

## ACTIVIDAD MUTAGENICA DE HONGOS AISLADOS DE SORGO Y MAIZ

Juan Carlos Basílico G.

Departamento de Bioingeniería, Facultad de Ingeniería Química,  
Universidad Nacional del Litoral,  
Santiago del Estero 2892 (3000) Santa Fe - República Argentina.

María Cristina Enriqueta Lura E.

Cátedra de Microbiología General, Facultad de Bioquímica y  
Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral  
República Argentina.

José Luis Parada

Cátedra de Microbiología de los Alimentos,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,  
Universidad de Buenos Aires - República Argentina

### RESUMEN

Se estudió la actividad mutagénica de 44 hongos contaminantes de sorgo y maíz mediante la aplicación del ensayo Rec.

Los hongos se cultivaron sobre un sustrato natural, obteniéndose extractos con una solución de acetona-agua.

La actividad mutagénica de cada extracto se estudió adaptando la técnica de Kada y col. y se ensayaron con y sin el agregado de fracción microsomal, sales y cofactores, habiéndose trabajado con las cepas de *Bacillus subtilis* H 17 (Rec+) y M 45 (Rec-).

El 36,4 o/o de ellos presentó acción mutagénica cuando el ensayo se realizó sin fracción microsomal.

Con el agregado de la misma, sólo el 13,6 o/o presentó dicha acción.

*Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* fueron los géneros que presentaron estas acciones biológicas.

Sólo *A. parasiticus* presentó actividad promutagénica.

### SUMMARY

[Mutagenic activity of fungi isolated from sorghum and corn]

We studied the mutagenic activity of 44 fungi contaminating sorghum and corn using the Rec test.

Fungi were grown on a natural medium and acetone-water fungal extracts were prepared.

The mutagenic activity of each extract was determined adapting the technique of Kada et al.; such biological activity was tested with and without the addition of microsomal fraction salt and co-factors using *Bacillus subtilis* strains H 17 (Rec+) and M 45 (Rec-).

When the test was carried out without microsomal fraction 36.4 o/o of the extracts presented mutagenic activity. With microsomal fraction added only 13.6 o/o showed activity.

*Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* were the genera that showed biological activity.

Only *A. parasiticus* presented promutagenic activity.

### INTRODUCCION

La invasión fúngica en un alimento puede dar como resultado un marcado deterioro en su calidad. Algunas especies de estos hongos son capaces de producir micotoxinas (metabolitos secundarios), bajo condiciones adecuadas de actividad acuosa, pH y temperatura (1).

Al presente, catorce Micotoxinas han sido

reconocidas como cancerígenas en animales de experimentación y una ha sido implicada en carcinomas humanos (2).

Diferentes autores entre los que encontramos a Ames y col. (8), han establecido una fuerte correlación entre las propiedades carcinogénicas y mutagénicas de numerosos contaminantes ambientales y esto ha permitido contar con métodos de "screening" rápidos y económicos para la detección de sustancias potencialmente carcinogénicas.

Entre estos métodos encontramos el ensayo REC que es uno de los aconsejados por Environmental Protection Agency (EPA) de los Estados Unidos (4) para el estudio de sustancias mutagénicas. El mismo se basa en que los distintos daños producidos sobre el ADN están sujetos a la reparación por recombinación post-duplicación y que las bacterias mutantes que carecen de la posibilidad de efectuar dicha reparación (Rec<sup>-</sup>) son más sensibles a los agentes mutagénicos que las células normales que le dieron origen (Rec<sup>+</sup>). Kada y col. (5) proponen para este ensayo utilizar 2 cepas de *Bacillus subtilis*: la cepa H17 (Rec<sup>+</sup>) y la cepa M45 (Rec<sup>-</sup>) que fue aislada como una mutante supersensible luego de irradiar la cepa H17. Una de las ventajas de este ensayo es que no está restringido a la detección de mutaciones puntuales específicas, ya que puede detectar daños producidos por distintos mecanismos y en cualquier locus (o multi loci) del ADN. Sin embargo, como todo ensayo con bacterias, necesita activación metabólica para poder detectar las sustancias promutagénicas que son activadas a nivel hepático.

En este trabajo se estudia la capacidad mutagénica y promutagénica de hongos contaminantes de maíz y sorgo utilizados en la preparación de alimentos, con el objeto de evaluar el riesgo potencial que implican estos mohos en la salud humana y animal.

## MÉTODOS

Se aislaron 44 cepas de hongos a partir de sorgo y maíz, obtenidos de silos de fábricas de alimentos balanceados y molinos harineros de la zona de la ciudad de Santa Fe (6).

Se cultivaron sobre el sustrato natural a 25°C durante 14 días. Para ello se prepararon placas con 30 ml de medio de cultivo constituido por grano molido al 5 o/o en agua y agarizado.

Transcurrido el período de incubación se obtuvieron los extractos fúngicos con una solución de acetona-agua (80:20) (7).

La actividad mutagénica de cada extracto se estudió adaptando la técnica de Kada (5), y se ensayaron con y sin el agregado de fracción microsomal, sales y cofactores, habiéndose trabajado por separado y en paralelo con las cepas de *B. subtilis* M45 y H17.

### Adaptación de la técnica de Kada y col.

a) Cosecha de esporos: se trabajó con cada cepa de *B. subtilis* por separado del siguiente modo:

Se hicieron rodar perlas de vidrio sobre una estría fresca de cada una de las cepas. Luego se traspasaron a una superficie de agar tripticasa soya

contenido en botellas de Roux. Se incubaron a 30°C durante 24 horas y luego 7 días más a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo se agregaron 30 ml de solución fisiológica a cada botella de Roux, a fin de extraer la mayor cantidad posible de células. Luego se centrifugó a 1.500 r.p.m. durante 20 minutos. Una vez desechado el sobrenadante, las células se lavaron con otros 30 ml de Solución Fisiológica. Este procedimiento de lavado se repitió otras dos veces más.

Al término de la última centrifugación se resuspendió el sedimento en igual volumen de Solución Fisiológica (30 ml) y se repartió en tubos estériles. Dichos tubos se colocaron en Baño María a 80°C durante 30 minutos.

De este modo se obtuvo una gran cantidad de esporos, lo que permitió disponer de un inóculo homogéneo y standarizado permanentemente.

b) Preparación de las placas: se prepararon placas con 10 ml de agar tripticasa soya. Sobre esta capa de medio solidificado se vertió el inóculo, el que fue preparado agregando 0,025 ml de la suspensión de esporos a 5 ml del mismo medio.

Una vez solidificado el inóculo, se colocó sobre el mismo el disco "portasoluciones" (Item N° D 3299, Scientific Glass Apparatus, 735 Broad Street, Blomfield, New Jersey). En cada orificio se vertieron 0,1 ml de los extractos fúngicos en estudio. Las placas se colocaron 20 horas en heladera para facilitar una mejor difusión de los extractos, con lo que se logra una mayor sensibilidad en la lectura. Transcurrido ese tiempo, se incubaron en estufa a 37°C durante 20 horas.

Cuando se trabajó con fracción microsomal, la misma fue agregada al inóculo. Una vez solidificado, se colocó sobre la superficie del mismo el disco "portasoluciones". En cada orificio de dicho disco se adicionó 0,1 ml de cada uno de los extractos en estudio y 0,1 ml de la solución de cofactores y sales. (Tanto la fracción microsomal como la de cofactores y sales fueron preparadas según Ames y col. (8)).

Se incubó en estufa a 37°C durante 20 horas.

Transcurrido el período de incubación, se retiró el disco "portasoluciones" y se midieron los halos de inhibición que se produjeron.

Los resultados se interpretaron según el criterio propuesto por Leifer y col. (3) considerándose resultados positivos (actividad mutagénica positiva), cuando la cepa de *B. subtilis* M45 (DNA reparasa deficiente) fue inhibida.

Si tanto las cepas M45 como la H17, fueron inhibidas en la misma extensión, los resultados fueron considerados como negativos (acción anti-biótica).

Aquellos extractos que no produjeron inhibición del desarrollo, fueron considerados como "sin respuesta".

Los hongos que presentaron algún tipo de acción biológica se identificaron según las claves de Thom and Raper (9), Raper and Thom (10), Raper

and Fennell (11), Barnett (12) y Booth (13).

## RESULTADOS

En la Tabla I se presentan los géneros fúngicos contaminantes de los granos analizados, donde se observa prevalencia de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*.

Las respuestas de los extractos fúngicos obtenidos en los ensayos REC se observan en la Tabla II. Se constata un alto porcentaje de extractos con actividad mutagénica, que disminuye cuando se llevó a cabo el ensayo en presencia de fracción microsomal. La actividad antibiótica fue menor, desapareciendo por acción de la fracción microsomal.

En la Tabla III se observa la acción biológica en 8 extractos pertenecientes a cepas de *Penicillium*, correspondiendo al 50 o/o de las cepas de dicho género.

En la Tabla IV se observa la respuesta al ensayo para 7 extractos de *Fusarium* (que representan el 54 o/o de las cepas de dicho género).

Los resultados obtenidos con 5 extractos de *Aspergillus* (46 o/o del total de cepas de dicho género) se observan en Tabla V.

Cuando el ensayo se realizó con fracción microsomal, sólo 2 extractos de *Penicillium* y 3 de *Aspergillus* mantuvieron su acción mutagénica (ver Tablas III y V).

Se detectó la presencia de un extracto con acción promutagénica en el caso de un *A. parasiticus*, que mostró acción negativa (actividad antibiótica)

sin activación metabólica y la aparición de una actividad mutagénica con el agregado de la fracción microsomal (ver Tabla V).

Los extractos de las cepas que no respondieron al test (sin acción biológica) no modificaron su respuesta en presencia de fracción microsomal.

## DISCUSION

En base a los resultados obtenidos se deduce que la fracción microsomal actuaría preponderantemente en la desactivación de los metabolitos mutagénicos encontrados; si bien es conocido que micotoxinas tales como aflatoxinas ven potenciadas su acción por la presencia de dicha fracción (14). La producción de metabolitos mutagénicos por cepas de *Penicillium implicatum*, *P. citrinum*, *P. viridicatum*, *Aspergillus flavus*, *A. versicolor*, *A. parasiticus*, *Fusarium moniliforme* y *F. semitectum*, está en concordancia con lo encontrado por otros investigadores (15). La acción mutagénica hallada en las especies *Penicillium oxalicum* y *Aspergillus fumigatus*, a nuestro conocimiento, no ha sido descrita hasta el presente, si bien ambas especies pueden ser productoras de metabolitos tóxicos. Este hallazgo, tal como lo aconseja EPA deberá ser confirmado mediante otros ensayos biológicos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos sería conveniente continuar con este tipo de ensayos preliminares, ya que no se realizan estudios de esta naturaleza en nuestro país. Ello permitirá conocer más a fondo las características toxicológicas de los hongos que contaminan los alimentos en la República Argentina.

TABLA I  
Contaminación Fúngica

GENEROS	FUENTE		TOTAL
	MAIZ Nº cepas aisladas	SORGO Nº cepas aisladas	Nº cepas aisladas
<i>Penicillium</i> spp.	7	9	16
<i>Fusarium</i> spp.	5	8	13
<i>Aspergillus</i> spp.	7	4	11
<i>Curvularia</i> spp.	—	2	2
<i>Alternaria</i> sp.	—	1	1
<i>Bipolaris</i> sp.	—	1	1
TOTAL	19	25	44

TABLA II

Respuesta de los extractos fúngicos al ensayo REC

ENSAYO REC	RESPUESTA POSITIVA (Act. mutagénica)	RESPUESTA NEGATIVA (Act. antibiótica)	SIN RESPUES- TA	TOTAL
Sin fracción micro- somal	36,4 o/o	9,1 o/o	54,5 o/o	100,0 o/o
Con fracción micro- somal	13,6 o/o	0 o/o	86,4 o/o	100,0 o/o

TABLA III

Respuesta biológica al ensayo REC en especies de *Penicillium*

CEPAS	FUENTE	ENSAYO REC	
		sin fracción microsomal	con fracción microsomal
<i>P. implicatum</i> Biourge	sorgo	+	sin respuesta
<i>P. implicatum</i> Biourge	sorgo	+	sin respuesta
<i>P. implicatum</i> Biourge	sorgo	+	sin respuesta
<i>P. viridicatum</i> Westling	sorgo	+	sin respuesta
<i>P. viridicatum</i> Westling	maíz	+	sin respuesta
<i>P. oxalicum</i> Currie & Thom	maíz	+	+
<i>P. citrinum</i> Thom	maíz	+	+
<i>P. notatum</i> (= <i>P. chrysogenum</i> Thom)	sorgo	-	sin respuesta

+ : actividad mutagénica positiva.

- : actividad antibiótica.

TABLA IV

Respuesta biológica al ensayo REC en especies de *Fusarium*

CEPAS	FUENTE	ENSAYO REC	
		sin fracción microsomal	con fracción microsomal
<i>F. moniliforme</i> Sheld	sorgo	+	sin respuesta
<i>F. moniliforme</i> Sheld	sorgo	+	sin respuesta
<i>F. moniliforme</i> Sheld	sorgo	+	sin respuesta
<i>F. moniliforme</i> Sheld	sorgo	-	sin respuesta
<i>F. moniliforme</i> Sheld	maíz	+	sin respuesta
<i>F. moniliforme</i> Sheld	maíz	+	sin respuesta
<i>F. semitectum</i> Berk & Rav	sorgo	-	sin respuesta

+ : actividad mutagénica positiva.

- : actividad antibiótica.

TABLA V  
Respuesta biológica al ensayo REC en especies de *Aspergillus*

CEPAS	FUENTE	ENSAYO REC	
		sin fracción microsomal	con fracción microsomal
<i>A. fumigatus</i> Fres	maíz	+	sin respuesta
<i>A. parasiticus</i> Speare	maíz	—	+
<i>A. versicolor</i> (Vuill) Tiraboschi	maíz	+	+
<i>A. flavus</i> Link & Gray	sorgo	+	+
<i>A. flavus</i>	maíz	+	+

+: actividad mutagénica positiva.

—: actividad antibiótica.

## REFERENCIAS

1. Micotoxinas. Criterios de Salud ambiental II. (1983). O.P.S., O.M.S.
2. Stark, A. (1980). Mutagenicity and Carcinogenicity of Mycotoxins. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 235-262.
3. Leifer, Z.; Kada, T.; Mandel, M.; Zeiger, E.; Statford, R. and Rosenkranz, H.S. (1981). An evaluation of tests using DNA repair-deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity. *Mutation Research*, 87: 211-297.
4. Testing capability and resources. (1983). Department of Molecular Toxicology. Litton Bionetics Inc. Kensington.
5. Kada, T.; Tutikawa, K. and Sadaie, Y. (1972). *Mutation Research* 16: 165-174.
6. Lurá, M.C.E.; Bacílico, J.C. (1982). Hongos contaminantes del sorgo utilizado en la elaboración de alimentos balanceados para aves. *Rev. de la Facultad de Ing. Química, U.N.L.*, 45: 35-39.
7. Payen, J.; Lafont, P.; Parache, R.M.; Boller, F. (1977). Detection des souches toxiques de *Fusarium*. *Masson* N° 107. *Collection de Médecine Légale et de Toxicologie Médicale*. 111-117.
8. Ames, B.N.; Lee, F.D.; and Duranton, W.E. (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 782.
9. Thom C., and Raper, K. 1945. *Manual of the Aspergilli*. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
10. Raper, K. and Thom, C. (1949). *Manual of the Penicillia*. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
11. Raper, K. and Fennell, D. (1965). *The genus Aspergillus*. Williams and Wilkins Co. Baltimore.
12. Barnett, H. (1966). *Illustrated genera of Imperfect Fungi*. Burgess Public. Co., Minn.
13. Booth, C. (1977) *Fusarium Laboratory Guide to the identification of the mayor species*. Mycological Institute; Surrey, England.
14. Heathcote, J.G. (1979). *Aflatoxins: Chemical and biological aspects*. Elsevier Scientific Publ. Co.
15. Cole, R. and Cox, R. (1981). *Handbook of Toxic fungal metabolites*. Academic Press.