



Estudio de la Micoflora y Contenido de Aflatoxinas Presentes en Cebada Cultivada y Almacenada en el Estado de Hidalgo

Israel O. Ocampo S.¹, Judith Jaimez O.¹, Elizabeth Contreras L.¹, Jorge Carrazana G.²

¹ Laboratorio de Alimentos II, Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca Tulancingo, km 4.5, c.p. 42076, Pachuca, Hidalgo. ² Departamento de Química Física. Facultad de Ciencias. Universidad de Santiago de Compostela, Campus Lugo. Lugo, España.

Resumen

En el presente trabajo se realizó el estudio de la micoflora y aflatoxinas contaminantes de granos de cebada, recolectados en la comunidad de Tlanalapa perteneciente al municipio de Tepeapulco en el estado de Hidalgo, los cuales se utilizan como forraje para ganado y en la elaboración de malta cervecera. Se analizaron diez muestras de granos, obtenidas de diez productores de cebada locales, recolectadas en tres estadíos distintos: un mes previo a la cosecha, durante la cosecha y después de tres meses de almacenamiento, lo que dió un total de 30 muestras analizadas. Los recuentos totales se efectuaron utilizando el medio Agar Papa Dextrosa, el aislamiento e identificación de los géneros fúngicos encontrados se efectuó en los medios Agar Extracto de Malta y Agar Czapek. Todas las muestras analizadas presentaron índices elevados de contaminación fúngica (10^5 a 10^7 ufc/g). Se aislaron doce géneros de mohos presentes en las muestras, en un rango de 10^3 a 10^5 ufc/g, de los cuales, cuatro contienen especies potencialmente micotoxigénicas: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Alternaria* spp. El género *Cladosporium* spp. fue aislado del 100% de las muestras analizadas. Todas las muestras contenían aflatoxinas totales en un rango de 1.5 a 1.7 ppb.

Abstract

The incidence of fungal contamination and aflatoxin content in 30 samples of barley used for brewing and animal feeding has been studied. Samples were collected in Tlanalapa community, in Tepeapulco, Hidalgo, Mexico. Ten samples were collected in three periods of analysis: one month before harvest, during harvest and after three months of storage. Sample analysis was accomplished in PDA culture medium. Malt extract agar and Czapek agar were used for isolation and identification of fungal genera. All samples were heavily contaminated with moulds and yeasts (10^5 a 10^7 ufc/g). Twelve fungal genera were found which included four genera potentially mycotoxigenic: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp.,



Penicillium spp. and *Alternaria* spp. Cladosporium genera was isolated of all samples analyzed. All samples were contaminated with levels of total aflatoxins of 1.5 to 1.7 ppb.

Introducción

Los hongos aparecen fácil y frecuentemente como contaminantes en productos alimenticios, constituyen quizá el agente deteriorante más común de todo tipo de alimentos dada su capacidad ubicuista y su gran resistencia. La mayoría de los hongos micotoxigénicos son contaminantes habituales en los alimentos y productos agrícolas, ya que son capaces de crecer en cultivos, hojas, tallos, cereales, semillas, carnes, grasas, productos lácteos, etc. (Betina 1984; Jarvis y Williams, 1987). Las condiciones tropicales y subtropicales favorecen su proliferación, la cual puede presentarse en los productos agrícolas cuando estos aún están en el campo, después de la cosecha o durante el almacenamiento (Frisvad y Samson, 1992).

La presencia de hongos en un alimento no indica necesariamente una contaminación con micotoxinas pero si es un factor de riesgo importante para que ésta se produzca. Así mismo, la ausencia de crecimiento fúngico aparente no garantiza la ausencia de estas toxinas (Northolt y Van Egmond, 1982).

Dentro de los productos agrícolas, los más susceptibles a la contaminación por hongos productores de micotoxinas son los cereales (arroz, trigo, cebada y maíz). La cebada es un cereal empleado principalmente como materia prima en la elaboración de cerveza y también como forraje. Durante su formación en la planta hasta su conversión en malta o bien hasta su consumo por animales, los granos de cebada se encuentran expuestos a la contaminación con una gran variedad de microorganismos, entre ellos, los hongos filamentosos. El grado de contaminación depende de las condiciones climáticas a nivel de campo y de las condiciones de almacenamiento y procesamiento post-cosecha (Haikara, 1983; Schildbach, 1988). La contaminación de la cebada por hongos filamentosos causa pérdida de la calidad del producto, lo que conlleva a pérdidas económicas (Moss, 1991) y un riesgo sanitario para los consumidores del mismo, ya sean humanos o animales, debido al potencial de algunas especies fúngicas para producir micotoxinas, como las aflatoxinas, que son consideradas por la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer como un carcinógeno humano involucrado en el cáncer hepático primario (WHO, 1987). Las aflatoxinas B₁ y B₂ consumidas por animales, se metabolizan a aflatoxinas hidroxiladas con efectos tóxicos importantes, dichas aflatoxinas (M₁, P₁), pueden aparecer en la leche



proveniente de estos animales y productos derivados como el queso; Otras micotoxinas como la ocratoxina A y la zearalenona también pueden aparecer en tejidos animales de consumo humano.

Por estas razones y debido a que la producción de cebada en el estado de Hidalgo es una práctica extensa, principalmente para su uso como forraje para animales productores de leche y carne para consumo humano, se consideró pertinente efectuar un estudio de la micoflora contaminante y del contenido de aflatoxinas de granos de cebada en tres periodos: en el campo, durante la cosecha y después de tres meses de almacenamiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras analizadas

Se analizaron un total de 30 muestras de granos de cebada (*Hordeum vulgare*) pertenecientes a las variedades Esmeralda y Esperanza provenientes de la comunidad de Tlanalapa, perteneciente al municipio de Tepeapulco, Hidalgo. Las muestras correspondían a la cosecha de invierno del 2004 y provenían de diez productores diferentes. Se recolectaron 10 muestras, una por cada productor, en tres periodos distintos de recolección: a) 1 mes previo a la cosecha (muestras PC), b) durante la cosecha, estas muestras se recolectaron directamente de la máquina trilladora (muestras TRILL) y c) después de tres meses de almacenamiento (muestras ALM) bajo las condiciones habituales de almacén de cada uno de los productores.

Recuento de Mohos y Levaduras. Se pesaron 10 gramos de cada muestra de granos de cebada, a continuación, cada muestra fue diluida en una proporción 1:10 en solución salina con Tween 80 y homogeneizada en el Stomacher (Stomacher 400, Circulator, Seward, Inglaterra) durante 2 minutos. Esta dilución se consideró la primera dilución decimal, a partir de la cual se efectuaron 4 diluciones sucesivas utilizando el mismo diluyente. Se sembró 0.1 mL de cada una de las diluciones de cada muestra, por duplicado, en placas Petri con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), medio de cultivo recomendado en la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, mediante la técnica de siembra en superficie. Todas las placas sembradas fueron incubadas durante 5-7 días a 25°C. Transcurrido este tiempo se procedió al recuento de todas las colonias de mohos y levaduras crecidas. Las placas utilizadas para llevar a cabo el recuento fueron aquellas que contenían entre 10 y 300 colonias. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (ufc/g).



Aislamiento de colonias fúngicas. Una vez efectuado el recuento, se procedió al aislamiento de cada una de las colonias de hongos que a simple vista se observaron diferentes. Para ello, se utilizaron placas de Petri con los medios agar extracto de malta (MA) y agar Czapek (CZ). Se depositó un inóculo de esporas al agar y se incubó durante 2-7 días a 25 °C. Se realizaron las resiembras necesarias para obtener cultivos puros.

Identificación de colonias fúngicas. La identificación de las colonias fúngicas se llevó a cabo a través de sus características macroscópicas y microscópicas. El estudio macroscópico se llevó a cabo a simple vista, observando la morfología y la forma de crecimiento de las colonias. Inmediatamente, se procedió a realizar el estudio microscópico. La preparación de la muestra se efectuó según la técnica de la cinta adhesiva (Rodríguez-Tudela y Aviles, 1991), la cual consiste en aplicar una porción de cinta adhesiva transparente sobre la superficie de la colonia y pegarla posteriormente, por presión, sobre un portaobjetos en el que previamente se ha colocado una gota de azul de metileno.

Para la identificación y clasificación de los hongos, se ha utilizado el tratado de Von Arx (1981) como criterio básico, aunque también se han consultado el manual de Raper y Fenell (1965) y los tratados de Barnett y Hunter (1972) y Samson y colaboradores (2000).

Extracción y determinación de aflatoxinas. La extracción de las aflatoxinas se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el kit comercial utilizado para su determinación (R-biopharm, RIDASCREEN FAST Aflatoxinas totales): se pesaron 5 gramos de cada una de las muestras molidas (Molinillo Micromill, Cienceware-Bel-Art Products, USA), se agregaron 25 mL de metanol (grado analítico, Técnica Química, High Purity de México, S.A.) al 70%, se agitó vigorosamente durante 3 minutos, se filtró con papel filtro Whatman No 1, se diluyó 1 mL del filtrado con agua destilada, se utilizaron 50 µl de este extracto diluido por micropozo en la prueba. La determinación del contenido de aflatoxinas totales se llevó a cabo siguiendo el procedimiento establecido en el inmunoensayo enzimático.

Resultados

Recuentos totales de mohos y levaduras. El 70% de las muestras PC presentó crecimiento fúngico aparente, en proporciones que variaban desde aproximadamente el 5 hasta el 20% de los granos enmohecidos. Los recuentos totales individuales de las muestras analizadas se encontraron en el rango de 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colonia por gramo (ufc/g). Los recuentos de mohos se encontraron en un rango de 10^3 a 10^5 ufc/g, mientras que los recuentos de levaduras recayeron en un rango de 10^4 a 10^6 ufc/g (tabla 1).



Con respecto a las muestras TRILL, se observó que el 100% de las muestras analizadas presentaron contaminación fúngica aparente (aproximadamente 40-50% de los granos de las muestras se observaban enmohecidos). También presentaban abundantes restos de plantas, arbustos y paja. Los recuentos totales individuales de estas muestras se encontraron en el rango de 10^6 a 10^7 unidades formadoras de colonia por gramo (ufc/g), siendo más elevados que los recuentos totales efectuados un mes antes. Esto fue debido a un aumento en el crecimiento de levaduras (10^6 a 10^7 ufc/g). Los recuentos de mohos se mantuvieron en el rango encontrado en las muestras PC (10^3 a 10^5 ufc/g). Con relación a las muestras ALM, el 100% presentó contaminación fúngica aparente (aproximadamente 40-50% de los granos se observaban enmohecidos) y al igual que las muestras TRILL, presentaban abundantes restos de plantas, arbustos, paja y en este caso, también se observó la presencia de restos de insectos muertos, tierra y piedras. Los recuentos totales individuales de estas muestras coincidieron con los de las muestras TRILL, mientras que se observó una disminución en los recuentos totales de mohos (10^3 - 10^4), debido quizá a una competencia entre estos y las levaduras (10^6 - 10^7). En general, los recuentos totales de las muestras analizadas, fueron un reflejo del grado de contaminación por levaduras pues en todos los casos, excepto en una muestra PC, donde el recuento de levaduras (8.4×10^4) fue menor que el de mohos (2.5×10^5), los recuentos de levaduras fueron mayores que los recuentos para mohos.

Géneros fúngicos aislados. Se aislaron 12 géneros fúngicos en las distintas muestras de cebada analizadas: *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Ulocladium* spp., *Epicoccum* spp., *Trichoderma* spp., *Curvularia* spp., *Aureobasidium* spp. y *Mycelia sterilia*. Se calculó la frecuencia de cada género aislado como el número de muestras en que estuvo presente el género sobre el total de muestras analizadas por 100. El género *Cladosporium* spp. estuvo presente en todas las muestras analizadas (PC, TRILL y ALM). En cuanto a las muestras PC, los géneros aislados con mayor frecuencia fueron *Cladosporium* spp. (100%), *Alternaria* spp. (50%), *Mycelia sterilia* (50%) y *Penicillium* spp. (40%), para las muestras TRILL, los géneros predominantes fueron *Cladosporium* spp. (100%), *Mycelia sterilia* (80%), *Fusarium* spp. (70%) y *Alternaria* spp. (60%); en las muestras ALM, se observó que los géneros aislados más frecuentemente fueron *Cladosporium* spp. (100%), *Fusarium* spp. (100%), *Mycelia sterilia* (100%), *Alternaria* spp. (50%) y *Aspergillus* spp. (33%).



Géneros fúngicos potencialmente toxigénicos aislados. Los géneros potencialmente micotoxigénicos aislados en las muestras de cebada analizadas fueron *Fusarium* spp., *Penicillium*, spp. y *Alternaria* spp. en las muestras PC, *Fusarium* spp., *Penicillium*, spp., *Alternaria* spp. y *Aspergillus* spp. para las muestras TRILL y *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. y *Alternaria* spp.

Contenido de aflatoxinas totales en las muestras. El límite de detección del método inmunoenzimático utilizado para la cuantificación de las aflatoxinas totales presentes en las muestras es < 1.7 ppb. Todas las muestras presentaron concentraciones de aflatoxinas totales entre 1.5 y 1.7 ppb. Las concentraciones más bajas correspondieron a las muestras PC, mientras que las concentraciones más elevadas correspondieron a las muestras ALM.

Discusión

La microflore encontrada en las muestras de cebada analizada contiene dos grupos de géneros ecológicamente definidos como hongos de campo y de almacenamiento (Christensen & Kaufmann, 1969). El primer grupo estaba constituido fundamentalmente por: *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. y *Ulocladium* spp. y el segundo por *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.

Estudios similares en otras partes del mundo que concuerdan con estos resultados, muestran que los principales géneros fúngicos, a nivel de campo y almacenamiento, que contaminan los granos de cebada pertenecen a los géneros *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Fusarium* spp., *Ulocladium* spp., *Penicillium* spp. y *Rhizopus* spp. (Flannigan & Healy, 1983; Hashem, 1990; Lacey et al. 1991). En concordancia con los resultados de nuestro estudio, una investigación entre distintos laboratorios de Sudáfrica reveló que los principales mohos en granos de cebada analizados fueron: *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. y *Cladosporium* spp. dentro del grupo de hongos de campo y *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. dentro del grupo de hongos de almacenamiento (Rabie & Luben, 1994). Christensen & Kauffman (1969) observaron que, en el momento de la cosecha, los granos no eran colonizados en gran medida por hongos de almacenamiento. En cambio, luego de seis semanas de almacenamiento se encontró que los granos de cebada eran invadidos por *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. En nuestro trabajo, el género *Aspergillus* spp. también se observó como un género predominante en las muestras analizadas después de tres meses de almacenamiento. El género *Alternaria* spp. fue aislado en el 50-60% de las muestras analizadas (PC, TRILL y ALM) en este trabajo. El género



Alternaria spp. y en particular *A. Alternata*, es considerada como una de las especies fúngicas contaminantes de los granos de cebada en el mundo (Marasas et al. 1990). Diversos autores han reportado la presencia de especies de *Fusarium* spp. aisladas de cebada (Ichinoe et al. 1985, Sayer & Lauren 1991). El género *Fusarium* spp. es un patógeno de cereales ampliamente distribuido en el mundo. La infección se produce cuando coinciden condiciones ambientales húmedas con un periodo de receptividad del huésped por el patógeno durante y enseguida de la floración (Sutton, 1982). En el presente estudio se pudo observar que la frecuencia de aislamientos de *Fusarium* spp. en las muestras analizadas aumentó considerablemente después de tres meses de almacenamiento (de 20% en las muestras PC hasta el 100% en las muestras ALM).

Dentro del grupo de hongos de almacenamiento de encontraron fundamentalmente *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.. La fuente de inóculo la constituyen principalmente las capas superficiales del suelo, partes vegetativas de la planta de cebada y posterior almacenaje en contenedores contaminados (Flannigan, 1978).

Con respecto a las especies micotoxigénicas aisladas se puede considerar que la frecuencia de aislamientos fueron elevadas (*Fusarium* spp. 20, 70 y 100%; *Penicillium* 40, 30 y 0%, *Alternaria* spp. 50, 60 y 50% y *Aspergillus* spp. 0, 20 y 33% para muestras PC, TRILL y ALM, respectivamente). El perfil de micotoxinas que surge de estos géneros es amplio y algunas de ellas deberían ser tenidas en cuenta a la hora de realizar cualquier análisis. Si bien el tipo de contaminación y micotoxinas presentes dependen de muchos factores, micotoxinas tales como el ácido tenuazónico, desoxinivalenol, T-2, zearalenona, aflatoxinas y ocratoxinas, podrían llegar a ser importantes en los granos de cebada con el consiguiente riesgo sanitario que esto representa para la salud humana y animal.

Bibliografía

- BETINA, V. (1984). Mycotoxins: Production, isolation, separation and purification. Developments in Food Science, Vol. 8. Ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- CHRISTENSEN, C. M. & KAUFMANN, H. H. (1969) Grain storage: The role of fungi in quality loss. University of Minnesota Press, Minneapolis, MN.
- FLANNIGAN, B. & HEALY, R. E. (1983) The mycoflora of barleys accepted and rejected for malting. Journal of the Institute of Brewing, 89: 341-343.
- FLANNIGAN, B. (1978) Primary contamination of barley and wheat grain by storage fungi. Transaction of the British Mycological Society, 71: 37-42.



- FRISVAD, J.C. & SAMSON, S.A. (1992). Filamentous fungi In foods and feed: ecology, spoilage and mycotoxin production. In Arora D.K., Mukerji K.G., Marth E.H. (Editores): Handbook of applied mycology. Vol. 3. Foods and Feeds. New York: Marcel Dekker Inc. pp 31-68.
- HASHEM, A. R. (1990) Fungal flora of barley seed in Saudi Arabia and its control. Journal of Food Protection, 53: 786-789.
- ICHINOE, M., UCHIYAMA, S., AMANO, R. & KURATA, H. (1985) Trichothecene-producing *Fusarium* in barley and wheat in Japan. En *Trichothecene and Other Mycotoxins*, J. LACEY, (ed. Wiley), New York, p. 21-31.
- JARVIS, B. & WILLIAMS, A.P. (1987). Methods for detecting fungi in foods and beverages. En "Food and beverage mycology". Ed. Beuchat, L.R. AYIN-N. York. pp: 599-636.
- LACEY, J., RAMAKRISHNA, N., HAMER, A., MAGAN, N. & MARFLEET, I. C. (1991) Grain fungi. En *Handbook of Applied Mycology*, Vol. 3: Food and Feeds, (ed. D. K. Arora, K. G. Mukerji & E. H. Marth), Marcel Dekker, Inc., p. 121-177.
- MARASAS, W. F. O., Van WYK, P. S. & JACOBS, G. (1990) Black-point of barley: colonisation of trichomes by *Alternaria alternata*. *Phytophylactica*, 22: 251-253.
- NORTHOLT, M.D. & Van EGMOND, H.P. (1982). Contamination of ripening cheeses with *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin. In: *Proceedings of a fourth meeting on mycotoxins in animal disease*, 1-3 april 1981, Weybridge. Pepin, G.A; Patterson, D.S.P. and Gray, D.E. (editors). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Alnwick, Northumberland. pp:90-92.
- RABIE, C. J. & LUBBEN, A. (1994) Enumeration of fungi in barley grain. A collaborative study. En *Third International Workshop on Standardization of Methods for the Mycological Examination of Foods*, Copenhagen, Denmark.
- RODRIGEZ-TUDELA, J.L. AND AVILES, P. (1991). Improved adhesive method for microscopic examination of fungi in culture. *J.Clin. Microbiol.* 29:2604-2605.
- SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. & FILTENBORG O. 2000. *Introduction to food and airborne fungi*. Sixth edition, CBS, The Netherlands.
- SAYER, S. T. & LAUREN, D. R. (1991) *Fusarium* infection in New Zealand grain. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 19: 143-148.
- SUTTON, J. C. (1982) Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Plant Pathol.*, 4: 195-209.



VON ARX, J.A. (1981). The genera of fungi sporulating in pure culture. Cramer, J. (Editor), 3rd. edition, Vaduz, Germany.

WHO- World Health Organization- (1987). Suppl. 1, IARC Monograph On The Evaluation Of Carcinogenic Risk To Humans, Lyon, France. p. 82.