

## TOXIGENIC FUNGAL IN CORN STORED IN HERMETIC PLASTIC BAGS

CASTELLARI, Claudia<sup>1</sup>, MARCOS VALLE, Facundo<sup>1</sup>, MUTTI, Jeremias<sup>1</sup>,  
CARDOSO, Leandro<sup>2</sup>, BARTOSIK, Ricardo<sup>2</sup>

1. Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP, CC276; 2. EEA INTA Balcarce.

[rbartosik@balcarce.inta.gov.ar](mailto:rbartosik@balcarce.inta.gov.ar)

Section: Biology and Monitoring

Type of presentation: Poster

### ABSTRACT

In Argentina, 35 million tonnes are stored in hermetic plastic bags. Inside the bags, the modified atmosphere has an effect on stored grains, insects and fungi. Fungal biota typically isolated from stored grains consists of species of the gender *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and xerophilic fungal, some of which are potential producers of mycotoxins. The province of Entre Rios, Argentina, is an important area of study because much of the production of maize stored in bags is demanded by the poultry industry. The objective of this study was to identify mycotoxigenic fungal species in corn stored in hermetic plastic bags, located in three Departments of Entre Rios province. A total of 176 samples of corn were analyzed, stored in 23 bags located in the Departments of Paraná (west region), La Paz (northern region) and Tala (central region). Two potential species producers of Aflatoxins (*A. flavus* and *A. parasiticus*) and a potential producer of Fumonisin (*F. verticilloides*) were identified in all the plastics bags evaluated. In La Paz Department, *Aspergillus sp.* was detected in 66,7% of samples analyzed and *F. verticilloides* in 54%. In Tala Department *Aspergillus sp.* were detected in 63,3% and *F. verticilloides* in 43,6%, while in Parana *Aspergillus sp.* was detected in 88,2% of the evaluated samples and *F. verticilloides* 41,4%. The results revealed that mycotoxigenic fungi, can develop in corn stored in hermetic plastic bags. This implies a potential risk of contamination with Aflatoxins and /or Fumonisin in the evaluated bags.

Key words: mycotoxigenic fungi, corn, silobag

## 1. INTRODUCCIÓN

En la Argentina, la capacidad total de almacenaje se estima en 57 millones de toneladas, que corresponde al 61% del total de la producción. Esta situación genera un cuadro de ineficiencias del sistema de poscosecha, por los que los productores han adaptado el sistema tradicionalmente usado en el almacenaje de grano húmedo, para almacenar granos secos (trigo, maíz, soja). Esta técnica consiste en el almacenamiento de granos en bolsas plásticas herméticas. Las bolsas son impermeables al agua y tienen una importante hermeticidad a los gases ( $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ). El proceso respiratorio de los integrantes bióticos del granel (granos, hongos, insectos, etc.) consume el oxígeno generando dióxido de carbono. La constitución de esta nueva atmósfera, tiene influencia sobre las semillas almacenadas, los insectos y los hongos (Cardoso *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2008).

Las especies fúngicas presentes en los granos almacenados pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y algunos xerófilos, muchos de cuales son reportados como productores de micotoxinas (Christensen 1987; Lacey, 1989). Los factores que influyen en su desarrollo son el contenido de humedad del sustrato (Giorni *et al.*, 2009; Hell *et al.*, 2000), la temperatura, el tiempo, el grado de invasión fúngica previo al almacenamiento y la actividad de insectos y ácaros que pueden facilitar la diseminación.

Los antecedentes expuestos indican la importancia de identificar las diferentes especies fúngicas presentes en este tipo de sustrato, en especial la presencia

de especies productoras de micotoxinas, que pueden constituir un peligro potencial para la salud humana y animal.

El objetivo del trabajo fue caracterizar la microbiota que se desarrolla en granos de maíz, destinados a la alimentación avícola, almacenados en bolsas plásticas herméticas ubicadas en provincia de Entre Ríos, Argentina, la zona que concentra el 47% de las granjas productora de aves y huevos más importante del país. La información obtenida podrá ser utilizada para diseñar diferentes estrategias de manejo a aplicar durante el cultivo y en el almacenamiento de manera de lograr conservar un grano de calidad sanitaria adecuada.

## **2. METODOLOGÍA**

El estudio de caracterización de la microbiota se llevó a cabo en granos de maíz almacenados en bolsas plásticas herméticas ubicadas en los departamentos de Paraná (zona oeste), La Paz (zona norte) y Tala (zona centro), de la provincia de Entre Ríos, Argentina. Entre Ríos. Limita por el norte con la provincia de Corrientes; por el oeste, separada por el río Paraná, con la de Santa Fe; por el sur con la de Buenos Aires y por el este, el límite internacional trazado en el río Uruguay, la separa de la República Oriental del Uruguay.

### **2.1. Muestreo**

De cada bolsa se extrajeron muestras cada 10 m de distancia, dependiendo de la longitud total de la misma (en general 60m). Para ello se utilizó un calador

sonda que permitió recolectar los granos en profundidad. Posteriormente los granos extraídos se clasificaron por su ubicación en el perfil de la bolsa: 1) estrato superior de la bolsa (0-0,1 m) y 2) estratos medio e inferior de la bolsa (0,1-1,8m).

Además, se determinaron la temperatura y humedad de los granos en diferentes estratos. La temperatura se registró con un termómetro electrónico compuesto por una lanza de 1,80 m de largo, con tres sensores que permiten medir la temperatura del grano en la parte superior (0,1 m desde la cima), media (0,7 m desde la cima) e inferior (1,6 m desde la cima) de la bolsa.

La humedad del grano se determinó con un medidor de capacitancia (DICKEY-John, GAC 2100, EEUU).

Las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno con cierre hermético y remitidas al Laboratorio de Microbiología de hongos de la Unidad Integrada EEA, INTA Balcarce-FCA, UNMdP, donde se acondicionaron en cámara a 4° C hasta el momento de su procesamiento.

## 2.2. Caracterización de la micobiota

### 2.2.1. Obtención de aislamientos fúngicos

La presencia de hongos filamentosos se determinó empleando la técnica de plaqueo directo de piezas. Para ello en el laboratorio, en cámara de flujo laminar, se extrajeron 110 granos enteros de cada muestra. Los mismos fueron colocados en la superficie de 10 placas de Petri (10 granos por placa) conteniendo medio de cultivo agarizado con 18% de glicerol (DG18). El medio

DG18 posee una actividad de agua de 0,95 que permitió el desarrollo de especies no xerófilas (*Penicillium*, *Aspergillus*), como así también de especies xerófilas (*Eurotium spp.*) y levaduras (Pitt and Hocking, 1997). Los restantes 10 granos fueron sembrados en la superficie de una placa de Petri conteniendo medio de cultivo Agar diclorán, cloranfenicol, peptona (DCPA), para detectar la presencia de hongos del género *Fusarium*.

Las placas de Petri fueron incubadas a 25°C, durante 7 días. Transcurrido dicho periodo se determinó el porcentaje de colonización fúngica de los granos y se extrajeron todas aquellas estructuras cuya morfología macroscópica fue considerada diferente. Las mismas fueron colocadas en los medio de cultivo DG18 y DCPA, e incubadas nuevamente a 25°C durante 7 días, con el objeto de obtener aislamientos puros a partir de sucesivos repiques.

#### 2.2.2. Identificación de los aislamientos

Los aislamientos obtenidos de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus* y *Eurotium* se identificaron utilizando la clave taxonómica de Pitt y Hocking (1997), basada en características morfológicas y bioquímicas.

Para identificar los aislamientos de *Fusarium* se emplearon además de la clave de Pitt y Hocking, la clave de Samson *et al.*, (1995) y el Atlas del género *Fusarium* (Gerlach and Nirenberg, 1982). Para ellos los aislamientos puros fueron sembrados en medios de cultivo DCPA y agar papa dextrosa (PDA) (Pitt and Hocking, 1997).

### 2.3. Determinación de la frecuencia de aislamiento

Se determinó la frecuencia de aislamiento de géneros fúngicos y de especies potencialmente productoras de aflatoxinas, por bolsa, a través del cociente entre el número de muestras analizadas por bolsa en la que fueron aisladas y el número total de muestras.

Se determinó, asimismo, la frecuencia de aislamiento de cada una de las especies identificadas, expresada en % de muestras analizadas, a través del cociente entre el número de muestras en los cuales cada especie fue aislada y el número total de muestras analizadas por Departamento.

## 3. RESULTADOS

Se analizaron un total de 176 muestras de granos de maíz almacenados en 23 bolsas plásticas herméticas, ubicadas en 3 Departamentos de la provincia de Entre Ríos, la de mayor importancia en la Argentina por la producción de pollos y huevos.

En todas las bolsas analizadas se aislaron e identificaron especies de hongos filamentosos, pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Eurotium*. Si bien *Penicillium* y *Aspergillus*, presentaron el mayor número de especies identificadas, solo dos especies de *Aspergillus* junto a la especie de *Fusarium*, son consideradas por la bibliografía como potenciales productoras de micotoxinas y de importancia para la salud humana y animal, por los efectos

adversos que ocasionan. Ellas fueron: *F. verticilloides*, *A. flavus* y *A. parasiticus*.

Con respecto a las especies de *Aspergillus*, potenciales productoras de aflatoxinas, se determinó que mas del 90% de los aislamientos identificados correspondieron a *A. flavus*.

En la tabla 1 se presentan, las frecuencias de aislamientos de las especies fúngicas potenciales productoras de micotoxinas, más importantes, en granos de maíz almacenados en bolsas plásticas herméticas.

La posición de los granos en el perfil de la bolsa, no tuvo influencia sobre la presencia de las especies fúngicas identificadas, ya que en ambos estratos evaluados (superior e inferior) se aislaron e identificaron las mismas especies, aunque con frecuencias diferentes.

En todas las bolsas analizadas, se aislaron especies fúngicas micotoxigénicas pertenecientes, a los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. En el Departamento de Paraná fue donde se detectó el mayor porcentaje de muestras contaminadas con especies fúngicas potenciales productoras de aflatoxinas, mientras que en el Departamento de La Paz, fue donde se registró el mayor número de muestras contaminadas con *F. verticilloides*, productor de fumonisinas. En este Departamento se detectó también que el 52,4% del total de muestras analizadas, estaban contaminadas con las tres especies potenciales productoras de aflatoxinas y fumonisinas, en la misma muestra.

Por otro lado, se observó (datos no presentados) que en las muestras donde *F. verticilloides* y *A. flavus* estaban presentes juntos, siempre el porcentaje de granos contaminados con *Fusarium* fue superior.

#### 4. DISCUSIÓN

El almacenamiento de cereales en bolsas plásticas herméticas, requiere de un monitoreo periódico, con el objeto de evitar el deterioro de los granos, considerando que éstos son contaminados con hongos micotoxigénicos. En este estudio se identificaron especies pertenecientes a los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Eurotium*, muchas de ellas consideradas potenciales productoras de micotoxinas. Sin embargo, *A. flavus* y *F. verticilloides*, son las más importantes desde el punto de vista de los daños que ocasionan al producir aflatoxinas y fumonisinas, respetivamente (Lino *et al.*, 2007; Logrieco *et al.*, 2007).

Especies de *Aspergillus* y *Fusarium*, productoras de micotoxinas, fueron identificadas en diferentes granos de cereales durante el almacenamiento, así como también sus toxinas, aflatoxinas y fumonisinas, con distintas concentraciones (Pacin *et al.*, 2009; Moreno Cunha *et al.*, 2009). Esta situación pone en riesgo la salud humana y animal ya que la tendencia observada coincide con un aumento del consumo de cereales o de productos elaborados, contaminados con micotoxinas que ocasionan distintos daños, incluso la muerte, cuando son ingeridos (Voss *et al.*, 2007; Lerda *et al.*, 2005).

Al estudiar las condiciones que favorecen el desarrollo de los hongos durante el almacenamiento y la producción de micotoxinas, se conoce que la humedad de los granos es una de las más importantes (Giorni *et al.*, 2009; Hell *et al.*, 2000). Para el caso del maíz, un contenido de humedad del 13% es considerado seguro para evitar el desarrollo de hongos y la producción de micotoxinas. En este estudio se determinó que todas las muestras presentaron un contenido de humedad superior al 13%, alcanzando valores de 25,1% en

muestras obtenidas en bolsas ubicadas en el Departamento de La Paz (región norte). Estas determinaciones hacen pensar en la posibilidad de que los granos almacenados estén contaminados con micotoxinas y con diferentes niveles de contaminación. Prueba de ello fue la presencia de *Fusarium*, con frecuencias que superaron el 40%, teniendo en cuenta que es una especie que infecta al cultivo en el campo.

El almacenamiento y la conservación de granos en bolsas plásticas herméticas es considerada una herramienta importante para la agricultura, desde el punto de vista económico y financiero, ya que constituye una práctica sencilla y de bajo costo. Sin embargo, es necesario considerar los factores que afectan la calidad sanitaria de los granos, humedad, temperatura y tiempo de almacenamiento, ya que existe un alto riesgo de presencia de hongos productores de micotoxinas, que constituyen una problemática compleja por los inconvenientes que ocasionan a la salud.

## BIBLIOGRAFÍA

Cardoso, M.L, Bartosik, R, Rodriguez, J and Ochandio, D., 2008. Factors affecting carbon dioxide concentration of soybean stored in hermetic plastic bags (silo-bag). Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Conference on Controlled atmosphere and fumigation in stored products. Chengdu.

Christensen, C.M., 1987. Field and storage fungi. In: Beuchat LR, ed. Food and Beverage Mycology. New York, Van Nostrand Reinhold. Pp 211-232.

Gerlach, W. and Nirenberg, H., 1982. The Genus *Fusarium* – a Pictorial Atlas. Berlin. 406 pp.

Giorni, P., Battilani, P. and Magan, N., 2008. Effect of solute and matric potential on in vitro growth and sporulation of strains from a new population of *Aspergillus flavus* isolated in Italy. Fungal Ecology 1, 101-106.

Hell, K., Cardwell, K.F., Setamou, M. and Poehling, H.M., 2000. The influence of storage practices on aflatoxin contamination in maize in four agroecological zones of Benin west Africa. Journal of Stored Products Research 36, 365-382.

Lacey, J., 1989. Pre and post harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. J. of Apl. Bacteriol. Symposium Supplement, 11S-25S.

Lerda, D., Biaggi Bistoni, M., Peralta, N., Ychari, S., vazquez, M. and Bosio, G., 2005. Fumonisin in foods from Cordoba (Argentina), presence and genotoxicity. Food and Chemical Toxicology 43, 691-698.

Lino, C.M., Silva, L.J., Pena, A., Fernández, M. and Mañes, J., 2007. Occurrence of fumonisins B1 and B2 in *broa*, typical Portuguese maize bread. International Journal of Food Microbiology 118, 79-82.

Logrieco A., Moretti, G., Perrone, G. and Mule, G., 2007. Biodiversity of complexes of mycotoxigenic fungal species associated with *Fusarium* ear rot of maize and *Aspergillus* rot of grape 119, 11-16.

Moreno Cunha, E., Tironi García, G., Ono, M.A., Vizoni, E., Kawamura, O., Hirooka, E.Y., Sataque Ono, E.Y., 2009. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. Food Chemistry 116, 220-226.

Pacin, A.M., Bovier, E.C., González, H.L., Whitechurch, E.M., Martínez, E.J. and Resnik, S., 2009. Fungal and fumonisins contamination in Argentine mayze

(*Zea mays* L.) solo bags. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 2778-2781.

Pitt, J. and Hocking, A.D., 1997. *Fungi and food spoilage*. London. UK: Blackie Academic & Professional.

Rodriguez, J, Bartosik, R, Cardoso, ML and Croce, D., 2008. Factors affecting carbon dioxide concentration of weath stored in hermetic plastic bags (silo-bag). *Proceedings of the 8th International Conference on Controlled atmosphere and fumigation in stored products*. Chengdu.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. and Filtenborg, O., 1995. *Introduction to food-borne fungi*. 4 ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Baarn. Netherlands. 322 p.

Voss, K.A., Smith, G.W. and Haschek, W.M., 2007. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal feed Science and Technology* 137, 299-325.

Tabla 1. Frecuencia de aislamiento de especies potenciales productoras de micotoxinas, en porcentaje de muestras analizadas, en tres Departamentos de la provincia de Entre Rios Argentina

DEPARTAMENTO	<i>F. verticilloides</i>	<i>Aspergillus</i> sp. (#)	<i>F. verticilloides</i> y <i>Aspergillus</i> sp. (#)
La Paz (Norte)	54	66,7	52,4
Paraná (Oeste)	41,4	88,2	36,4
Tala (Centro)	43,6	63,3	ND

(#) *A. flavus*; *A. parasiticus*; ND: no determinada