 60, 90 y 120 días de almacenamiento.
- Determinar y cuantificar la presencia de aflatoxinas y deoxynivalenol en las muestras de trigo antes de ensilar y a los 60, 90 y 120 días de almacenamiento.
- Determinar el potencial toxicogénico de las cepas de *A. flavus* y *F. graminearum*.

### 3 - MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 - Identificación fúngica.

Se analizaron muestras de trigo provenientes de cuatro establecimientos que fueron analizadas al momento de la cosecha y a los 60, 90 y 120 días de ensilado. Estas muestras fueron tomadas mediante un calador cilíndrico de 1m de longitud y 0.5 cm de diámetro a lo largo de los silobags, a tres alturas diferentes y en ambas direcciones. La cantidad final de muestra a tomar de cada silo fue de 5 Kg que fue homogenizada y reducida a una sub-muestra representativa de 1 Kg. A partir de dicha sub-muestra se tomaron 100 granos y se esterilizaron superficialmente con NaOCl al 0.4% durante 1 minuto, se enjuagaron 2 veces con agua destilada estéril y se secaron con papel de filtro estéril (Samson et al., 1992). Estos granos se sembraron en cajas de Petri conteniendo medio papa dextrosa agar (PDA: papa blanca 25%, dextrosa 2% y agar 2%). Se incubaron a 25°C durante 5-7 días bajo periodos de 12 hs de luz blanca, 12hs de luz negra. Las colonias emergentes fueron contadas y transferidas a medios de cultivo específicos y se identificaron en base a las características micromorfológicas. Las especies de *Fusarium* se identificaron según Nelson et al., (1983). Las colonias aisladas de *Fusarium* fueron subcultivadas en PDA, para poder describir las características microscópicas y la pigmentación tanto de la colonia, como del medio de cultivo y en agar hojas de clavel (CLA: agar-agua al 2% y 2-3 trozos de hojas de clavel parcialmente sumergidas en el medio de cultivo) para la observación de las características macro y microscópicas. Las especies de *Aspergillus* fueron identificadas

subcultivando las colonias en agar extracto de malta (MEA: extracto de malta 2%, peptona 0,1%, glucosa 2%, agar 2%) e incubándolas a 25°C, en agar Czapek-extracto de levadura (CYA: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1%, concentrado de Czapek 1%, extracto de levadura 0,5%, sacarosa 3%, agar 1,5%) a 25°C y 37°C y en agar Czapek-extracto de levadura con 20% de sacarosa (CY20S; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1%, concentrado de Czapek 1%, extracto de levadura 0,5%, sacarosa 20 %, agar 1,5%) a 25°C (Klich & Pitt,1988). Las especies de Dematiaceae se identificaron según Ellis (1976), los Coelomycetes de acuerdo a Sutton (1980) y los Zygomycetes de acuerdo con Samson et al.,(1995).

### 3.2 - Humedad.

Se determinaron los niveles de humedad relativa de las muestras a los distintos tiempos de ensilado mediante secado en estufa a 25°C, esta se calculó como la diferencia entre el peso inicial de la muestra y el peso de la muestra luego de tres pesadas constantes.

### 3.4 - Determinación de micotoxinas y caracterización de cepas.

Las micotoxinas fueron determinadas y cuantificadas mediante inmunoensayo enzimático competitivo (ELISA) empleando los kit comerciales Ridascreen® Fast DON y Ridascreen Fast Aflatoxin SC (R-Biofarm AG).

Se evaluó también la capacidad toxicogénica de las cepas de *Aspergillus flavus* aisladas. Las aflatoxinas fluorescen en presencia de luz UV lo que permite realizar una rápida detección de cepas productoras. Para ello se inocularon cajas de Petri conteniendo coco agar (CA: coco en polvo 20%, agar 1,5%) y se

evaluó la producción de fluorescencia bajo luz UV (365nm) a los 5, 7 y 14 días de incubación en la oscuridad.

La determinación del potencial toxicogénico de las cepas de *F. graminearum* aisladas se realizó mediante PCR múltiple basada en la metodología de Quarta et al. (2006). Cada quimiotipo es detectado en base al tamaño molecular de las bandas amplificadas; un fragmento de 525 pb indica la capacidad de síntesis de DON, una banda de 354 pb indica el quimiotipo 3-AcDON, una banda de 625 pb indica el quimiotipo NIV y un fragmento de 708 pb corresponde al quimiotipo 15- AcDON.

### 3.5 - Análisis de datos

Se calculó el porcentaje de infección como el número de granos contaminados por una especie sobre el total de los granos. Este valor indica la incidencia de una especie en el total de la partida de granos de trigo analizados.

Las correlaciones obtenidas entre las diferentes variables estudiadas fueron analizadas mediante el coeficiente de correlación de Pearson utilizando el programa Sigma STAT versión 2.01 (Chicago).

## 4 - RESULTADOS

Del total de los granos analizados, el 100% estaba colonizado por especies fúngicas y se obtuvieron un total de 2368 aislamientos.

Tabla 1. Distribución de especies de hongos aislados de muestras al momento de la cosecha y durante las distintas etapas de almacenamiento

	ESPECIES	CAMPO	ENSILADO		
			60 DIAS	90 DIAS	120 DIAS
Muestra 1	<i>Alternaria alternata</i>	53%		2%	
	<i>Aspergillus flavus</i>		100%	100%	100%
	<i>Epicocum purpurascens</i>	36%			
	<i>Fusarium graminearum</i>	95%			
	<i>Sporotrix schenckii</i>		100%	99%	100%
Muestra 2	<i>Alternaria alternata</i>	59%	41%	19%	8%
	<i>Aspergillus flavus</i>			2%	100%
	<i>Aspergillus niger</i>			2%	
	<i>Epicocum purpurascens</i>	25%	23%	17%	16%
	<i>Fusarium acuminatum</i>			1%	
	<i>Fusarium equiseti</i>			1%	
	<i>Fusarium graminearum</i>	89%	59%	14%	5%
	<i>Fusarium lateritium</i>	1%			
	<i>Fusarium poae</i>		1%		
	<i>Fusarium sambucinum</i>		1%		
	<i>Fusarium sporotrichoides</i>	1%			
	<i>Fusarium sp.</i>		2%		
	<i>Penicillium sp.</i>			100%	2%
<i>Sporotrix schenckii</i>					
Muestra 3	<i>Alternaria alternata</i>	77%	57%	56%	51%
	<i>Aspergillus flavus</i>				29%
	<i>Epicocum purpurascens</i>	23%	6%	2%	7%
	<i>Fusarium acuminatum</i>			1%	1%
	<i>Fusarium graminearum</i>	82%	61%	56%	50%
	<i>Fusarium lateritium</i>			1%	
	<i>Fusarium nygamai</i>			1%	
	<i>Fusarium poae</i>		3%		
<i>Fusarium sambucinum</i>			4%	1%	
Muestra 4	<i>Alternaria alternata</i>	46%	43%	8%	15%
	<i>Aspergillus flavus</i>		10%	87%	40%
	<i>Aspergillus niger</i>				6%
	<i>Aspergillus clavatus</i>				1%
	<i>Epicocum purpurascens</i>	17%	13%	4%	
	<i>Fusarium acuminatum</i>	1%			
	<i>Fusarium graminearum</i>	88%	36%	9%	9%
	<i>Fusarium lateritium</i>	1%			
	<i>Fusarium oxysporum</i>				1%
	<i>Fusarium sambucinum</i>	1%			
	<i>Fusarium sporotrichoides</i>				11%
	<i>Fusarium subglutinans</i>		1%		
	<i>Fusarium sp.</i>		1%		
	<i>Penicillium sp.</i>				1%
<i>Sporotrix schenckii</i>			83%		

Se analizaron un total de 16 muestras provenientes de cuatro establecimientos al momento de la cosecha y a los 60, 90 y 120 días de ensilado (4 muestras x 4 tiempos de almacenamiento)(Tabla 1; Figura 3).

*Fusarium* fue el género predominante a campo con un porcentaje de infección de 89,7 %, siendo la especie mas frecuente *F. graminearum* (88,5%). A los 60 días de almacenamiento también predominaron las especies del género *Fusarium* (41,5%), nuevamente, la especie predominante fue *F. graminearum* (39,0%). Luego de 90 días de almacenamiento se observó que hubo una disminución en los niveles de infección de *F. graminearum* (19,7%) y finalmente, a los 120 días de ensilado se registró un 16% de infección (Figuras 3 y 4).

A campo, *Alternaria alternata* (58,7 %) fue después de *F. graminearum* la especie mayormente aislada. Durante el ensilado se observó una disminución en el porcentaje de infección de esta especie llegando al final del mismo a un porcentaje de infección del 18,5%.

La tercer especie predominante en campo fue *Epicocum purpurascens* (25,2 %). A los 60 días de ensilado su porcentaje de infección fue de 10,5 % reduciéndose a niveles de 5,7% a los 90 y 120 días.

*Aspergillus flavus* no fue aislada a campo pero sí estuvo presente durante las distintas etapas de almacenamiento, siendo su porcentaje de infección de 27,5% a los 60 días y de 47,2% a los 90 días de ensilado. Una vez transcurridos los 120 días de almacenamiento, el porcentaje de infección en las muestras alcanzó el 58,2% (Figuras 3 y 4).

Otra especie únicamente encontrada en el almacenamiento fue *Sporotrix schenckii*, variando sus niveles de infección durante el transcurso del tiempo. (Figura 3).

En una única muestra se observaron altos niveles de contaminación con hongos del género *Penicillium* (25,0%) por primera vez a los 90 días de almacenamiento. Si bien este género estuvo presente a los 120 días su porcentaje de infección fue muy bajo (0,7%).

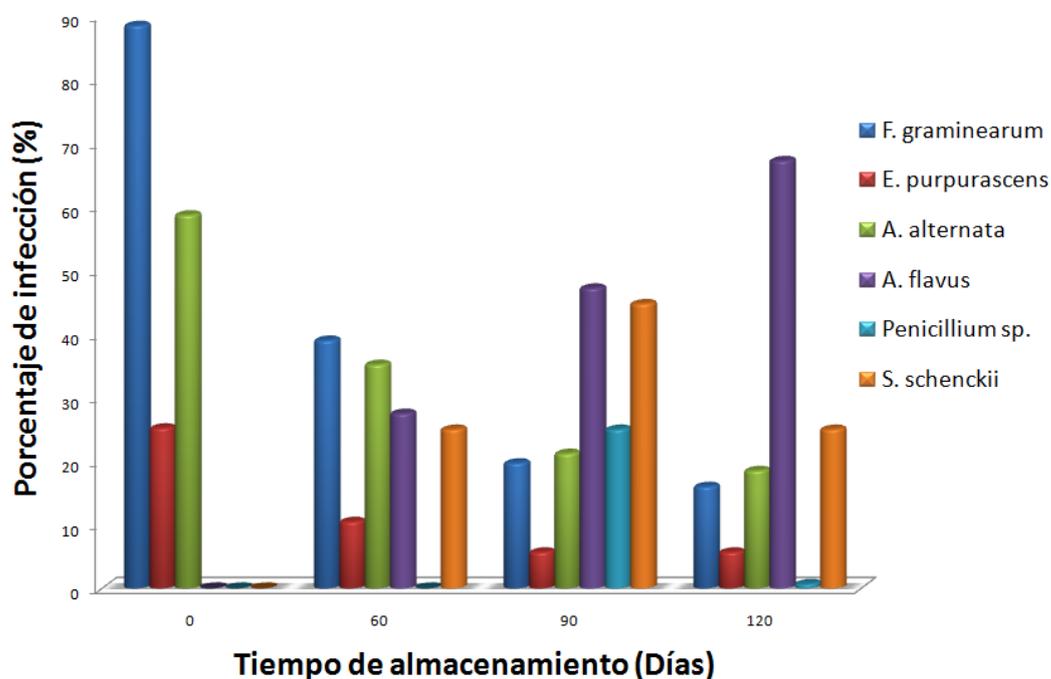


Figura 3. Porcentaje de infección de las especies contaminantes más frecuentes de las muestras de trigo

Respecto a la variabilidad de especies durante las distintas etapas del almacenamiento, se observa que a partir de los 60 días de ensilado hay una disminución en el número de aislamientos de hongos pertenecientes a la especie *F. graminearum* y comienzan a aumentar los pertenecientes a *A. flavus*, exhibiendo una significativa correlación negativa ( $r = -0.974$ ,  $p < 0.05$ ).

Se pudo determinar que *F. graminearum* presenta una correlación negativa ( $r = -0.972$ ,  $p < 0.05$ ) con el tiempo de almacenamiento mientras que *A. flavus* presenta una correlación positiva ( $r = 0.997$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 4).

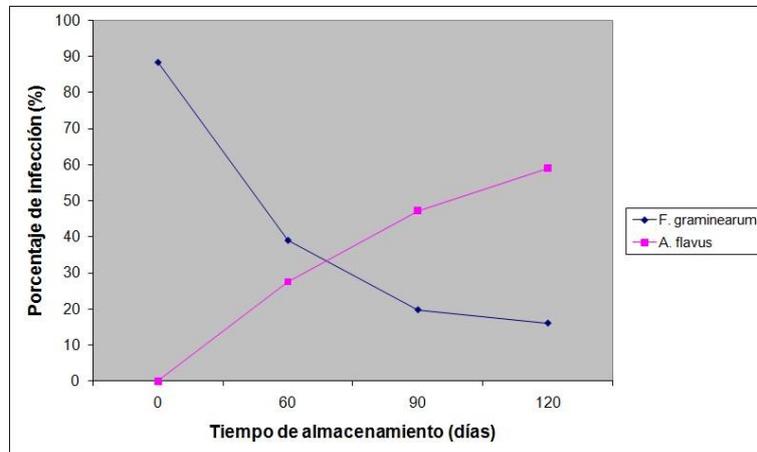


Figura 4. Evolución de *F. graminearum* y *A. flavus* durante el almacenamiento

Los niveles de humedad relativa de los silos variaron desde un 9.6% en las primeras etapas de almacenamiento hasta un 20% en el último mes de ensilado (Tabla 2). En la figura 5 se observa que a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento el porcentaje de humedad de las muestras aumenta.

Tabla 2. Porcentajes de humedad de las muestras durante el tiempo de ensilado

		% HUMEDAD
M. 1	60 días	14.4
	90 días	14.6
	120 días	19.2
M. 2	60 días	9.6
	90 días	10
	120 días	11.6
M. 3	60 días	12.8
	90 días	12
	120 días	12.4
M. 4	60 días	10
	90 días	13.2
	120 días	15.2

(M.: muestra). La humedad de las muestras de campo no fue determinada

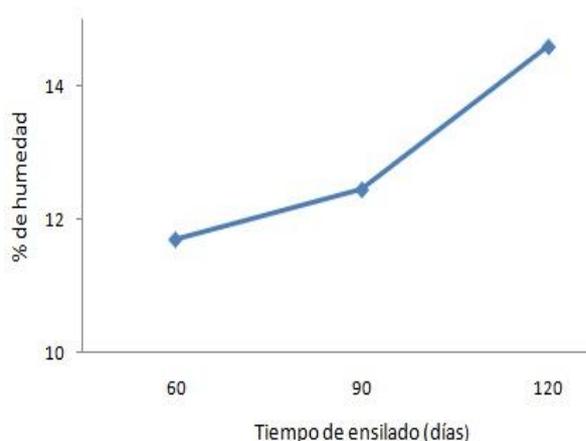


Figura 5. Variación de los niveles de humedad durante el almacenamiento

Se detectó la presencia de micotoxinas durante todo el periodo del ensilado. Los niveles de DON variaron de 9750  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  a 5525  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  mientras que la presencia de aflatoxinas fue detectada a partir del segundo mes del ensilado, alcanzando un nivel de 11,7  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  al final del mismo (Tabla 3).

Tabla 3. Niveles de DON y Aflatoxinas en el momento de la cosecha y durante el ensilado

	Campo	60 días		90 días		120 días	
	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	AFLA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	AFLA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	DON ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	AFLA ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
Muestra 1	9600	5100	11.9	5600	16.6	4900	23.13
Muestra 2	12400	6300	nd	6800	18.1	7900	23.28
Muestra 3	7400	3000	nd	3400	nd	3800	6.1
Muestra 4	9600	6800	nd	6300	12.2	7430	14.6

nd: no detectado

Se observó que los niveles de aflatoxinas aumenta una vez que se incrementa el porcentaje de infección de *A. flavus* encontrándose correlación positiva entre este par de variables ( $r = 0,000579$ ,  $p < 0,05$ ). Como era de esperar *F. graminearum* no presenta ningún tipo de correlación con DON ( $r = 0,0920$ ,  $p > 0,05$ ) ya que una vez producida la micotoxina esta permanece sin estar asociada a la especie productora.

Se logro determinar la capacidad toxicogénica de las cepas aisladas de *A. flavus* utilizando como medio coco-agar. Bajo esta modalidad se analizaron un total de 34 cepas correspondientes a los distintos periodos de almacenamiento de cada muestra contaminada con *A. flavus* (Tabla 4).

Tabla 4. Numero de cepas de cada muestra inoculadas en CA y reveladas bajo luz UV a los 5, 7 y 14 días.

Muestra	Cepas	DIAS		
		5	7	14
M. 1	60 días	4 cepas (-); 1 cepa (+)	4 cepas (-); 1 cepa (+)	3 cepas (-); 2 cepas (+)
	90 días	5 cepas (-)	4 cepas (-); 1 cepa (+)	1 cepa (-); 4 cepas (+)
	120 días	4 cepas (-); 1 cepa (+)	4 cepas (-); 1 cepa (+)	1 cepa (-); 4 cepas (+)
M. 2	120 días	3 cepas (-); 1 cepa (+)	2 cepas (-); 2 cepas (+)	1 cepa (-); 3 cepas (+)
M. 3	120 días	4 cepas (-); 1 cepa (+)	3 cepas (-); 2 cepas (+)	2 cepas (-); 3 cepas (+)
M. 4	90 días	5 cepas (-)	5 cepas (-)	2 cepas (-); 3 cepas (+)
	120 días	5 cepas (-)	2 cepas (-); 3 cepas (+)	1 cepa (-); 4 cepas (+)

Cepas (+): Arrojaron fluorescencia cuando se expusieron a luz UV; Cepas (-): cepas que no fluorescieron bajo luz UV (M.: muestra)

En base a los resultados obtenidos se puede determinar que no todos las cepas de *A. flavus* aisladas son capaces de producir aflatoxinas. El 67,6% de las cepas de *A. flavus* presentaron fluorescencia cuando se inocularon en CA, siendo potencialmente productoras de aflatoxinas (Figura 6).

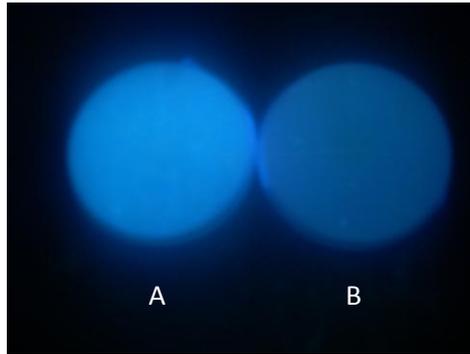


Figura 6. A. Fluorescencia de cepa de *A. flavus* productora de aflatoxinas  
B. cepa *A. flavus* no productora

Se determinó el perfil toxicogénico de 12 cepas de *F. graminearum* aisladas de las muestras al momento de la cosecha, donde los niveles de contaminación por parte de esta especie es mayor. Mediante PCR múltiple se amplificaron cuatro fragmentos del cluster de genes implicados en la biosíntesis de tricotecenos (Figura 7).

Del total de las cepas analizadas 11 presentaron quimiotipo 15-AcDON mientras que una única cepa presentó quimiotipo NIV (Figura 8). No se encontraron cepas del quimiotipo 3-AcDON.

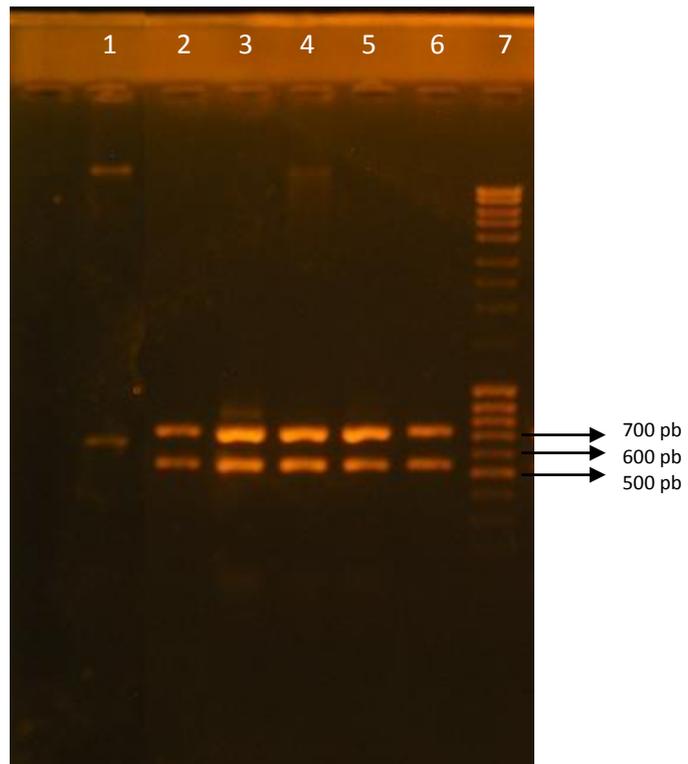


Figura 7. Corrida electroforética de los productos de PCR de *F. graminearum*. Línea 1. *F. graminearum* quimiotipo NIV, líneas 2 a 6 *F. graminearum* quimiotipo 15-AcDON, línea 7 marcador de peso molecular

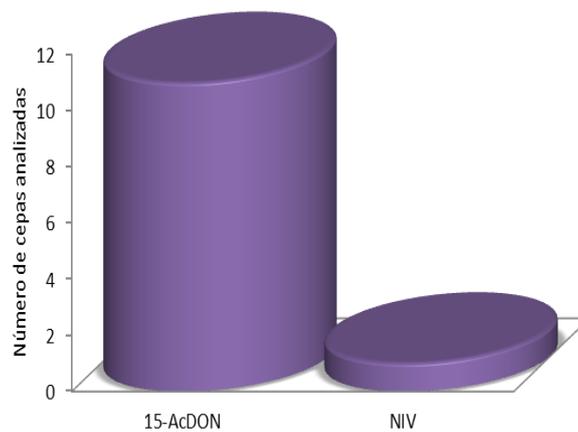


Figura 8. Número de cepas de *F. graminearum* aisladas pertenecientes a los quimiotipos 15-AcDON y NIV.

## 5 - DISCUSION

En trigo, los principales géneros de hongos descritos en el momento de la cosecha son *Fusarium*, *Alternaria*, *Rhizopus*, *Epicocum* y *Cladosporium* (Bensassi et al. 2011; Mionetto et al. 2010).

En la etapa de almacenamiento en general se observan variaciones en la microbiota presente en los granos en comparación con la observada a campo, siendo los géneros predominantes en el almacenamiento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium*, *Geotrichum*, entre otros (Castellari et al. 2010). Trabajos realizados en Argentina y Méjico sobre silos de maíz indican que *Aspergillus* es uno de los géneros predominantes junto con *Penicillium* y *Fusarium*. Dentro de este género la especie predominante es *A. flavus* (Castellari et al. 2010; González et al. 2011; Reyes-Velázquez et al. 2008). En este trabajo se observó que las especies encontradas en campo persistieron durante el almacenamiento disminuyendo sus porcentajes de infección, mientras que durante el almacenamiento se encontraron nuevas especies cuyos porcentajes de infección variaron en los distintos tiempos de almacenamiento. Durante el momento de la cosecha *F. graminearum* fue la especie predominante mientras que en las últimas etapas del almacenamiento *A. flavus* fue la especie mayormente aislada. Esto se ve reflejado en los resultados donde se muestra que en relación al tiempo de almacenamiento *F. graminearum* exhibe una correlación negativa y *A. flavus* presenta correlación positiva, a su vez al comparar el numero de aislamientos durante las distintas etapas se observa una clara correlación negativa entre ambas especies. También se observó la presencia de *A. alternata*, *E. purpurascens* y *Penicillium* sp., en distintas

etapas. En general es común que se dividan las especies fúngicas en dos grandes grupos: hongos de campo y hongos de almacenamiento. Los hongos de campo son los que infectan las semillas mientras el cultivo aun esta en campo, entre ellos se encuentran especies de *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicocum* y *Cladosporium*. Por otro lado están los hongos del almacenamiento, estos invaden las semillas durante dicha etapa, siendo las especies de *Aspergillus* y de *Penicillium* las más frecuentes (Santin, 2008). Esta agrupación se ve reflejada en los resultados obtenidos en este estudio.

Si bien *Sporotrix schenckii* no es un hongo comúnmente aislado en el almacenamiento, las condiciones del mismo pueden haber favorecido su aparición ya que este es un hongo que crece en un rango de temperatura de 25°C a 30°C, aunque algunas cepas pueden crecer a menores temperaturas. *S. schenckii* es un hongo dimorfo por lo que se transforma en levadura patógena cuando la temperatura alcanza los 37°C. Causa esporotricosis humana y animal, enfermedad subcutánea muy común en humanos, además, es capaz de causar infección pulmonar y sistémica con consecuencias fatales (Zhang et al., 2011). Es por esto que la presencia de este hongo en este tipo de almacenamiento podría ocasionar daños a consumidores finales y a quienes manipulan el alimento.

Tanto *F. graminearum* como *A. flavus* son importantes hongos productores de micotoxinas de alto impacto para la salud humana y animal, en este trabajo los porcentajes de infección por parte de estos hongos fueron muy elevados llegando a 89,7% *F. graminearum* en campo y 58,2% *A. flavus* al final de la etapa de almacenamiento. Estos porcentajes tan altos hacen que aumente la

probabilidad de que se encuentren cepas capaces de producir micotoxinas. En el momento de la cosecha se determinó la presencia de DON en todas las muestras analizadas en niveles superiores a los permitidos, desde 7400 µg/kg hasta 12400 µg/kg. *F. graminearum* fue la especie con mayor número de aislamientos en la etapa a campo y la presencia de micotoxinas en muestras de trigo pertenecientes a este estadio indicaría la presencia de cepas productoras de DON.

En estadios tardíos de almacenamiento se observa una disminución en el porcentaje de infección por parte de esta especie registrándose una correlación negativa entre la presencia de la misma respecto al transcurso del tiempo de almacenamiento, sin embargo, los valores de DON detectados continúan estando por encima de los límites establecidos para esta micotoxina. Esto indica que si bien las condiciones de almacenamiento son capaces de restringir el crecimiento de *F. graminearum*, la micotoxina permanece y en niveles por encima de los permitidos.

A medida que avanza el tiempo de almacenamiento los niveles de aflatoxinas aumentan hasta que a los 120 días alcanzan valores de aproximadamente 23 µg/kg siendo estos superiores a los permitidos (20 µg/kg). La presencia de aflatoxinas coincide con la aparición de cepas de *A. flavus* en las muestras y esto se evidencia con la existente correlación positiva entre los niveles de aflatoxinas y los porcentajes de infección con *A. flavus*, infiriéndose la presencia de cepas productoras de estas toxinas.

La presencia tanto de DON como de aflatoxinas fue determinada mediante ELISA competitivo. Se determinó que en las últimas etapas del almacenamiento ambas están presentes (aflatoxinas 23 µg/kg y DON 3800 a

7900 µg/kg) en niveles superiores a los permitidos, DON 2000µg/kg y aflatoxinas 20µg/kg. Por lo tanto se observa que bajo este tipo de almacenamiento se mantienen los niveles de las toxinas producidas a campo y las condiciones de almacenamiento promueve el desarrollo de nuevas especies fúngicas productoras de otras micotoxinas.

Un posible factor determinante para la aparición de nuevas especies toxicogénicas son los altos niveles de humedad de este método de almacenamiento. En general los hongos no crecen cuando los niveles de humedad son menores a 13.5% (Jayas et al. 1995). De acuerdo a lo analizado, si bien se observó un aumento en los niveles de humedad a medida que avanzan las etapas de almacenamiento, no en todas las muestras se observan niveles de humedad superiores a 13.5%. Por lo tanto podría existir otro elemento responsable de desencadenar la alta contaminación fúngica como por ejemplo la presencia de oxígeno combinada con altas temperaturas. Es necesario determinar otros factores como son la temperatura y la disponibilidad de oxígeno para lograr identificar cuales son las limitaciones de este método de almacenamiento que promueve la contaminación fúngica. Las etapas de almacenamiento donde los niveles de humedad son superiores coinciden con la aparición de cepas de *A. flavus*, esto podría indicar que esta especie se ve favorecida por las condiciones que se generan en este tipo de almacenamiento aunque estadísticamente no exista una correlación positiva entre los niveles de humedad y el porcentaje de infección en las muestras con *A. flavus* ( $p > 0,05$ ). Esta especie es capaz de tolerar altos niveles de ácido acético, ácido propiónico, y otros ácidos lo que la hace capaz de colonizar en este tipo de almacenamiento ya que es característico de esta técnica de almacenamiento el

pH ácido generado por bacterias acidolácticas, además el desarrollo de estas especie se ve favorecido por los altos niveles de humedad y temperatura (Jayas et al. 1995).

Respecto a la capacidad toxicogénica de las cepas de *A. flavus* mediante el método de screening y en base a los altos niveles de aflatoxinas determinados en la muestra se puede concluir que existe un alto porcentaje de cepas productoras de micotoxinas (67,6%). Por otro lado es necesario determinar el tipo de aflatoxina que se produce ya que no todas presentan la misma toxicidad como también la capacidad de que sea metabolizada o no en M1.

Las cepas de *F. graminearum* aisladas correspondieron principalmente al quimiotipo 15-AcDON lo cual coincide con los resultados obtenidos en la región. En Argentina, el análisis de 116 cepas colectadas de diferentes regiones reveló que mas del 92% presentaban quimiotipo 15-AcDON aunque, a diferencia de lo aquí reportado, no se observaron cepas con quimiotipo NIV (Reynoso et al., 2011). En Brasil se han encontrado cepas de *F. graminearum* aisladas de trigo con quimiotipo NIV aunque en bajas proporciones 7% y en nuestro país previamente se han encontrado porcentajes de 1.6% (Pan, 2011). Por otro lado, se analizaron 92 cepas de *F. graminearum* aisladas de cebada en Brasil que presentaron mayoritariamente quimiotipo 15-AcDON (66%), seguidas del quimiotipo NIV (29.3%) y en menor proporción se encontraron cepas de quimiotipo 13- AcDON (4,3%) (Astolfi et al., 2011). Es de gran importancia determinar la presencia de cepas con quimiotipo NIV, ya que esta toxina es de mayor significado toxicológico que DON y de cepas con quimiotipo 15-AcDON ya que también esta toxina presenta un grado mayor de toxicidad

que DON. Un estudio más profundo de las cepas productoras de NIV es necesario para poder determinar las condiciones que favorecen su producción y la frecuencia y distribución de estas micotoxinas en alimentos para consumo humano y animal.

Esta técnica de almacenamiento plantea muchas dificultades respecto al control del desarrollo fúngico ya que parecería que promueve el desarrollo de *A. flavus*, especie capaz de generar metabolitos tóxicos para la salud humana y animal y de *S. schenckii*, especie potencialmente patógena de humanos y animales si se dan las condiciones necesarias. Además, si bien hace que disminuyan los porcentajes de infección por parte de *F. graminearum*, las micotoxinas generadas a campo por esta especie se conservan durante todo el almacenamiento. Esto lleva a que el producto final presente altos niveles de contaminación con micotoxinas que afectan la salud del consumidor final. Por otra parte, la co-ocurrencia de distintas micotoxinas es un tema de interés ya que algunos autores plantean que podría generarse efectos sinérgicos, antagonistas o aditivos cuando se encuentran combinadas (Speijers & Speijers, 2004; Diaz, 2008). Cabe mencionar que en trigo almacenado en silobag pudimos identificar la presencia de cepas potencialmente productoras de DON, NIV y aflatoxinas. Por lo tanto es necesario un estudio más profundo del almacenamiento tipo silobag para así poder determinar medidas tomar para disminuir o controlar este tipo de contaminación. El conocimiento de los aspectos ecofisiológicos de las especies contaminantes podría contribuir a la búsqueda de herramientas que permitan controlar su desarrollo y producción de micotoxinas.

## BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, H.; Santini, F. & Rearte, D., 1995. Efectos de la suplementacion con grano de maíz húmedo y seco sobre la producción y composición de leche, el consumo y el ambiente ruminal de vacas lecheras en condiciones de pastoreo. Memorias XIV Reunión AAPA, Vol. 2: 480-483
- Astolfi, P.; dos Santos, J.; Schneider, L.; Gomes, L.; Silva, C.; Tessmann, D. & Del Ponte, E., 2011. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* species complex from barley in Southern Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 148: 197–201
- Bensassi, F.; Mahdi, C.; Bacha, H. & Hajlaoui, M., 2011. Survey of the mycobiota of freshly harvested wheat grains in the main production areas of Tunisia. *African Journal of Food Science*, Vol. 5, N°5: 292 - 29
- Bullerman, L.; Schroeder, L. & Park K., 1984. Formation and control of mycotoxins in food. *Journal of Food Protection*, 47: 637-646
- Bullerman, L. B. & Draughon, F. A., 1994. *Fusarium moliniforme* and fumonisins symposium introduction. *J Food Protection*, 57: 513
- Castellari, C.; Marcos Valle, F.; Mutti, J.; Cardoso, L. & Bartosik, R., 2010. Toxigenic fungi in corn (maize) stored in hermetic plastic bags. 10<sup>th</sup> International Working Conference on Stored Product Protection
- Chandler, P.; Miller, C. & Jhan, E., 1975. Feeding value and nutrient preservation of high moisture corn ensiled in conventional silos for lactating dairy cows. *Journal Dairy Sci.*, Vol 58, N°6: 682-688
- Clark, J.; Croom, W. & Harshbarger, K., 1974 b. Feeding value of dry, ensiled and acid treated high moisture corn whole or rolled to lactating cows. *Journal of Dairy Sci.*, Vol 58, N°6: 907-921

- Clark, J.; Frobish, K.; Harshbarger, K. & Derring, R., 1974 a. Feeding value of dry, ensiled high moisture and propionic acid treated high moisture corn fed with hay or haylage for lactating dairy cows. *Journal Dairy Sci.*, Vol 56, N°12: 1531-1539
- Clark, J. & Harshbarger, K., 1972. High moisture corn versus dry corn in combination with either corn silage or hay for lactating cows. *Journal of Dairy Sci.*, Vol 58, N°10: 1474-1480
- Coulombe, R., 1993. Biological Action of Mycotoxins. *J. Dairy Sci.*, 76: 880 – 891
- Creepy, E., 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology letters*, 127: 19-28
- Dhiman, T. & Satter, L., 1992. Increasing carbohydrate availability to the rumen microbes and its effect on animal performance. *Research Summary. U.S. Dairy Forage Research Center*
- Diekman & Green, 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J. Anim. Sci.*, 70: 1615 – 1627
- Ellis, M., 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. C.A.B. International Mycological Institute Kew, Surrey, England
- Fink- Gremels, J., 2008. *El libro azul de las micotoxinas*. Nottingham University Press., Ed. Diaz, D., capítulo 11
- Gonzalez, M.; Chiacchiera, S.; Rosa, C.; Sager, R.; Dalcero, A. & Cavaglieri, L., 2011. Comparative analysis of the mycobiota and micotoxins contaminating corn trench silos and silo bags. *J. sci. food Agric.*, 91:1474-1481
- Jayas, D.; White, N. & Muir. W., 1995. *Stroed-grain ecosystems*. Edition (Jayas, D.; White, N.; Muir. W.) Marcel Dekker, INC. Capítulos 8 y 10

- Klich, M. & Pitt, J., 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food processing, Australia
- Mills, J., 1989. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. *Journal of Food Protection*, 52: 737-742
- Mionetto, A.; Fernandez, M.; Pan, D. & Bettucci, L., 2010. Incidencia de *Fusarium* y micotoxinas en trigo de Uruguay. XX Congreso Latinoamericano de Microbiología
- Nelson, P.; Tousson, T. & Marasas, W., 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania State Univ. Press., univ. Park, Pennsylvania
- Northolt, M. & Bullerman, L., 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *Journal of Food Protection*, 45: 519-526
- Olivares, M., 2002. Evaluación de la micoflora de microsilos experimentales de sorgo. Sexto encuentro de jóvenes investigadores
- Osweiler, G.D., 2000. Mycotoxins—contemporary issues of food animal health and productivity. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 16: 511–530
- Pacin, A. M.; Ciancio Bovier, E.; Gonzales, H. H. L.; Whitechurch, E. M.; Martínez, E. J. & Resnik, S. L., 2009. Fungal and Fumonisin Contamination in Argentine Maize (*Zea mays* L.) Silo Bags. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 2778-2781
- Pan, D.; Graneri, J. & Bettucci, L., 2009. Correlation of rainfall levels of deoxinivalenol in wheat from Uruguay, 1997-2003. *Food Additives and Contaminants: Part B Vol. 2, No. 2*, 162-165
- Pan, D., 2011. Caracterización de la población de *Fusarium graminearum* y de las condiciones de producción de micotoxinas en granos de trigo:

diseño de una estrategia para su prevención y control. Tesis de doctorado. Opción microbiología. PEDECIBA

- Quarta, A.; Mita, G.; Haidukowski, M.; Logrieco, A.; Mulè, G. & Visconti, A., 2006. Multiplex PCR assay for the identification of nivalenol, 3- and 15-acetyl-deoxynivalenol chemotypes in *Fusarium*. FEMS Microbiology Letters, 259: 7-13
- Ramos, A. J. & Hernandez, E., 1997. Prevention of aflatoxicosis in farm animals by means of hydrated sodium calcium aluminosilicate addition to feedstuffs: A review. Anim. Feed Sci. Technol., 65: 197-206
- Repetto, J.; Cajarville, C.; D' Alessandro, J.; Curbelo, A.; Soto, C. & Garin, D., 2005. Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixtures. Anim. Res., 54, 73-78
- Reyes-Velázquez, W. P.; Espinoza, V. H. I.; Rojo F.; Jimenez- Plasencia, C.; de Lucas Palacios, E.; Hernández- Góborra, J. & Ramírez-Alvarez, A., 2008. Ocurrance of fungi and mycotoxins in corn silage, Jalisco State, Mexico. Rev. Iberoam. Micol., 25: 182-185
- Reynoso, M.; Ramirez, M.; Torres, A.; Chulze, S., 2011. Tricothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. International Journal of Food Microbiology, 145: 444–448
- Romero, L.; Comerón, E.; Bruno, O.; Castillo, A. & Gaggiotti, M., 2002. Silaje de grano húmedo de sorgo: efecto del contenido de tanino y el tratamiento con urea en la respuesta de vacas lecheras. EEA INTA
- Romero, L.; Diaz, M.; Comeron, E.; Bruno, O. & Gaggiotti, M., 1997. Utilización del silaje de grano húmedo de maíz o sorgo en la alimentación de vacas lecheras. 21° Revista Argentina de Producción Animal, Vol 17, 1: 9-10

- 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. El libro azul de las micotoxinas. Nottingham University Press., Ed. Diaz, D., capítulo 9
- Speijers, G. & Speijers, M., 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. Toxicology Letters, 153: 91–98
- Sweenwy, M. & Dobson, A., 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. International Journal of Food Microbiology, 43: 141-158
- Vildes, M., 1998. Micotoxinas em alimentos. Ed. Insular
- Wyatt, R., 2008. El libro azul de las micotoxinas. Nottingham University Press., Ed. Diaz, D., capítulo 12
- Yazar, S. & Omurtag, G., 2008. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. International Journal of Molecular Sciences, 9: 2062-2090
- Zhang, Y.; Li, G.; He, D.; Yu B.; Yokoyama K.; Wang L.; 2011. Efficient insertional mutagenesis system for the dimorphic pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* using *Agrobacterium tumefaciens*. Journal of Microbiological Methods, 84: 418-422

