

## AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y DETERMINACION DE LA CAPACIDAD TOXICOGENICA DE HONGOS CONTAMINANTES DE CEREALES Y PRODUCTOS ALIMENTICIOS.

Lurá, M.C.E.; González, A.M.; Beccaria, A.J.;

Latorre, M.G.; Nepote, A.F. y Rico, M.

Cátedra de Microbiología General,

Fac. de Bioquímica y Ciencias Biológica;

Univ. Nacional del Litoral. Argentina

**Palabras claves:** Hongos toxicogénicos, cereales, productos alimenticios.

**Key words:** Toxicogenic fungi, cereals, alimentary products.

### RESUMEN

Se determinó en la ciudad de Santa Fe y su zona de influencia, la capacidad toxicogénica, mediante la aplicación de ensayos biológicos rápidos, a hongos contaminantes de cereales y productos alimenticios elaborados con ellos.

Los alimentos estudiados fueron: soja, maíz, trigo y sus derivados; los géneros frecuentes aislados fueron, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, identificándose las especies de aquellos que resultaron toxicogénicos.

Las acciones citotóxicas detectadas mediante los ensayos aplicados fueron: capacidad mutagénica, hemólisis de glóbulos rojos humanos y elongación e inhibición de células de *Bacillus thuringiensis*.

### SUMMARY

*[Isolation, identification and determination of the toxicogenic capacity of fungi that contaminate cereals and alimentary products]*

The toxigenic capacity applying fast biologic tests to the fungi that pollutes cereals and food products which are elaborated in Santa Fe city and its environments, was determined.

Soy, wheat, corn and its derivated were studied. *Aspergillus*, *Pencillium* and *Fusarium* were the more frequent genera. Species which demonstrated to be toxigenic, were identified.

Citotoxic actions such as mutagenic capacity, hemolysis of human blood cells and elongation of the *Bacillus thuringiensis* were detected.

### INTRODUCCION

La calidad microbiológica de los alimentos se controla desde hace varios años. Sin embargo, el estudio de los hongos y de las sustancias tóxicas (micotoxinas) que ellos producen en los alimentos y sus ingredientes, ha cobrado importancia recientemente.

En muchas regiones, el clima permite la producción agrícola durante todo el año, pero también hace propicio el desarrollo de mohos causantes de deterioro en una gran cantidad de alimentos (1) complicando gravemente en los países en desarrollo el problema del hambre.

En los últimos años se ha investigado los orígenes, la naturaleza, la distribución, los riesgos en salud pública y animal, así como el modo de control de las micotoxinas presentes en alimentos y piensos (7, 18).

Los primeros antecedente documentados en nuestro país acerca de estos metabolitos fúngicos, se refieren a un problema surgido en 1967, a raíz de la exportación a Inglaterra de maní contaminado, cargamento que fue rechazado con la consiguiente pérdida económica y el descrédito ocasionados.

En los años siguientes en Argentina se formaron, varios grupos de investigación para trabajar en distintos aspectos relacionados con las micotoxinas, estudiándose en nuestra ciudad, su presencia en diversos alimentos desde 1972 (13, 14).

El objetivo de este trabajo fue determinar la identidad y toxigenicidad de los hongos contaminantes aislados de cereales y productos alimenticios que se elaboran con ellos, en Santa Fe y sus zonas de influencia.



## MATERIALES Y METODOS

Se estudiaron muestras de maíz y derivados (polenta),soya, trigo y derivados (fideos, pan y otras masas ). El desarrollo de la micota fúngica se obtuvo incubando todas las muestras, durante 72 hrs., en cámara húmeda a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (11,12). De las colonias obtenidas, se seleccionaron aquellas que resultaron más abundantes, macroscópicamente diferentes y de mayor interés para nuestro estudio(*Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*). Se reaislaron en agar extracto de malta, incubándose a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 4-5 días. Todas las cepas así obtenidas se conservaron a  $4^\circ\text{C}$  para su posterior identificación y preparación de los respectivos extractos fúngicos.

La identificación de los géneros presentes, así como de las especies de los hongos toxicogénicos, se realizó siguiendo la metodología tradicional, mediante estudios macro y microscópicos, según las técnicas propuestas por Barnett (2) (3), Booth (6), Piontelli & Toro (15), Pitt (16, 17), Raper & Fennell (19) y Raper & Thom (20).

La extracción de los metabolitos producidos por los hongos analizados se efectuó con una solución de acetona agua (80:20) (5).

La capacidad toxicogénica se determinó mediante el empleo de ensayos de citotoxicidad, tales como:

**Ensayo Rec:** permitió determinar la actividad antibiótica y/o mutagénica de los metabolitos producidos. Para ello se trabajó en paralelo con dos cepas de *Bacillus subtilis*: la H 17 reparasa positiva y la M 45 que

es reparasa negativa (es decir, está imposibilitada de reparar su ADN) (4) (5).

**Ensayo con *Bacillus thuringiensis* (B.T.):** permitió determinar la actividad citotóxica mediante la elongación de los bacilos y/o la inhibición de su desarrollo (4, 10,21).

**Prueba de la hemólisis de los glóbulos rojos (G.R.):** permitió determinar la capacidad hemolítica de los metabolitos fúngicos sobre hematíes humanos (8,9).

Se consideraron toxicogénicos a aquellos hongos que respondieron positivamente a por lo menos uno de los ensayos biológicos aplicados.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Se aislaron 267 hongos, cuyos géneros se detallan en el gráfico I.

Los géneros más frecuentes fueron: *Aspergillus* (60,30%), *Penicillium* (16,10%) y *Fusarium* (7,87%). Esto coincide con lo reportado en otros estudios (11,12, 13).

En la Tabla 1 se aprecia la variación de la micota fúngica aislada de los cereales y sus subproductos estudiados.

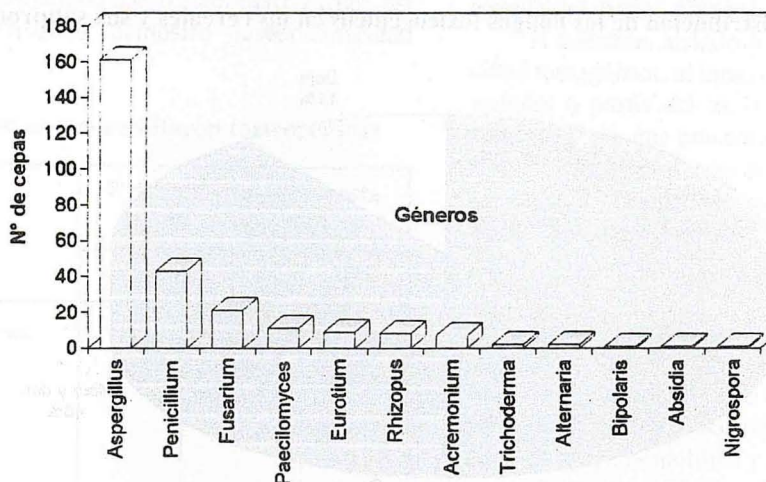
Según puede apreciarse en esta tabla, la mayor cantidad de hongos aislados correspondió al maíz. La soja presentó un menor grado de contaminación y diversidad de hongos. Esto podría deberse a algunas

Tabla 1 - Distribución de los hongos en los cereales y sus subproductos

| Géneros             | Fuentes          |              |                   |              |          |              |
|---------------------|------------------|--------------|-------------------|--------------|----------|--------------|
|                     | Maíz y derivados |              | Trigo y derivados |              | Soja     |              |
|                     | Nº               | %            | Nº                | %            | Nº       | %            |
| <i>Aspergillus</i>  | 115              | 59,9         | 42                | 61,8         | 4        | 57,1         |
| <i>Penicillium</i>  | 34               | 17,7         | 9                 | 13,2         | 0        | 0,0          |
| <i>Fusarium</i>     | 19               | 9,9          | 0                 | 0,0          | 2        | 28,6         |
| <i>Paecilomyces</i> | 0                | 0,0          | 11                | 16,2         | 0        | 0,0          |
| <i>Acremonium</i>   | 7                | 3,7          | 0                 | 0,0          | 0        | 0,0          |
| <i>Eurotium</i>     | 7                | 3,7          | 2                 | 2,9          | 0        | 0,0          |
| <i>Rhizopus</i>     | 5                | 2,6          | 3                 | 4,4          | 0        | 0,0          |
| <i>Trichoderma</i>  | 1                | 0,5          | 0                 | 0,0          | 1        | 14,3         |
| <i>Alternaria</i>   | 1                | 0,5          | 1                 | 1,5          | 0        | 0,0          |
| <i>Bipolaris</i>    | 1                | 0,5          | 0                 | 0,0          | 0        | 0,0          |
| <i>Nigrospora</i>   | 1                | 0,5          | 0                 | 0,0          | 0        | 0,0          |
| <i>Absidia</i>      | 1                | 0,5          | 0                 | 0,0          | 0        | 0,0          |
| <b>Total</b>        | <b>192</b>       | <b>100,0</b> | <b>68</b>         | <b>100,0</b> | <b>7</b> | <b>100,0</b> |



Gráfico 1 - Cepas de Hongos Aisladas



características propias de la semilla que le confieren cierta resistencia a la contaminación, como por ejemplo, bajo contenido de humedad en el momento de la cosecha y desarrollo las semillas con un tegumento bien adherido, dentro de una vaina cerrada.

Otros autores (17), encontraron una microbiota mucho menos variada en el maíz que en el trigo, pero con predominancia para ambos cereales de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*.

En nuestro trabajo, *Aspergillus* fue el género más frecuentemente aislado en los tres tipos de alimentos, representando en todos los casos más de la mitad de los hongos recuperados. Según puede observarse en el gráfico II, el 71,4% procedió del maíz y sus derivados.

*Penicillium* fue aislado a partir del maíz, trigo y sus derivados (79,1%), no ocurriendo lo mismo con soja. (Gráfico II).

Diferentes autores han reportado la presencia de este género en muestras de maíz, fundamentalmente en EE.UU., así como en trigo, habiéndose encontrado inclusive con mayor frecuencia que otras especies (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Fusarium*) (17). En nuestra zona, resultados similares fueron publicados (12).

Con respecto al género *Fusarium*, aislado sólo a partir de la soja y del maíz y sus derivados (90,5%), debe destacarse que fue el género más frecuente en el maíz, según Pitt & Hocking. (17).

Se ha demostrado que estos hongos requieren para su desarrollo, un rH mínimo de 88-91%, un contenido de humedad que oscile entre el 2,2-33% y que su temperatura óptima de desarrollo oscila entre los 20-30°C (22). El escaso número de *Fusarium* contaminantes probablemente se deba a que, en nuestra zona, estas condiciones

Gráfico 2 - Distribución de los géneros más frecuentes en los distintos alimentos

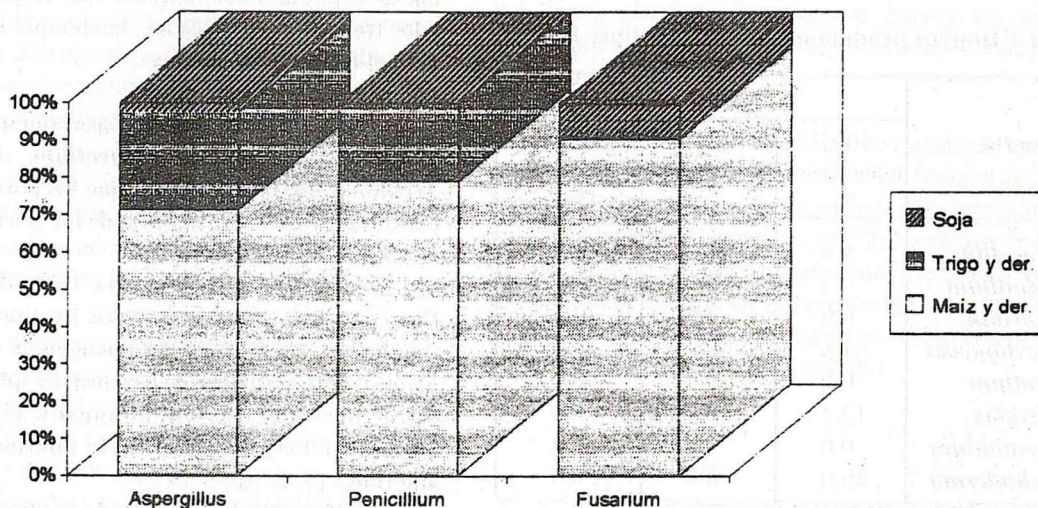
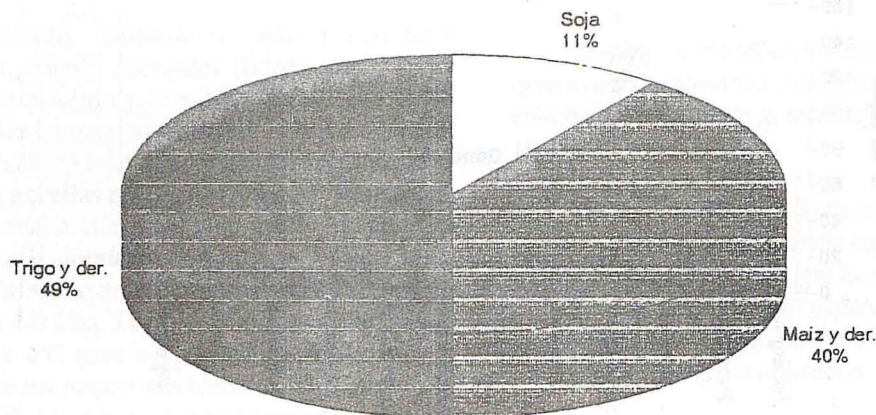




Gráfico 3 - Distribución de los hongos toxicogénicos en los cereales y sus subproductos



no se cumplieron durante la cosecha de las muestras estudiadas.

Por su parte *Paecilomyces* sólo se aisló del trigo y sus derivados, siendo el segundo en orden de frecuencia. Esto no es coincidente con lo hallado en otros estudios (1), en los que *Aspergillus*, *Penicillium* y *Cladosporium* fueron los géneros toxicogénicos más frecuentemente aislados a partir del pan y productos de panadería.

Con respecto a *Trichoderma*, si bien se aislaron dos cepas, las mismas provenían de la soja y del maíz y sus derivados.

El resto de los géneros presentaron baja frecuencia de aislamiento y sólo desarrollaron a partir de alguno de los alimentos estudiados.

En la Tabla 2 se observa, para cada género, la proporción de cepas que resultaron productoras de metabolitos tóxicos.

Tabla 2 Hongos productores de Metabolitos Tóxicos

| Géneros             | Ensayos                |                           |                          |
|---------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|
|                     | REC<br>mutagenic+<br>% | B.T.<br>elongación +<br>% | G.R.<br>hemólisis +<br>% |
| <i>Aspergillus</i>  | 6.8                    | 1.2                       | 10.1                     |
| <i>Penicillium</i>  | 9.3                    | 0.0                       | 17.6                     |
| <i>Fusarium</i>     | 0.0                    | 4.8                       | 14.3                     |
| <i>Paecilomyces</i> | 81.8                   | 66.7                      | 66.7                     |
| <i>Eurotium</i>     | 0.0                    | 33.3                      | 0.0                      |
| <i>Rhizopus</i>     | 12.5                   | 0.0                       | 0.0                      |
| <i>Acremonium</i>   | 0.0                    | 0.0                       | 33.3                     |
| <i>Trichoderma</i>  | 50.0                   | 0.0                       | 0.0                      |

Si se tienen en cuenta los tres géneros que se recuperaron en mayor cantidad, se observa que *Aspergillus* presentó menos cepas hemolíticas que *Penicillium* y *Fusarium*, lo que coincide con lo comunicado por González & Basílico (8, 9).

Con respecto al test de mutagenicidad, se reitera la no respuesta al mismo de los metabolitos producidos por *Fusarium*, lo que coincide con lo comunicado en otras publicaciones anteriores (5).

En relación a los hongos que produjeron elongación y/o inhibición de *Bacillus thuringiensis*, los resultados obtenidos corresponderían a posibles productores de micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina, zearalenona y patulina, conjuntamente con citrinina) para las que el ensayo demostró sensibilidad (21).

Considerando los géneros con menor frecuencia de aislamiento (Gráfico 1), llama la atención el alto porcentaje de cepas de *Paecilomyces* con respuestas positivas a los tres ensayos aplicados, hecho que no se corrobora para el resto de los hongos.

Teniendo en cuenta la escasa contaminación hallada en los alimentos con *Eurotium*, *Acremonium* y *Trichoderma*, consideramos que los porcentajes de respuestas positivas para algunos de los ensayos, si bien son elevados no son comparables.

De la observación de la Tabla 3, surge que *A. flavus*, aislado a partir de todos los tipos de alimentos estudiados, fue la especie toxicogénica más frecuentemente detectada mediante los ensayos aplicados, habiendo demostrado acción mutagénica, hemolítica y antibiótica. Esto coincide con lo informado en trabajos anteriores (4, 8, 9).

A diferencia de lo reportado en otras oportunidades



(4). *A. terreus*, recuperado a partir del maíz y trigo, así como de sus derivados, demostró poseer actividad mutagénica.

**Tabla 3** Especies que resultaron toxicogénicas

| Especies                       | Nº de Cepas con respuesta positiva |     |      |
|--------------------------------|------------------------------------|-----|------|
|                                | uno                                | dos | tres |
| <i>Aspergillus flavus</i>      | 4                                  | 2   | -    |
| <i>A. terreus</i>              | 3                                  | -   | -    |
| <i>A. candidus</i>             | 3                                  | -   | -    |
| <i>A. oryzae</i>               | 2                                  | -   | -    |
| <i>A. ustus</i>                | 1                                  | -   | -    |
| <i>A. niger</i>                | -                                  | 1   | -    |
| <i>Penicillium funiculosum</i> | 2                                  | -   | -    |
| <i>P. variable</i>             | 1                                  | -   | -    |
| <i>P. expansum</i>             | 1                                  | -   | -    |
| <i>P. viridicatum</i>          | 1                                  | -   | -    |
| <i>P. notatum</i>              | 1                                  | -   | -    |
| <i>P. corylophilum</i>         | -                                  | 2   | -    |
| <i>Fusarium</i> spp.           | 2                                  | -   | -    |
| <i>Paecilomyces variotii</i>   | 5                                  | -   | 4    |
| <i>Eurotium chevalieri</i>     | 1                                  | -   | -    |
| <i>Acremonium</i> spp.         | 1                                  | -   | -    |
| <i>Trichoderma harzianum</i>   | 1                                  | -   | -    |

Nota: Los términos "uno", "dos" y "tres" de la tabla se refieren a la cantidad de ensayos positivos para cada cepa.

Tanto las tres cepas de *A. candidus* como la de *A. ustus*, presentaron actividad mutagénica, habiendo sido aisladas a partir del trigo y sus derivados. En cambio, las dos cepas de *A. oryzae* recuperadas a partir del maíz y sus derivados, sólo presentaron actividad hemolítica.

Con respecto a *A. niger*, presente en la soja, si bien presentó actividad mutagénica y hemolítica, anteriormente había demostrado acción citotóxica sobre *B. thuringiensis*, cuando se lo aislaba del maíz (9).

En cuanto al género *Penicillium*, debe destacarse que *P. funiculosum*, presente en el maíz y sus derivados, sólo demostró actividad hemolítica, si bien en otra oportunidad cepas aisladas de sorgo produjeron metabolitos con actividad mutagénica (+).

También hemolizó los G.R. la cepa de *P. variable*

aislada del mismo alimento.

*P. notatum*, aislado de trigo, demostró poseer capacidad mutagénica, al igual que lo sucedido con las cepas aisladas a partir del maíz (5). Con excepción del *P. corylophilum*, que presentó tanto actividad mutagénica como antibiótica, el resto de los *Penicillium*, a igual que *P. notatum*, también presentaron actividad mutagénica. Todos fueron recuperados a partir del trigo y sus derivados.

Respecto a los *Fusarium*, presentes en la soja, en estos estudios se manifiesta actividad hemolítica, pero en trabajos anteriores, cuando se aislaron a partir de maíz, este género demostró actividad citotóxica sobre *Bacillus thuringiensis*, hemolítica y mutagénica (4, 21).

Cuatro cepas de *Paecilomyces variotii*, aisladas a partir del pan (derivado del trigo), fueron las únicas que produjeron metabolitos con actividad toxicogénica para los tres ensayos realizados.

Una cepa de *Eurotium chevalieri*, aislada del maíz, produjo la elongación del *Bacillus thuringiensis*. Otras especies recuperadas a partir de estos alimentos fueron *Rhizopus oryzae* y *Trichoderma harzianum*, que respondieron positivamente al ensayo Rec. Para estos últimos debe destacarse que se reitera la falta de actividad hemolítica ya demostrada (8, 9).

La única especie de *Acremonium* que presentó actividad hemolítica, fue aislada a partir del maíz y sus derivados.

## CONCLUSIONES

Resulta de interés la cantidad de hongos toxicogénicos aislados a partir de las muestras de pan (derivado del trigo), alimento de consumo masivo en nuestro medio, por lo que se sugieren estudios más exhaustivos al respecto.

Los resultados obtenidos demuestran que los metabolitos fúngicos de algunos de los hongos aislados, sólo respondieron a uno de los ensayos biológicos aplicados. Teniendo en cuenta esto, y el hecho de que este tipo de ensayos permite detectar diferentes efectos tóxicos, se considera importante la aplicación de una batería de pruebas para determinar con mayor precisión la capacidad toxicogénica de las especies aisladas.

## REFERENCIAS

1. Anderson, A. W. (1977). The significance of yeasts and molds in food. Food Technology. 47-50.
2. Barnett, H. (1956). Illustrated genera of Imperfect fungi. Burgess Publishing Co. Min.
3. Barnett, H. & Hunte, B. (1972). Illustrated genera of Imperfect fungi. Burgess Publishing Co. Min.
4. Basílico, J. C. (1989). Determinación de Hongos Toxicogénicos en alimentos por métodos biológicos. Tesis Doctoral. F. de Cs. Exactas y naturales. U.N.B.A.
5. Basílico, J. C.; Lurá, M. C. E.; Parada, J. L. (1987). Actividad mutagénica de hongos aislados de sorgo y maíz. Boletín Micológico. vol 3. N° 2 111-115. Valparaíso. Chile.
6. Booth, C. (1977). *Fusarium* Laboratory Guide to the identification of the major species. Commonwealth Mycological Institute. England.
7. Directrices para la vigilancia de las micotoxinas. (1979). Libro preparado por la ONU para la agricultura y la alimentación. FAO: Serie Inspección de Alimentos, N° 4.
8. González, A. M. & Basílico, J. C. (1983). Capacidad hemolítica de extractos fúngicos y algunas micotoxina. Reunión de Comunicaciones sobre Investigación en microbiología de alimentos. Organizada por la S.E.C.Y.T. Santa Fe.
9. -----, (1983). Capacidad hemolítica de micotoxinas y de hongos aislados a partir de componentes de alimentos para aves. III Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Santa Fe.
10. Lurá, M. C. E. & Basílico, J. C. (1983). Detección de metabolitos fúngicos mutagénicos utilizando un ensayo biológico rápido. III Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Santa Fe.
11. Lurá, M. C. E.; González, A. M.; Caffer, M. I.; Basílico, J. C. (1982). Hongos contaminantes del Sorjo utilizado en la elaboración de alimentos balanceados para aves. Estudio de la capacidad toxicogénica de los mismos. Rev. de la F.I.Q.; U.N.L. XLV.
12. Lurá, M. C. E.; González, A. M.; Caffer, M. I.; Basílico, J. C. (1984) Estudio de la capacidad toxicogénica de hongos aislados a partir del maíz y sus derivados. R de la F. de Bqca. y Cs.
13. Lurá, M. C. E. & Miglietta, H. (1977). Hongos contaminantes de los alimentos para aves. Su acción sobre aves en crecimiento. Gaceta Veterinaria 39:511-520.
14. Masimango, N.; Raaut, J. L.; Remacle, J. (1977). Aflatoxins et champignons toxicogenes dans des denrees Alimentaires zairoises. Revue des fermentations et des industries alimentaires 6:164-170.
15. Piontelli, E. & Toro, M. A. (1989). Introducción al estudio de los microhongos. Guía de identificación genérica. Part I. Cátedra de Micología. F. de Medicina. Universidad de Valparaíso.
16. Pitt, J. (1979). The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press Inc. London
17. Pitt, J. I. & Hocking, A. D. (1985). Fungi and food spoilage. Academic Press Australia. Australia.
18. Prácticas recomendadas para la prevención de las micotoxinas en los alimentos, los piensos y sus productos. (1979). Estudio FAO: Alimentación y Nutrición. N° 10
19. Raper, K. & Fennell, D. (1965). The genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
20. Raper, K. & Thom, C. (1949). Manual of the Penicillia. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
21. Saubois, A.; Basílico, J. C.; González, A. M. (1988). Utilización de *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis* para la detección de Hongos Toxicogénicos. Boletín Micológico. 4: 243-247.