

ANÁLISIS MICOLÓGICO DE GRANOS DE SORGO DULCE

por Genoveva García Aguirre y
Rebeca Martínez Flores

MYCOLOGICAL ANALYSIS OF GRAIN SORGHUM**SUMMARY**

Fourty- four samples of imported grain sorghum supposedly contaminated with zearalenone were analyzed in order to know the contaminating mold profiles. The predominating mold was *Alternaria alternata*, with 1575 isolates, *Aspergillus* and *Fusarium* species were also abundant. Other mold genera with species capable of producing mycotoxins, as well as 635 bacteria colonies, were also isolated.

RESUMEN

Cuarenta y cuatro muestras de un lote de sorgo dulce importado, sospechoso de estar contaminado con zearalenona, fueron analizadas para conocer los niveles de mohos contaminantes. El predominante fue *Alternaria alternata*, con 1575 aislamientos; asimismo, fueron abundantes algunas especies de *Fusarium* y *Aspergillus*. También fueron aislados otros géneros, algunas de cuyas especies son capaces de producir micotoxinas, así como 635 colonias de bacterias.

INTRODUCCIÓN

Un aspecto importante que debe ser considerado para controlar la calidad del grano de sorgo es la presencia de mohos, algunos de los cuales dañan al embrión o reducen la calidad del endospermo, traduciéndose esto también en semillas quebradizas que no se pueden almacenar adecuadamente. Algunos de los mohos que invaden al grano de sorgo pueden además producir micotoxinas, tanto durante el desarrollo del grano en el campo como durante su almacenamiento (Doggett, 1988).

De los mohos más importantes que dañan al grano de sorgo, *Fusarium moniliforme*, *F. semitectum* y *Curvularia lunata* están reconocidos a nivel internacional, y se sabe que algunas líneas de este grano resistentes a *Fusarium* y *Curvularia* pueden ser atacadas por *Phoma* (Doggett, 1988). A pesar de que la información sobre la presencia de micotoxinas en grano de sorgo es escasa, se sabe que algunos

* Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM., Apartado Postal 70-233, Del. Coyoacán, 04510 México, D.F.

de los mohos mencionados, y otros que lo invaden también en el campo o durante su almacenamiento, pueden producir varias micotoxinas, incluidas las aflatoxinas, la zearalenona y las ocratoxinas, que han sido implicadas como causantes de problemas veterinarios, por lo que la presencia de micotoxinas en grano de sorgo representa un peligro potencial para los animales, ya que la mayor parte de este grano se usa para la alimentación de ganado.

Debido a los posibles efectos adversos que el grano de sorgo contaminado con micotoxinas pudiese tener en el ganado, se han hecho varios estudios para conocer la incidencia de micotoxinas en este grano en condiciones naturales. Shotwell *et al.* (1969) no pudieron confirmar aflatoxinas en ninguna de las 533 muestras de sorgo comercial que analizaron; Stoloff (1976) reportó niveles de 13 y 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de aflatoxinas en 2 de 66 muestras de sorgo comercial en un estudio de la Food and Drug Administration, EUA y un promedio de aflatoxina B1 de 152 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en 23% de 69 muestras en Uganda. Schroeder y Hein (1975) identificaron zearalenona en dos muestras de grano de sorgo con tizón de panoja, y los aislamientos de *Fusarium* de las mismas muestras también produjeron la toxina en el laboratorio. Seitz *et al.* (1975 a,b) y Sauer *et al.* (1978) encontraron que el alternariol y el monometil éter de alternariol podían ser confundidos con aflatoxinas y zearalenona en los análisis de sorgo en mal estado invadido por *Alternaria*. Además, encontraron correlación entre los metabolitos de *Alternaria* que determinaron y el grado de manchado del grano; no encontraron evidencia de toxicidad de alternariol, monometil éter de alternariol y alternueno en ratas y pollos, pero dos aislamientos de *Alternaria*, que también produjeron ácido tenuazoico y altertoxina I fueron letales para los mismos animales experimentales. Rukmini y Bath (1978) pudieron determinar toxina T2 contaminando grano de sorgo en forma natural. Shotwell *et al.* (1980) analizaron 197 muestras de grano de sorgo provenientes de 10 estados de EUA y encontraron zearalenona en 28% del total de las muestras, en niveles de 200 a 6900 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; la confirmación de la toxina fue hecha por cromatografía de gases- espectrometría de masas en los derivados trimetilsilil; no detectaron ocratoxinas pero sí aflatoxinas en 4 muestras, en niveles de 54, 6, 10 y 7 μg de aflatoxinas totales/Kg, mismas que se confirmaron mediante la formación del aducto acuoso en las placas de cromatografía de capa fina.

En México ha habido reportes alarmantes sobre la presencia de aflatoxinas y zearalenona en grano de sorgo dulce, particularmente en algunos lotes importados, reportes que han resultado exagerados y en ocasiones definitivamente falsos (García y Martínez, 1991). Lo anterior se debe a que sustancias como el alternariol y monometil éter de alternariol tienen patrones de migración en las placas de cromatografía de capa fina y colores de fluorescencia en luz ultravioleta que pueden ser confundidos con zearalenona y aflatoxinas si no se hacen las pruebas confirmatorias pertinentes. (Shotwell *et al.*, 1969; Seitz *et al.*, 1975b).

Debido a lo anterior, y a que algunas muestras de lotes de sorgo dulce importado, reportados como altamente contaminados con zearalenona, resultaron en nuestros análisis con una incidencia baja (15% del total de las muestras) y con niveles bajos de la toxina (33- 200 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) (García y Martínez, 1991), el objetivo del presente trabajo fue determinar los mohos presentes en esas muestras para evaluar la posibilidad de futuras investigaciones sobre micotoxinas y micobiota en este grano.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: Fueron estudiadas 44 muestras de sorgo dulce de importación provenientes de dos lotes diferentes.

Determinación de los mohos: De cada muestra fueron tomadas 200 semillas que fueron sembradas en cajas con malta- sal- agar (MSA) y papa- dextrosa- agar (PDA), 50 semillas por caja (Tuite, 1969). La purificación de los aislamientos fue hecha dependiendo del género, en PDA y solución de Czapeck- agar (Cz) (Tuite, 1969). La identificación de géneros se realizó con las claves de Barnett y Hunter (1972). Para la identificación de las especies, los medios y condiciones de cultivo fueron los sugeridos por los especialistas de cada género; para *Aspergillus* Raper y Fennell 1965), para *Penicillium* Pitt (1979), en el caso de *Fusarium* (Booth, 1971), para los dematiáceos Ellis (1971) y para los Mucorales Gilman (1957).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El más abundante de los mohos aislados en este estudio fue *Alternaria alternata*, 1575 aislamientos (853 en MSA y 722 en PDA, tabla 1), esta especie induce tizones y manchas foliares en sorgo en el campo, pero no está considerada como inductora de problemas de panoja en condiciones de campo normales (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1976); sin embargo, el género ha sido reportado asociado con grano de sorgo dañado, manchado y en muy malas condiciones debido al exceso de lluvia cerca o durante la época de la cosecha o porque que ha sido dejado en el campo durante el invierno (Seitz *et al.*, 1975); además, en estas mismas condiciones, también con la presencia de alternariol y su metil éter, (Sauer *et al.*, 1978, Seitz *et al.*, 1975a, b). *Alternaria* es un hongo ubicuo que incluye algunas especies patógenas de plantas y otras saprobias y está entre los que más comúnmente se encuentran contaminando alimentos. En una inspección de este género para conocer la incidencia de sus diferentes especies en granos de los llamados pequeños, Bruce *et al.*, 1984 encontraron *Alternaria* en 184 de 230 muestras, 74.6% del total de las especies fueron *A. alternata* en trigo, 85.3% en cebada y 71.8% en centeno.

En este estudio, la presencia de *Alternaria alternata* en las cantidades encontradas, 64% del total de las especies de mohos aislados, (figuras 1 y 2) y los resultados de un estudio previo García y Martínez, 1991 para detectar zearalenona y aflatoxinas, que con

Tabla 1. Microorganismos aislados de grano de sorgo

Microorganismo	núm. de aislamientos		
	PDA	MSA	Total
<i>Bacterias</i>	635	17	652
<i>Rhizopus stolonifer</i>	70	67	137
<i>Aspergillus amstelodami</i>	12	139	151
<i>A. ruber</i>	3	95	98
<i>A. niger</i>	12	4	16
<i>A. flavus</i>	10	16	26
<i>A. terreus</i>	1	6	7
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	1	0	1
<i>P. expansum</i>	0	2	2
<i>P. viridicatum</i>	0	5	5
<i>P. purpurogenum</i>	3	0	3
<i>Alternaria alternata</i>	722	853	1575
<i>Curvularia lunata</i>	53	36	89
<i>Cladosporium</i>	4	2	6
<i>Fusarium graminearum</i>	85	73	158
<i>F. oxysporum</i>	94	71	165
<i>Phoma</i>	5	22	27
<i>Pseudotorula</i>	5	3	8

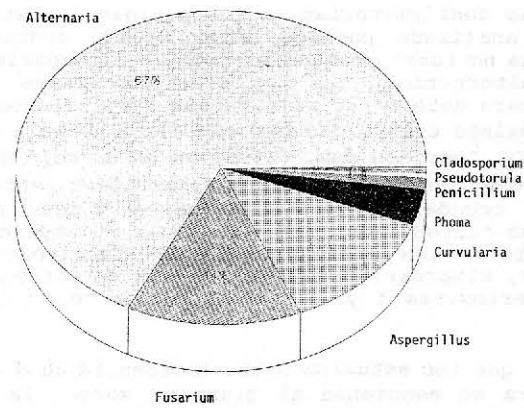


Fig.1. Géneros de hongos aislados de grano de sorgo

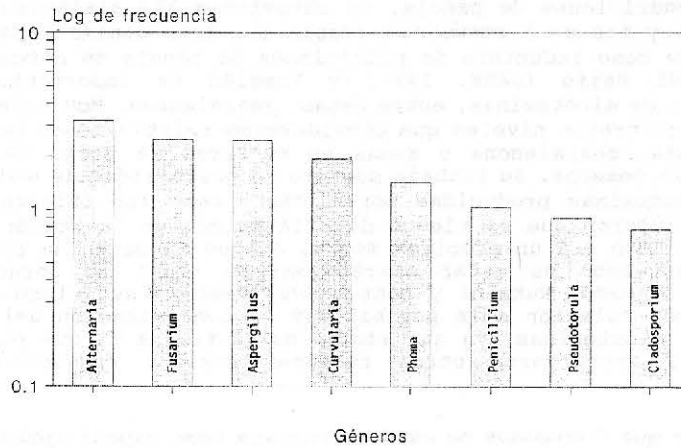


Fig. 2. Géneros de hongos aislados de granos de sorgo

las pruebas confirmatorias no fue posible demostrar, sugieren que el sorgo analizado pudiese haber estado contaminado con otras toxinas que no fueron buscadas, como el alternariol y el mono metil éter de alternariol, que han sido reportados al confundir los análisis para determinar aflatoxinas y zearalenona, o con otras de las micotoxinas producidas por *Alternaria* (Shotwell *et al.*, 1967; Seitz *et al.*, 1975). Logrieco *et al.* (1990) en un estudio de granos pequeños y maíz, provenientes de países mediterráneos, encontraron *A. alternata* en trigo, cebada, centeno y avena, y todas las cepas de esta especie que fueron inducidas a producir micotoxinas en condiciones de laboratorio las produjeron (ácido tenuizoico en las mayores cantidades, alternariol, monometil éter de alternariol, altenueno, y las altertoxinas I y II, simultáneamente en la mayoría de los casos).

A pesar de que los estudios sobre incidencia de *A. alternata* reportados hasta ahora no mencionan al grano de sorgo, la determinación de mohos de este estudio demuestran una gran cantidad de aislamientos de esta especie, lo que induce a pensar en la posibilidad de contaminación natural en condiciones favorables para la formación de micotoxinas, con una o más de las toxinas que este mocho produce, por lo que un riesgo micotoxígeno en sorgo no debe ser subestimado y las micotoxinas producidas por *Alternaria* deben ser consideradas.

Del género *Fusarium*, que es uno de los hongos más importantes que inducen pudriciones de panoja, se obtuvieron 323 aislamientos de *F. oxysporum* y 158 de *F. graminearum* (Tabla 1). Esta última especie es importante como inductora de pudriciones de panoja de sorgo en la región del Bajío (SARH, 1976) y también es importante como productora de micotoxinas, entre éstas, zearalenona. McMillian *et al.* (1983) encontraron niveles que consideraron relativamente bajos de aflatoxinas, zearalenona o ambas en muestras de grano de sorgo antes de la cosecha. Su trabajo sugiere la posibilidad de encontrar otras micotoxinas producidas por *Fusarium*, como los tricotecenos, pero concluyeron que el riesgo de aflatoxinas en la región en la que trabajaron era un problema menor, aunque no dejan de prevenir a los ganaderos de estar alerta con su grano de sorgo para alimentar ganado. Rukmini y Baht (1978) también sugirieron estar alerta con relación a la posibilidad de contaminación del sorgo con otras micotoxinas, ya que además de la toxina T2 que pudieron confirmar, encontraron otros factores tóxicos producidos por *Fusarium*.

A pesar de que *F. oxysporum* no está reconocida como especie productora de zearalenona o de tricotecenos, Joffe (1980) indujo con esta especie diferentes reacciones de sensibilidad en piel de conejo. De 236 aislamientos en diferentes temperaturas, 134 indujeron toxicidad moderada a 24°C, 54 fueron tóxicos y 7 muy tóxicos; a 30°C, 30 fueron tóxicos; estos datos conducen a especular que la presencia de esta especie pudiese representar problemas sanitarios. *Aspergillus* y *Penicillium*, algunas de cuyas especies son conocidas como

importantes productoras de micotoxinas tanto cuando la planta está en pie, en el campo, como cuando el grano está almacenado en condiciones desfavorables, fueron encontrados en cantidades variables, dependiendo del medio de cultivo usado para su aislamiento, aunque las especies de *Aspergillus* fueron más abundantes. De *Aspergillus flavus*, especie potencialmente productora de aflatoxinas, se obtuvieron 26 aislamientos, 151 de *A. amstelodami*, 98 de *A. ruber*, y 7 de *A. terreus* (Tabla 1); las tres últimas son especies conocidas como causantes de las llamadas pudriciones de almacén. También fueron encontrados 16 aislamientos de *A. niger*, que es un moho principalmente saprobio. Las especies de *Penicillium* aisladas fueron: *P. aurantiogriseum*, 1 aislamiento; *P. expansum*, 2; *P. viridicatum*, 5; *P. purpurogenum*, 3; especies reportadas como productoras de diversas micotoxinas (Tabla 1).

De los otros mohos aislados, (Tabla 1, fig. 1) *Phoma sorghina* puede producir ácido tenuazoico, que tiene diversos efectos adversos en animales experimentales, como pollos e incluso se ha sugerido que puede tener algún papel en la etiología del onylai, un desorden hemorrágico en humanos en África (Giambrone *et al.*, 1978; Steyn y Rabie, 1976) y otras especies pueden producir ergocromos y citocalasinas. *Curvularia* contiene especies que producen zearalenona y *Cladosporium* ha sido relacionado con la aleucia tóxica alimentaria y ácidos cladospóricos (Samuels, 1984).

Resulta por lo tanto importante hacer estudios más intensos con relación a la microbiota y las micotoxinas de materias primas como el sorgo, que son destinadas principalmente a la alimentación del ganado debido a las implicaciones económicas y sanitarias que éstas tienen y, sin dejar de tener cuidado con las mejor conocidas, prestar atención a aquellas micotoxinas poco estudiadas.

LITERATURA CITADA

- Association of Official Analytical Chemists, 1984. *Official Methods of Analysis*, 14a. ed. Chap. 26. Association of Official Analytical Chemists. Arlington.
- Barnett, H.L. y B.B. Hunter, 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 13a. ed. Burgess, Mineápolis.
- Booth, C. 1971, *The Genus Fusarium*. CMI, Kew.
- Bruce, V.R., M.E. Stack y P.B. Mislivec, 1984. Incidence of toxic *Alternaria* species in small grains from USA. *J. Food Sci.* 49: 1626- 1627.
- Doggett, H., 1988. *Sorghum*, 2a. ed. Longman Scientific & Technical, Nueva York.
- Ellis, M.B., 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. CMI, Kew.
- García Aguirre, G. y R. Martínez Flores, 1991. Problemas en la determinación de micotoxinas en grano de sorgo. *Anales Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. México, Ser. Bot.* 61: 43.
- Giambrone, J.J., N.D. Davis y U.L. Diener, 1978. Effect of tenuazonic acid on young chickens. *Poult. Sci.* 57: 1554- 1558.
- Gilman, J.C., 1957. *A Manual of Soil Fungi*. The Iowa State University Press, Ames.
- Joffe, A. Z., 1980. *Fusarium* as field, storage and soil fungi under semiarid conditions in Israel. In: Y. Ueno (ed.) *Trichotecenes. Chemical, Biological and Toxicological Aspects*. Elsevier, Amsterdam. pp 95- 101.
- Logrieco, A., A. Botalico, M. Solfrizzo y G. Mule, 1990. Incidence of *Alternaria* species in grains from Mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins. *Mycologia* 82: 501- 505.
- McMillian, W.W., D.M. Wilson, C.J. Mirocha y N.W. Widstrom, 1983. Mycotoxin contamination in grain sorghum from fields in Georgia and Mississippi. *Cereal Chem.* 60: 226- 227.
- Pitt, J.I., 1979. *The Genus Penicillium and its Teleomorphic States Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press, Londres.
- Raper, K.W. y D.I. Fennell. 1965. *The Genus Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Rukmini, C. y R.V. Bath, 1978. Occurrence of T2 toxin in *Fusarium* infested sorghum from India. *J. Agric. Food Chem.* 26: 647- 649.

Samuels, G.J., 1984. Toxigenic fungi. In: H. Kurata y Y.Ueno(eds.) *Toxigenic Fungi- Their toxins and Health Hazard*. Elsevier, Amsterdam. pp. 119-128.

Sauer, D.B., L.M. Seitz, R. Burroughs, H.E. Mohr, J.L. West, R.J. Milleret y H.D. Anthony, 1978. Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest. *J. Agric. Food Chem.* 26: 1380- 1383.

Schroeder, H.W. y H. Hein Jr. 1975. A note on zearalenone in grain sorghum. *Cereal Chem.* 52: 751- 752.

Secretaria de Agricultura y Recursos Hidraulicos, Dirección General de Sanidad Vegetal, 1976. Primer catálogo de enfermedades de plantas mexicanas. *Fitofilo* 71.

Seitz, L.M., D.B. Sauer, E.H. Mohr y R. Burroughs, 1975a Weathered grain sorghum: Natural occurrence of alternariols and storability of the grain. *Phytopathology* 65: 1259- 1263.

Seitz, L.M., D.B. Sauer, E.H. Mohr, R. Burroughs y J.V. Paukstelis, 1975b. Metabolites in *Alternaria* in grain sorghum: Compounds that could be mistaken for zearalenone and aflatoxin. *J. Agric. Food Chem.* 23: 1- 4.

Shotwell, O.L., C.W. Hesseltine, H.R. Burmeister, W.F. Kwolek, G.M. Shannon y H.H. Hall, 1969. Survey of cereal grains and soybeans for the presence of aflatoxin: I wheat, grain sorghum, and oats. *Cereal Chem.* 46: 446- 454.

Shotwell, O.L., G.A. Bennett, M.L. Goulden, R.D. Plattner y C.W. Hesseltine, 1980. Survey for zearalenone, aflatoxin, and ochratoxin in U.S. grain sorghum from 1975 and 1976 crops. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 63: 922- 926.

Steyn, P.S. y C.J. Rabie, 1976. Characterization of magnesium and calcium tenazuoate from *Phoma sorghina*. *Phytochemistry* 15: 1977- 1979.

Stoloff, L., 1976. Occurrence of mycotoxins in food and feeds. In: J.V. Rodricks. *Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems Adv. Chem. Series* 149. Amer. Chem. Soc. pp 23- 50.

Tuite, J., 1969. *Plant Pathological Methods in Fungi and Bacteria*. Burgess, Mineápolis.