

# METODOLOGIAS PARA LA IDENTIFICACION DE ESPECIES DE HONGOS EN GRANOS BASICOS ALMACENADOS

Patricia Rebutel A.  
Técnico en Microbiología Industrial de Alimentos  
José Olavarría M.  
Ingeniero Agrónomo  
Programa Postcosecha, Estación Experimental La Platina, INIA

## 1. INTRODUCCION

El deterioro por hongos es una de las causas de reducción de la calidad de los granos de cereales provocando severas pérdidas económicas.

Los hongos que invaden a granos y semillas se les ha separado en dos grupos y se les ha denominado "Hongos de campo" y "Hongos de almacén". La principal diferencia entre ambos son los requerimientos de humedad que necesitan para desarrollarse. Los hongos de campo requieren de humedades relativas de 95-100 por ciento, en cambio los hongos de almacén pueden crecer con humedades relativas de 65-90 por ciento, condiciones que se encuentran con frecuencia en el almacenamiento de los granos (E. Moreno, 1986).

Durante los últimos años se le ha prestado bastante atención al estudio del deterioro que sufren los granos almacenados ocasionado por los llamados hongos de almacén, los que además de contribuir al deterioro de los granos y semillas durante el almacenamiento son capaces de producir potentes toxinas o micotoxinas que pueden afectar la salud animal o humana (G. García, 1987).

Las micotoxinas son producidas por cepas toxigénicas de hongos bajo ciertas condiciones de humedad, temperatura y nutrientes que aún no se han definido y que no están directamente relacionadas con los requerimientos que el hongo necesita para desarrollarse (Bergqvist, E. y Rebuffel, P., 1986).

Entre los géneros de hongos productores de micotoxinas se encuentran *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., y *Penicillium* sp. (Yolanda Paz de la Vega, 1986).

La identificación de las especies de estos géneros es una necesidad prioritaria en el estudio de los problemas de almacenamiento de granos incluyendo los aspectos de contaminación con micotoxinas (G. García, 1987).

Los géneros *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. pertenecen al grupo de almacén, sin embargo, se ha encontrado que algunas especies de *Penicillium* sp. y *Aspergillus flavus* invaden al grano desde el campo (E. Moreno, 1986).

*Fusarium* sp. pertenece al grupo de los hongos de campo. Este género es más comúnmente encontrado en maíz. Si el ataque es muy severo puede prácticamente destruir al grano como ocurre en algunos casos con la pudrición de las mazorcas. Si el ataque es relativamente leve, este hongo permanece en la semilla sin afectarla aparentemente y ésta es la forma en que muchos hongos son transmitidos por semillas de un ciclo a otro (E. Moreno, 1986).

En el caso de los granos almacenados, *Fusarium* permanece en latencia, pues la humedad de almacenaje no le permite desarrollarse.

Los géneros de hongos que invaden a los granos son relativamente pocos, por ejemplo en maíz se han reportado unos 13, y la mayoría de estos están representados en los granos por una sola especie, entonces la identificación del género es suficiente para identificar la especie con razonable certeza. Las excepciones son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (E. Moreno, 1986).

El género *Aspergillus* ha sido arreglado en grupos separados en base al color de las colonias y a las características morfológicas de éstas. Los colores de los grupos son bastantes estables, lo que ha facilitado la identificación. En cambio la identificación de los géneros *Penicillium* y *Fusarium* no ha sido fácil. El principal problema que presenta la identificación de estos géneros es la capacidad que tienen para cambiar, principalmente el género *Fusarium*. Esta gran variabilidad ha conducido a identificaciones erróneas (G. García, 1987).

Estos problemas pueden disminuirse en gran parte estandarizando el medio de cultivo y fundamentalmente trabajando con cultivos monospóricos, de modo que la identificación puede realizarse con relativa facilidad (Booth, 1971).

Dentro de las líneas de investigación que está realizando el Programa de Postcosecha del INIA, está el estudio de las poblaciones fungosas en granos básicos, principalmente en trigo, arroz y maíz.

Esta línea de investigación orienta en forma preliminar a la detección e identificación del problema de hongos que atacan granos básicos existente en Chile, cuáles de estos granos son los más afectados y en qué etapa dentro del sistema postcosecha.

## 2. MATERIALES Y METODOS

Con el fin de conocer la contaminación inicial del grano se efectuaron recuentos en granos recién cosechados, para ello se obtuvieron muestras de campo: de planta en pie para el caso de maíz y para trigo y arroz se muestreó en la recepción de algunas plantas de acopio.

Para identificar la población de hongos de almacén se realizaron muestreos en bodegas y silos de plantas almacenadoras.

Todas estas muestras fueron acondicionadas en el laboratorio, es decir, se eliminaron las impurezas, se homogenizaron y se dividieron para obtener una muestra representativa de lo que llegó al laboratorio, además se midió la humedad en terreno y en el laboratorio.

Con este material se realizó el llamado **análisis micológico**; la metodología que se utiliza para la aislación de hongos consiste básicamente en contar 50-100 granos al azar, se desinfectan superficialmente con hipoclorito de sodio al 2 por ciento durante tres minutos y se depositan sobre el medio de cultivo repartidos en cinco placas.

El medio de cultivo utilizado es Agar Malta más sal (NaCl) al 5 por ciento. La sal se agrega con varios fines: para evitar la germinación de los granos, aumentar la presión osmótica en el medio de cultivo y para evitar en alguna medida la contaminación, principalmente por *Rhizopus* spp.

Luego estas placas son incubadas en estufa a 24°C durante cinco a siete días.

El recuento se realiza por género y especie de los hongos desarrollados en cada grano (Figura 1). Si un grano está invadido por varios hongos, se contabiliza como contaminado nuevamente. El resultado se expresa en porcentaje de granos invadidos por los distintos géneros o especies.

La identificación de especies de los géneros más importantes en granos almacenados se ha venido realizando desde 1986 para el caso de *Aspergillus* y desde 1987 para *Fusarium* y *Penicillium*.

Antes de comenzar la identificación de las especies de *Fusarium* y *Penicillium* es necesario purificar las cepas aisladas bajo los siguientes métodos:

### 2.1 METODOLOGIA PARA LA PURIFICACION DE *FUSARIUM*

Para la identificación del género *Fusarium* el Programa de Postcosecha del INIA ha estado utilizando la clave de Booth (Booth, 1971), el cual sugiere la estandarización de los medios de cultivo y sus claves están basadas en cultivos de Agar Papa Sucrosa.

#### Procedimiento

De un aislamiento de *Fusarium* se toma una asada de conidios con una aguja muy fina y se depositan en una gota de agua destilada esteril que previamente fue colocada en un portaobjeto esterilizado hasta que ésta se llene de conidios (esto se puede realizar bajo lupa).

Luego esta gota se toma con un asa de microbiología y se siembra en estrías en Agar Papa Sucrosa, finalmente se incuba a 24°C durante 72 horas.

Una vez obtenidas colonias aisladas y puras se toma un inóculo de este cultivo y se vuelve a sembrar en Agar Papa Sucrosa, se dejan a temperatura ambiente durante 4 días, tiempo adecuado para iniciar la identificación de especies.

### 2.2 METODOLOGIA PARA LA PURIFICACION E IDENTIFICACION DE *PENICILLIUM*

De los aislamientos de *Penicillium* obtenidos desde granos, se toma una asada de conidios, se siembran en 3 puntos en Agar Extracto de Malta (MEA) y se incuban a 24°C hasta obtener colonias bien formadas.

Luego de estos cultivos se vuelve a tomar una asada de conidios y se depositan en un tubo de 10 ml que contiene 0,2 por ciento de Agar y 0,5 por ciento de detergente, dejando cuidadosamente una cierta cantidad de conidios. El resto de conidios que quedaron en el asa se siembran en 2 puntos en Agar Czapek autolizado de levadura (CYA) la que será incubada a 5°C durante siete días.

Con un asa de microbiología se agita violentamente el inóculo dejado anteriormente en el tubo y se toman 3 gotas sembrándolas en 3 puntos en CYA, en MEA y en 62,5 (Agar 25 por ciento glicerol-nitrato), estos cultivos se dejan en el laboratorio a temperatura ambiente durante siete días. Por último se toma la cuarta gota y se siembra en 2 puntos en CYA, la que se incuba a 37°C durante el mismo tiempo.

### 3. RESULTADOS

El 98 por ciento de las muestras de maíz analizadas estaban contaminadas con *Fusarium moniliforme* (Figuras 2 y 3), el 2 por ciento restante estaban contaminadas con *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium sporotrichioides*.

En arroz y trigo *Fusarium* no es significativo, sin embargo, se ha aislado también *F. moniliforme* en una muestra de arroz recién cosechada y otra en trigo de bodega que llevaba 15 días de almacenado.

CUADRO 1. Secuencia numérica de la clave de Booth para algunas especies de *Fusarium*.

<i>Fusarium moniliforme</i>	1; 2; 3; 4
<i>F. moniliforme</i> var. <i>subglutinans</i>	1; 2; 3; 5; 14
<i>F. oxysporum</i>	1; 2; 3; 5; 6; 7; 10; 11; 12
<i>F. sporotrichioides</i>	1; 2; 3; 5; 14; 15

Con respecto a las especies del género *Aspergillus* que se han aislado con mayor frecuencia, éstas provienen de muestras tomadas desde bodegas y silos. Sólo en pocos casos se ha aislado *Aspergillus flavus* en muestras que provienen de campo, además en la literatura se señala que hasta un 5 por ciento de las muestras que provienen de campo se ha aislado este género (Christensen C.M. y H.H. Kaufmann, 1976).

Se puede afirmar con bastante certeza que si se aíslan algunas especies de *Aspergillus* en muestras de grano que se supone son recién cosechados, entonces es casi seguro que ese grano está mezclado con otro que ya tenía algún tiempo de almacenaje.

El 100 por ciento de las muestras de maíz analizadas que provenían de bodegas y silos estaban contaminadas con *Aspergillus glaucus*, un porcentaje menor estaba contaminado con *A. ochraceus* (Figura 4), *A. flavus* y *A. tamarii*.

Con respecto a trigo y arroz también es frecuente aislar *A. glaucus* (Figura 5), sin embargo, las proporciones en comparación con maíz son mucho menores. En estos granos permanece por mucho más tiempo la población inicial, es decir, los hongos de campo, como es el caso de *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp. y *Epicoccum* sp. Los hongos de almacén comienzan a desarrollarse cuando las condiciones de humedad relativa del ambiente aumentan, por lo tanto, la humedad del grano aumenta también y esto ocurre en los meses de invierno. Luego el grano vuelve a secarse en los meses de primavera y los hongos de almacén detienen su desarrollo, esto es la típica secuencia de un almacenaje en bodega y en grano ensacado.

A continuación se describen las características morfológicas más importantes de las especies del género *Aspergillus* que se han aislado con mayor frecuencia en granos almacenados:

*Aspergillus glaucus*: cabezuelas radiadas variables en tamaño, de color verde-azul a verde-oliva, es osmofílico, presenta cleistotecios de color amarillo en la mayoría de las especies.

*Aspergillus flavus*: cabezuelas de color amarillo-verdoso, pueden ser columnares a radiadas, posee esterigmas en una o dos series predominando las dos series (Figura 6).

*Aspergillus ochraceus*: cabezuelas de color ocre, rugosas columnares a radiadas, posee esterigmas en una o en dos series predominando las de una serie (Figura 4).

*Aspergillus tamarii*: cabezuelas radiadas de color amarillo en un comienzo y luego se torna café oscuro, éste pertenece al grupo *flavus*.

*Aspergillus terreus*: cabezuelas con cadenas de conidios formando una columna compacta de color avellano o canela (Figura 7).

*Aspergillus ruber*: este pertenece al grupo glaucus. Sus colonias tienen una fuerte coloración roja o anaranjada, presenta cleistotecios de color amarillo o naranja, cabezuelas de color verde opaco en forma globosa o radiada (Figura 8).

*Aspergillus candidus*: cabezuelas siempre de color blanco de forma globosa o radiada, colonias compactas (Figura 9).

Con respecto al género *Penicillium* se han aislado y purificado aproximadamente 90 cepas, que requieren de un trabajo exclusivo para su identificación.

*Penicillium* presenta coloraciones de colonias siempre verdes o en tonos de verde, pueden presentar exudaciones sobre la colonia o en algunos casos pigmentación al reverso de esta.

Es muy frecuente aislarlo en granos almacenados, aunque es considerado hongo de almacén, también se ha aislado en granos recién cosechados, esto puede indicar que existen especies que se desarrollan en condiciones de campo.

Existen otros géneros de hongos de campo que también se han aislado con frecuencia, principalmente en arroz y trigo son: *Alternaria*, *Cladosporium* y *Epicoccum*. Estos se aislaron desde muestras que se tomaron en la recepción de plantas de acopio y éstos sólo se reportan como género.

#### 4. BIBLIOGRAFIA

---

- BERGQVIST, E. y Rebuffel, P. 1986. Hongos en ingredientes y concentrados alimenticios en Encuentro Nacional sobre Micotoxinas y Micotoxicosis en el Sector Agropecuario. Tomo I. INIA-PNUD-FAO CHI/83/006. Santiago, Chile.
- BOOTH, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew Surrey. England. 237 págs.
- CHRISTENSEN, C.M. y H.H. Kaufmann. 1976. Contaminación por hongos en granos almacenados. Centro Regional de Ayuda Técnica. AID. Traduc. por E. Moreno M. Ed. Pax. México.
- CHRISTENSEN, C.M. y D.B. Sauer. 1982. "Microflora" en Storage of Cereal Grains and their Products. Chapter 7. Ed. C.M. Christensen. American Association of Cereal Chemists, Inc.
- DE LA VEGA, Y.P. 1986. "Características químicas y metabólicas de las micotoxinas" en Encuentro Nacional sobre Micotoxinas y Micotoxicosis en el Sector Agropecuario. Tomo 1. Conferencias. pág. 9-11. Documento de Campo N° 5. Proyecto INIA/PNUD/FAO CHI/83/006. Santiago, Chile.
- GARCIA, G. 1987. Informe sobre consultoría en hongos y micotoxinas. Documento de Campo N° 22. Proyecto INIA/PNUD/FAO CHI/83/006. Santiago, Chile.
- MORENO, M.E. 1986. "Guía para el aislamiento e identificación de hongos en granos almacenados y sus derivados" en Informe sobre consultoría en hongos en granos almacenados. Documento de Campo N° 6. Proyecto INIA/PNUD/FAO CHI/83/006. Santiago, Chile.

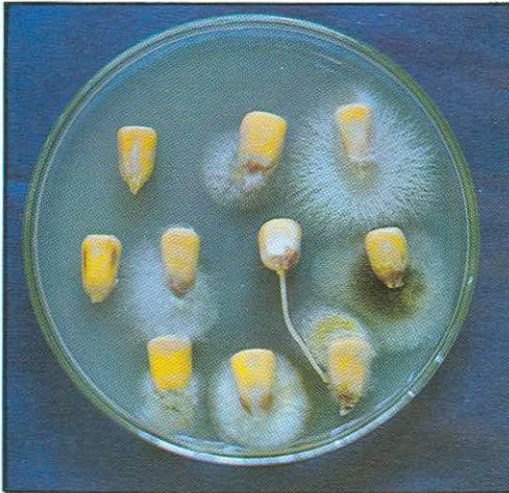


Figura 1. Granos de maíz en medio de cultivo después del período de incubación.



Figura 2. Cadenas de microconidios de *Fusarium moniliforme*.



Figura 3. Colonias de *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. en grano de maíz.

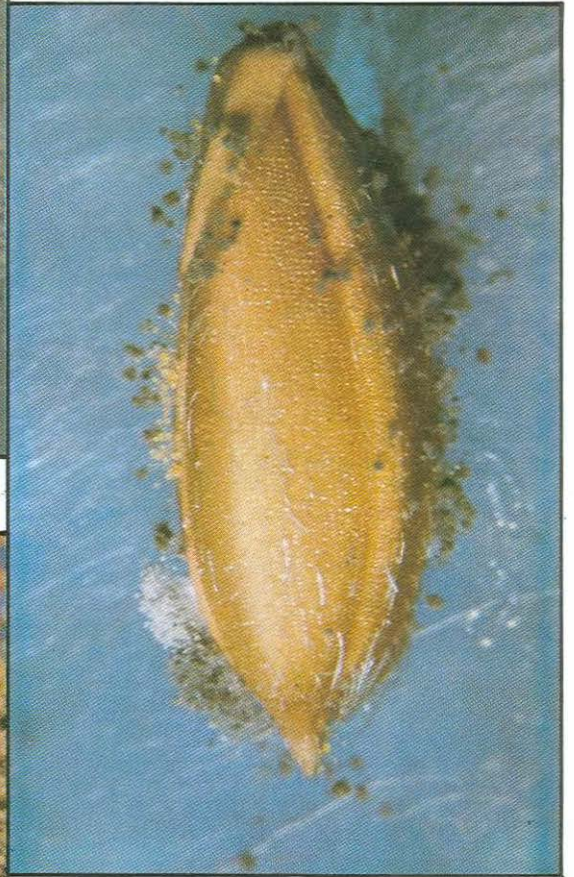


Figura 5. Colonias de *Aspergillus glaucus* en grano de arroz.

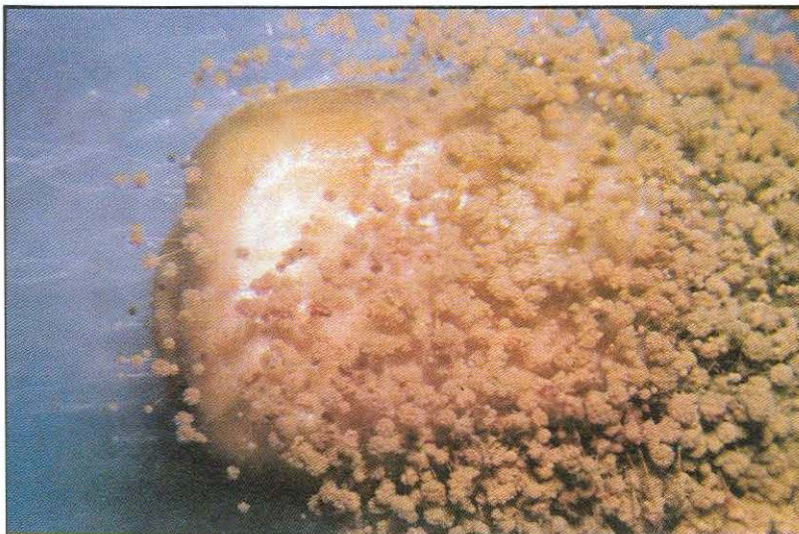


Figura 4. Colonias de *Aspergillus ochraceus* desarrolladas en grano de maíz.



Figura 6. Colonias de *Aspergillus flavus* en grano de trigo.



Figura 7. Conidióforos de *Aspergillus terreus* en grano de arroz.

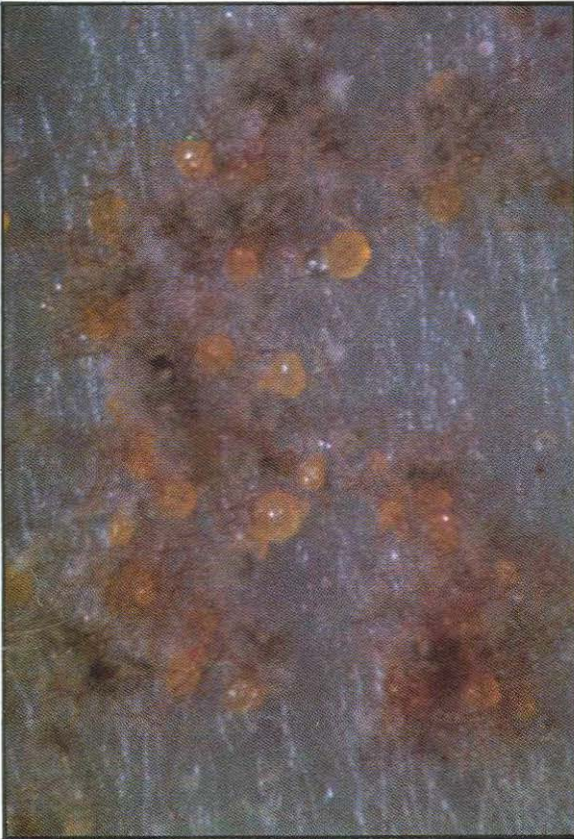


Figura 8. Colonias de *Aspergillus ruber*.



Figura 9. Colonias de *Aspergillus candidus* en grano de arroz.