



ORIGINAL

Factores extrínsecos e intrínsecos asociados a poblaciones fúngicas micotoxigénicas de granos de maíz (*Zea mays* L.) almacenados en silos bolsa en Argentina



Claudia C. Castellari^{a,*}, María G. Cendoya^a, Facundo J. Marcos Valle^a, Viviana Barrera^b y Ana M. Pacin^c

^a Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Buenos Aires, Argentina

^b Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar, Buenos Aires, Argentina

^c Fundación de Investigaciones Científicas Teresa Benedicta de la Cruz, Luján, Buenos Aires, Argentina

Recibido el 6 de enero de 2015; aceptado el 17 de agosto de 2015

Disponible en Internet el 24 de octubre de 2015

PALABRAS CLAVE

Silo bolsa;
Maíz (*Zea mays* L.);
Micobiota toxigénica;
Fumonisinias;
pH de granos;
Atmósfera autorregulada

Resumen Con el objeto de caracterizar las poblaciones fúngicas, en particular las especies potencialmente micotoxigénicas, que pueden contaminar los granos de maíz almacenados en silos bolsa con un contenido de humedad superior al recomendado como seguro, se evaluaron 270 muestras extraídas al inicio, a los 90 días y al final de un período de almacenamiento de 5 meses. En dichas muestras se cuantificó e identificó la biota fúngica y se determinó la contaminación con fumonisinas y aflatoxinas. Asimismo, se evaluó el efecto de factores extrínsecos (ambiente), intrínsecos (granos) y tecnológicos (ubicación de los granos en el perfil del silo bolsa) sobre las poblaciones totales y micotoxigénicas. El pH de los granos y el nivel de O₂ se redujeron significativamente a los 5 meses, mientras que la concentración de CO₂ se incrementó en igual período. Los recuentos totales de la micobiota fueron significativamente mayores en los granos ubicados en el estrato superior del silo bolsa. Se identificaron especies micotoxigénicas de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Eurotium*. La frecuencia de aislamiento de *Fusarium verticillioides* se redujo al final del almacenamiento y *Aspergillus flavus* solo se aisló en el inicio del almacenamiento. Los recuentos de *Penicillium* spp. y *Eurotium* spp. se incrementaron al final del almacenamiento. El 100% de las muestras presentaron contaminación con fumonisinas, con niveles máximos de 5,707 mg/kg, mientras que las aflatoxinas contaminaron el 40% de las muestras con niveles máximos de 0,0008 mg/kg. Las condiciones ambientales y de sustrato generadas durante el almacenamiento produjeron cambios en la composición de las poblaciones fúngicas y limitaron el desarrollo de hongos micotoxigénicos y la producción de micotoxinas.
© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: claudia.castellari@yahoo.com.ar, castellari.claudia@inta.gob.ar (C.C. Castellari).

KEYWORDS

Silobag;
Maize (*Zea mays* L.);
Toxigenic mycobiota;
Fumonisin;
pH grains;
Self-regulated
atmospheres

Extrinsic and intrinsic factors associated with mycotoxigenic fungi populations of maize grains (*Zea mays* L.) stored in silobags in Argentina

Abstract In order to determine the behavior of mycotoxin-producing fungal populations linked with silobags stored corn grains with a moisture content greater at the recommended as safe, 270 samples taken in three times (beginning, 90 days, final) over a five month period of storage were evaluated. The fungal biota was quantified and identified and the contamination with fumonisin and aflatoxin was determined. Extrinsic factors (environment), intrinsic factors (grains) and technological factors (location of the grains in the profile of silobag) were taken into account to evaluate the presence and quantity of total and mycotoxigenic fungal populations. The pH of grains and O₂ levels were significantly reduced after five months, while CO₂ concentration increased in the same period. The total counts of mycobiota were significantly higher in grains located in the top layer of silobag. Mycotoxigenic species of *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Eurotium* were identified. The frequency of isolation of *Fusarium verticillioides* decreased at the end of storage and *Aspergillus flavus* was isolated only at the beginning of storage. The counts of the *Penicillium* spp. and *Eurotium* spp. were increased at the end of storage. Fumonisin contamination was found in all the samples (100%) with maximum levels of 5.707 mg/kg whereas aflatoxin contaminated only 40% with maximum levels of 0.0008 mg/kg. The environmental and substrate conditions generated during the storage limited the development of mycotoxigenic fungi and mycotoxin production.

© 2015 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La tecnología de silos bolsa para almacenar granos secos se ha convertido en una herramienta importante para los agricultores de la Argentina y otros países del mundo (Bartosik, comunicación personal). Los silos bolsa con mayor capacidad de almacenaje presentan dimensiones que alcanzan 100 m de largo y 4,3 m de diámetro, y poseen una capacidad de 500 toneladas de granos, aunque la capacidad más común es de 200 toneladas. Los silos bolsa son relativamente impermeables al agua y tienen un alto nivel de hermeticidad al oxígeno (O₂) y al dióxido de carbono (CO₂). La respiración de los componentes del granel (granos, insectos y hongos, entre otros) consume el O₂ y genera CO₂²⁵. Esto crea condiciones desfavorables para la supervivencia de los hongos y los insectos, lo que evita pérdidas de calidad de los granos³⁶. Sin embargo, cuando los granos se almacenan con niveles de humedad por encima de los recomendados como seguros (para maíz, trigo y soja: 14%; para girasol: 11%) (<http://www.cosechaypostcosecha.org>, consultado en abril del 2015), existe alta probabilidad de que se desarrollen, además de los microorganismos aerobios estrictos, algunos anaerobios facultativos como bacterias y levaduras. Incluso algunas especies fúngicas, como *Fusarium oxysporum*, son capaces de cambiar su metabolismo y se adaptan a condiciones de ausencia de O₂⁴².

Numerosas especies de *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* y de otros géneros colonizan los granos en el campo y pueden continuar su desarrollo bajo las condiciones del almacenamiento. Dado que algunas de ellas tienen la potencialidad de producir micotoxinas, además de alterar las propiedades físicas de los granos, estos agentes pueden causar inconvenientes a la salud humana y animal. Las

manifestaciones de la toxicidad en los animales son tan diversas como las especies de hongos que producen estos metabolitos, aspecto que ha provocado una preocupación mundial sobre la alimentación y la seguridad alimentaria. El consumo repetido de dosis bajas de aflatoxinas, producidas por *Aspergillus flavus*, tiene un efecto mutagénico y cancerígeno en animales, además de ser letales a dosis altas. Las fumonisin, producidas por especies de *Fusarium*, han sido relacionadas con algunas enfermedades específicas, como la leucoencefalomalacia equina y el síndrome de edema pulmonar en porcinos⁷. Si bien es conocido que las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* presentan mayor competitividad durante el almacenamiento de granos secos respecto de las especies de *Fusarium*^{22,33}, las especies de este género pueden crecer durante el almacenamiento cuando los granos están húmedos.

El deterioro producido por hongos en los granos almacenados depende de una serie de factores, que pueden clasificarse como extrínsecos, intrínsecos y de tipo tecnológicos⁴⁰. Los factores extrínsecos se asocian a las condiciones ambientales, como la temperatura, la humedad relativa y la tensión de O₂ y CO₂. Los factores intrínsecos están relacionados con la composición química y las propiedades físicas de los granos, mientras que los de tipo tecnológico incluyen la ubicación de los granos en los distintos sectores de las estructuras que los contienen, en este caso particular, con referencia a los silos bolsa. Estos factores condicionarían el crecimiento de hongos, la potencial producción de micotoxinas y la calidad final del grano almacenado. Por ello, se comprende la relevancia de detectar la presencia de poblaciones fúngicas, así como la de conocer su distribución y tamaño y los factores ambientales que condicionan su desarrollo sobre los granos almacenados dentro de los silos bolsa.

La información recopilada podrá ser utilizada para diseñar estrategias y aplicar prácticas correctivas durante el cultivo o en el almacenamiento, y evitar pérdidas de calidad de los granos, principalmente por la producción de micotoxinas.

El objetivo de este estudio fue caracterizar las poblaciones de hongos, en particular las micotoxigénicas, que colonizan los granos de maíz almacenados en silos bolsa con humedades superiores a las recomendadas y también evaluar los factores extrínsecos, intrínsecos y de tipo tecnológico que podrían influir sobre dichas poblaciones.

Materiales y métodos

Silos bolsa

Las muestras de maíz se obtuvieron a partir de 5 silos bolsa ubicados en el sudeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina (37° 45' S, 58° 18' O; 130 m sobre el nivel del mar). Los silos bolsa (de polietileno de 250 µm de espesor) tenían 60 m de largo, 2,5 m de diámetro, 1,7 m de altura y una capacidad de almacenamiento de 180 toneladas de granos cada uno. El contenido de humedad de los granos registrado para cada uno de los 5 silos bolsa durante la cosecha fue superior al 14,5%. Los silos bolsa identificados como 1, 2, 3, 4 y 5 presentaron valores de humedad del 16,8%, el 16,9%, el 15,7%, el 15,4 y el 17,4%, respectivamente. La confección de los silos bolsa se realizó en julio (silos bolsa 1 y 2) y agosto (silos bolsa 3, 4 y 5) del 2010, y estos se extrajeron en diciembre del 2010 (silos bolsa 1 y 2) y enero del 2011 (silos bolsa 3, 4 y 5). En total, se analizaron 270 muestras de granos de maíz, extraídas a partir de 3 estratos del perfil vertical de los silos bolsa. El estrato superior abarcó una profundidad de 0 a 0,2 m, el estrato medio de 0,2 a 0,6 m y el estrato inferior de 0,6 a 1,8 m. Además, a partir del punto de cierre de las bolsas, se establecieron diferentes zonas para la extracción de las muestras, ubicadas en 6 sectores equidistantes a lo largo de los silos bolsa: a los 10 m (zona 1), los 20 m (zona 2), los 30 m (zona 3), los 40 m (zona 4), los 50 m (zona 5) y los 60 m (zona 6). Las muestras se recogieron con un calador para granos de 1,8 m de largo, en 3 tiempos del almacenamiento: al cierre de los silos bolsa (tiempo 1), luego de 90 días (tiempo 2) y antes de la apertura de los silos bolsa o final del período (tiempo 3). En cada estrato y zona se recogieron 3 muestras de aproximadamente 1,5 kg para conformar una muestra compuesta de 4,5 a 5 kg. Los granos recolectados se colocaron en bolsas de papel y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

Análisis físicos y químicos

En el interior de los silos bolsa se registró la temperatura del perfil del granel en los 3 tiempos de muestreo. Para ello se utilizó una sonda portátil de temperatura equipada con sensores en 3 puntos, que se insertó en el centro de cada silo bolsa a 30 m del cierre de cada uno (entre las zonas 3 y 4). La ubicación de cada sensor coincidió con los 3 estratos del perfil vertical del silo bolsa.

La concentración de O₂ y de CO₂ de la atmósfera interior de los silos bolsa se determinó en los tres tiempos del

almacenamiento y para las 6 zonas, aunque únicamente se consideró el estrato medio del perfil vertical, debido a que los gases difunden en forma vertical. Para esta medición se empleó un medidor de gases portátil (Check Point, PBI, Dan Sensor, Dinamarca).

El contenido de humedad de los granos se midió con un medidor de humedad (Dickey-John, GAC 2100, EE.UU.). También se registró el pH de los granos en solución acuosa, en una relación de 2:1 (20 ml de agua destilada: 10 g de granos molidos), con el empleo de un peachímetro digital y portátil (Oakton modelo PH11, N° serie 203852, Singapur).

Cuantificación, aislamiento e identificación de la micobiota

El recuento de hongos filamentosos y levaduras se realizó mediante la técnica de diluciones decimales en tubo y siembra (por duplicado) en placas de Petri con agar extracto de levadura cloranfenicol glucosa (YGCA, Merck®, EE. UU.)²⁹. Para ello, y a partir de cada muestra, se confeccionaron suspensiones con 10 g de granos en 90 ml de solución diluyente (0,1%) de peptona de caseína (Britania®, Argentina). Las placas se incubaron a 25 °C (en oscuridad) durante 7 días y se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC/g) totales, como así también de cada género o especie identificada. Los valores de UFC/g fueron transformados a log₁₀ UFC/g para realizar los análisis estadísticos.

Para obtener los aislamientos para su identificación, cada colonia con características morfológicas diferentes se cultivó nuevamente en placas de Petri con YGCA durante 7 días a 25 °C y en oscuridad. Las cepas puras se conservaron a una temperatura de -20 °C en glicerol de alta pureza (Biopack®, Argentina) en una concentración al 35% v/v en agua.

Los aislamientos de las especies de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Eurotium*, *Eupenicillium*, *Walleimia*, *Cladosporium*, *Epiccocum*, *Acremonium* y las levaduras se identificaron con claves taxonómicas²⁹. Los aislamientos de las especies de *Fusarium* se identificaron a partir de claves específicas^{15,26,38,41}. Para la denominación de las especies se consultó la última actualización de nomenclatura del *International Code of Nomenclature* (ICN)^{20,30} y el *Index Fungorum* (<http://www.speciesfungorum.org>, consultado en abril del 2015).

Las identificaciones de las especies de *Fusarium* y una especie de *Aspergillus* fueron confirmadas por análisis filogenético del factor de elongación de la transcripción 1 alfa (TEF1) con los cebadores Ef-728m/EF2³⁹, con la metodología propuesta por Chaverri y Samuels⁸. Las reacciones de secuenciación fueron conducidas en un equipo BigDye™ Terminator v 3.1 (Applied Biosystems, EE. UU.), basadas en el método de Sanger y corridas con el Genetic Analyzer 3130xl en SIGYSA (Argentina). Se realizó un alineamiento con ClustalW en MEGA 4.1 de las secuencias obtenidas junto con secuencias de referencia guardadas en el GenBank. Se realizaron análisis de parsimonia en NONA con el empleo del entorno Winclada con búsqueda heurística con 10 000 repeticiones y estrategia de búsqueda TBR, y el soporte de ramas se calculó sobre la base de un *bootstrap* de 1000 réplicas. Para dichos análisis se agregaron secuencias de especies cercanas como grupo control externo.

Tabla 1 Evolución de las concentraciones de CO₂ y O₂ en la atmósfera de granos de maíz almacenados en silos bolsa

Zonas ^a	Concentración de CO ₂ (%)			Concentración de O ₂ (%)		
	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3
1	0,78 ± 0,5 a B	9,50 ± 5,1 a A	12,57 ± 4,4 b A	19,58 ± 0,7 a A	10,54 ± 5,1 a B	7,80 ± 4,1 a B
2	1,30 ± 1,2 a B	11,24 ± 4,4 a A	14,68 ± 4,3 b A	19,20 ± 0,9 a A	7,70 ± 5,4 a B	5,72 ± 3,3 a B
3	0,90 ± 0,5 a B	10,80 ± 4,0 a A	14,44 ± 6,5 b A	19,30 ± 0,8 a A	7,38 ± 4,6 a B	6,68 ± 4,3 a B
4	0,84 ± 0,5 a B	12,06 ± 3,3 a A	17,72 ± 4,7 ab A	19,40 ± 0,4 a A	6,62 ± 5,3 a B	3,12 ± 1,5 a B
5	0,76 ± 0,2 a C	12,34 ± 4,1 a B	19,00 ± 4,5 ab A	19,46 ± 0,4 a A	6,16 ± 5,1 a B	2,86 ± 2,3 ab B
6	0,81 ± 0,5 a C	12,12 ± 5,5 a B	21,44 ± 3,9 a A	19,66 ± 0,6 a A	7,50 ± 5,7 a B	1,14 ± 0,4 b C

Los valores corresponden a las medias ± DE de los 5 silos bolsa. Letras minúsculas distintas dentro una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes zonas evaluadas. Letras mayúsculas diferentes dentro de una misma fila indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tiempos.

^a Zonas 1, 2, 3, 4, 5 y 6: 10, 20, 30, 40, 50 y 60 m desde el punto de cierre de los silos bolsa, respectivamente. Tiempo 1: cierre de los silos bolsa; tiempo 2: 90 días de almacenamiento; tiempo 3: 5 meses de almacenamiento.

Determinación de micotoxinas

Se conformaron muestras compuestas de granos de 5 kg por cada estrato, incluyendo las 6 zonas de cada uno de los 5 silos bolsa, y se remitieron a la Fundación de Investigaciones Científicas Teresa Benedicta de la Cruz, Luján (provincia de Buenos Aires), donde fueron evaluadas. Se investigó la presencia de aflatoxinas (AFLA: B1, B2, G1, G2), zearalenona (ZEA) y deoxinivalenol (DON), de acuerdo con el método de Romer N.° MY8402s, versión 94.2³⁷, y de fumonisinas (FB1, FB2, FB3) se investigó con el protocolo de la AOAC, método oficial 995.15². Para las mencionadas cuantificaciones se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El sistema HPLC utilizado fue de la serie Agilent 1100 (Alemania), que incluyó un desgasificador G1322A, un muestreador automático G1313A, un detector de fluorescencia G1321A, una bomba cuaternaria G1311A y un controlador de temperatura G1316A.

Análisis estadístico

Debido a que las observaciones realizadas dentro de un mismo silo bolsa no podrían asumirse como estadísticamente independientes, se recurrió al uso de modelos lineales mixtos que permitieron estudiar los efectos de los factores de interés y al mismo tiempo modelar la posible estructura de correlación entre las observaciones. Los modelos lineales mixtos se ajustaron con el fin de determinar el efecto fijo del estrato, la zona del silo bolsa, el tiempo del almacenamiento y sus interacciones sobre el pH, la humedad de los granos, el número total de UFC de hongos y levaduras y el número total de UFC de *Fusarium* spp. y de *A. flavus*. Estos modelos incorporaron también los efectos aleatorios del silo bolsa, el estrato, la zona y el tiempo, para incorporar una correlación positiva entre observaciones realizadas dentro del mismo nivel de cualquiera de estos factores. Por otro lado, los modelos ajustados para analizar las concentraciones de O₂ y CO₂ no consideraron el efecto fijo del estrato, y para la temperatura no consideraron el efecto fijo de la zona del silo bolsa. Se utilizó la función *lme* del paquete «nlme» del lenguaje R³⁴. Cuando se detectó efecto significativo de los factores ($p < 0,05$), se realizaron las comparaciones múltiples simultáneas de las medias estimadas por el modelo, utilizando la función «glht»

del paquete «multcomp» del R¹⁹. Esta función utiliza la distribución t conjunta de todas las diferencias de medias estimadas a comparar, sin corregir el nivel de significación por las múltiples comparaciones, en modo similar a una prueba de diferencia mínima significativa.

Resultados

Análisis físicos y químicos

En el momento del embolsado de los granos, el contenido de humedad promedio considerando los 5 silos bolsa fue de 16,4 ± 0,7%, mientras que al final del período analizado los valores se incrementaron significativamente ($p = 0,005$) a 16,7 ± 1,11% en el estrato superior. La temperatura de los granos se incrementó de 8,6 °C al comienzo del almacenamiento a 22,8 °C a los 5 meses de almacenamiento. En ese tiempo, la temperatura fue significativamente diferente en los 3 estratos analizados: esta fue mayor en el estrato superior respecto del estrato medio ($p = 0,029$) e inferior ($p < 0,001$). Las concentraciones de O₂ y CO₂ durante el almacenamiento pueden observarse en la [tabla 1](#). Al comienzo del almacenamiento, los niveles de O₂ oscilaron entre el 19,20 y el 19,66%, y los niveles de CO₂ entre el 0,76 y el 1,30%. Al transcurrir el tiempo, los niveles de O₂ se redujeron progresivamente, mientras que los de CO₂ se incrementaron. Se detectó un efecto de interacción significativa entre la zona del silo bolsa y el tiempo de almacenamiento para el nivel de O₂ ($p = 0,0054$) y de CO₂ ($p = 0,0226$). La concentración de CO₂ se incrementó hacia el tercer muestreo y fue significativamente diferente ($p = 0,0091$) entre las zonas. La concentración de O₂ disminuyó significativamente hacia el final del período analizado y también se detectaron concentraciones significativamente diferentes ($p = 0,0003$) entre las zonas de los silos bolsa. El pH de los granos varió significativamente entre los estratos ($p < 0,001$) y los tiempos ($p = 0,0036$): la mayor acidez se registró en el estrato superior y hacia el final del período de almacenamiento ([tabla 2](#)).

Composición de la micobiota

El número total de log₁₀ UFC/g al comienzo del almacenamiento fue de 4,11 ± 0,5 y antes de la apertura de las

Tabla 2 Evolución del pH de granos de maíz almacenados en silos bolsa

Tiempo	pH			
	ES	EM	EI	Media
1	6,12 ± 0,1	6,14 ± 0,0	6,16 ± 0,1	6,14 ± 0,1 a
2	6,13 ± 0,1	6,15 ± 0,1	6,17 ± 0,2	6,15 ± 0,1 a
3	5,88 ± 0,0	5,90 ± 0,0	5,93 ± 0,1	5,90 ± 0,1 b
Media	6,04 ± 0,1 c	6,06 ± 0,1 b	6,09 ± 0,1 a	-

Los valores corresponden a las medias ± DE para los 5 silos bolsa.

Tiempo 1: cierre de los silos bolsa; tiempo 2: 90 días de almacenamiento; tiempo 3: cinco meses de almacenamiento.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre estratos o tiempos.

ES: estrato superior; EM: estrato medio; EI: estrato inferior.

bolsas fue de $4,42 \pm 1,0$ (tabla 3). Si bien no se registraron diferencias significativas en los recuentos totales entre los tiempos ($p > 0,05$) y las zonas de los silos bolsa ($p > 0,05$), se determinó un efecto significativo del estrato ($p = 0,0314$), en el que el estrato superior registró mayor número de UFC/g respecto del estrato inferior.

La población fúngica total hallada en las muestras de granos de maíz almacenados durante 5 meses se constituyó por 35 especies pertenecientes a 10 géneros de hongos filamentosos y 3 géneros de levaduras (tabla 4). Se identificaron 18 especies de *Penicillium*, clasificadas en 4 subgéneros, según se describe a continuación. Subgénero *Aspergilloides*: *Penicillium sclerotiorum* J.F.H. Beyma, *Penicillium implicatum* Biourge, *Penicillium oxalicum* (syn. *P. decumbens* Currie & Thom), *Penicillium restrictum* J.C. Gilman & E.V. Abbott; subgénero *Biverticillium*: *Talaromyces funiculosus* (syn. *Penicillium funiculosum* Thom), *Talaromyces variabilis* (syn. *P. variabile* Sopp), *Talaromyces islandicus* (syn. *P. islandicum* Sopp), *Talaromyces pinophilus* (syn. *P. pinophilum* Hedgcock); subgénero *Furcatum*: *P. oxalicum* Currie & Thom, *Penicillium corylophilum* Dierckx, *Penicillium citrinum* Thom; subgénero *Penicillium*: *Penicillium brevicompactum* Dierckx, *Penicillium solitum* Westling, *Penicillium aurantiogriseum* (syn. *Penicillium viridicatum* Westling), *Penicillium verrocusum* Dierckx, *Penicillium rubens* Biourge (syn. spp., illus *P. chrysogenum* Thom), *Penicillium griseofulvum* Dierckx, y *Penicillium olsonii* Bainier & Sartory. En general, las especies de *Penicillium* se encontraron con alta frecuencia (51%) en el total de muestras analizadas. Sin embargo, la frecuencia de aparición (%) de cada una de estas y su recuento

(log₁₀ UFC/g) fue variable durante el período analizado. *T. funiculosus* fue la especie predominante en los 3 tiempos de muestreo. Al comienzo del almacenamiento, el 75,5% de las muestras presentó *T. funiculosus* ($3,37 \pm 0,71$ log₁₀ UFC/g). En el tiempo 2, el porcentaje de las muestras con *T. funiculosus* se incrementó al 76,6% ($3,25 \pm 0,79$ log₁₀ UFC/g) y al final del período considerado el porcentaje se redujo al 69%, aunque sin variación en los recuentos ($3,28 \pm 0,71$ log₁₀ UFC/g).

Las especies de *Fusarium* fueron aisladas en el 82,3% del total de las muestras analizadas durante los 5 meses del almacenamiento. Sobre la base de las características macroscópicas de las colonias y microscópicas de las estructuras reproductivas y el estudio filogenético con el marcador TEF1, se identificaron las siguientes especies de *Fusarium*: *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg, *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, *Fusarium subglutinans* (Wollenw and Reinking) Nelson, Toussoun and Marasas y *F. oxysporum* Schlecht. EMEND. Snyd. y Hans.

Respecto de *Aspergillus* spp., a partir de la caracterización morfológica de los aislamientos y del estudio de las secuencias ITS se identificaron 2 especies en el primer tiempo de almacenamiento, en todos los silos bolsa. Dichas especies pertenecieron al subgénero *Circumdati*, Sección *Flavi*, *A. flavus* Link y a la Sección *Nigri*, *Aspergillus niger* Tiegh.

La presencia de *Eurotium* spp. fue observada en el segundo y en el tercer muestreo en el 10% y el 37,8% de las muestras, respectivamente. La especie predominante fue *Eurotium amstelodami* L. Margin.

Tabla 3 Evolución del recuento total de la micobiota en granos de maíz almacenados en silos bolsa

Tiempo	Recuento total (log ₁₀ UFC/g)			
	ES	EM	EI	Media
1	4,21 ± 0,3	4,04 ± 0,3	4,07 ± 0,6	4,11 ± 0,5 a
2	4,22 ± 0,7	4,28 ± 0,7	4,05 ± 0,8	4,18 ± 0,7 a
3	4,64 ± 1,0	4,46 ± 1,0	4,15 ± 0,9	4,42 ± 1,0 a
Media	4,36 ± 0,7 a	4,26 ± 0,7 a	4,09 ± 0,8 b	-

Los valores corresponden a las medias ± DE para los 5 silos bolsa.

Tiempo 1: cierre de los silos bolsa; tiempo 2: 90 días de almacenamiento; tiempo 3: 5 meses de almacenamiento.

Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre estratos o tiempos.

ES: estrato superior; EM: estrato medio; EI: estrato inferior.

Tabla 4 Composición de las poblaciones fúngicas asociadas a granos de maíz almacenados en silos bolsa

Género	% ^a	Número de especies		
		T1	T2	T3 ^b
<i>Penicillium</i> spp. Link	51,40	7	10	11
<i>Aspergillus</i> spp. Fr.:Fr.	5,71	2	0	0
<i>Fusarium</i> spp. Link	11,40	4	4	4
<i>Eupenicillium</i> spp. F. Ludw.	2,85	1	0	1
<i>Cladosporium</i> sp. Link	2,85	1	0	0
<i>Epicocum</i> sp. Link	2,85	0	1	0
<i>Wallemia</i> sp. (Fr.) Arx	2,85	0	1	0
<i>Eurotium</i> spp. Link:Fr.	5,71	0	1	2
<i>Moniliella</i> sp. Stolk & Dakin	2,85	0	0	1
<i>Acremonium</i> spp. Link	2,85	1	1	1
<i>Hyphopichia</i> spp. (Boidin <i>et al.</i>) Arx & Van der Walt	2,85	1	1	1
<i>Candida</i> spp. Berkhout	2,85	0	1	1
<i>Debaryomyces</i> spp. Lodder & Kreger ex Kreger	2,85	0	1	1

^a Proporción de especies de cada género respecto del total de especies identificadas.

^b T1: tiempo 1, cierre de los silos bolsa; T2: tiempo 2, 90 días de almacenamiento; T3: tiempo 3, 5 meses de almacenamiento.

Respecto de las levaduras, el 27,8% de las muestras de maíz recolectadas al inicio del almacenamiento presentaron contaminación con este grupo microbiano, mientras que al final del período se aislaron en el 58% de las mismas. Los recuentos medios fueron de $3,3 \pm 0,70 \log_{10}$ UFC/g y de $4,62 (\pm 0,74) \log_{10}$ UFC/g al inicio y al final del almacenamiento, respectivamente. La especie dominante fue *Hyphopichia burtonii* (Boidin *et al.*) Arx & Van der Walt, aislada en el 91,9% de las muestras de granos. Las especies restantes fueron clasificadas como pertenecientes al género *Candida*.

Especies fúngicas con capacidad potencial de producir micotoxinas

F. verticillioides, *F. proliferatum*, *A. flavus*, *P. citrinum*, *P. verrucosum* y *E. amstelodami* fueron especies aisladas de muestras de granos de todos los silos bolsa. La frecuencia de aislamiento y los recuentos de las especies de *Fusarium* se redujeron al final del período analizado y *Aspergillus* no fue encontrado en ese tiempo. *A. flavus* se aisló en el 11,44% de las muestras del tiempo 1, con un recuento de $2,73 \pm 0,71 \log_{10}$ UFC/g. El porcentaje de muestras contaminadas con especies de *Fusarium* se redujo a los 5 meses a un valor del 54,4%, a pesar de que los recuentos no presentaron variaciones significativas ($p=0,0552$) entre el primer ($2,83 \pm 0,92 \log_{10}$ UFC/g) y el tercer tiempo de muestreo ($3,18 \pm 0,77 \log_{10}$ UFC/g). En cambio, las especies de *Penicillium* y *Eurotium* incrementaron su frecuencia de aislamiento y abundancia hacia el final del almacenamiento. *P. citrinum* fue aislada en el 3,30% las muestras de granos del segundo tiempo y con un recuento de $3,53 \pm 0,60 \log_{10}$ UFC/g, mientras que *P. verrucosum* fue aislada de muestras de granos recolectados en el segundo (0,55% de las muestras y recuentos de $2,3 \pm 0,00 \log_{10}$ UFC/g) y en el tercer tiempo del almacenamiento (3,88% de las muestras y recuentos de $2,98 \pm 1,00 \log_{10}$ UFC/g). El recuento de las poblaciones de *Eurotium* spp. se incrementó entre el segundo y el tercer tiempo del almacenamiento, y fue de $2,08 \pm 0,49$ y $2,57 \pm 0,49 \log_{10}$ UFC/g, respectivamente.

Micotoxinas

El total de las muestras analizadas presentó contaminación con fumonisinas, mientras que el 40% reveló la presencia de aflatoxinas. Se detectaron fumonisinas FB1 en el 100% de las muestras, fumonisinas FB2 en el 86% y fumonisinas FB3 en el 53%. Por otro lado, el 18,4% de las muestras presentó solamente FB1; el 18,4%, FB1 + FB2, y el 47,3%, FB1 + FB2 + FB3 (tabla 5).

Cuando se analizaron las aflatoxinas solo se detectó la presencia de AFLA B1 en concentraciones mínimas de 0,0003 mg/kg y máximas de 0,0008 mg/kg.

Los valores de micotoxinas determinados al final del almacenamiento no registraron incrementos respecto de los niveles detectados a los 90 días (Cardoso, comunicación personal). Las micotoxinas ZEA y DON no fueron detectadas por las técnicas empleadas.

Discusión

La temperatura, la actividad agua (a_w) y la humedad de los granos son factores condicionantes de la colonización fúngica y de la producción de micotoxinas durante el almacenamiento de los granos²³. Sin embargo, hasta el presente no se realizaron estudios sobre la composición de gases de la atmósfera intergranaria y de la acidez de los granos, factores que podrían contribuir a explicar el comportamiento de las poblaciones fúngicas en sistemas de almacenamiento como los silos bolsa.

El incremento de la humedad registrado hacia el final del almacenamiento en el estrato superior de los silos bolsa estudiados podría ser explicado por la existencia de estratificación de la humedad de los granos ubicados en áreas de contacto con la cubierta plástica, causado posiblemente por ciclos repetidos de condensación y adsorción de agua, como consecuencia de la variación diaria de la temperatura ambiente. Casini *et al.*⁵ comunicaron estratificación de humedad en la capa superficial de granos de girasol almacenados en bolsas plásticas y la relacionaron con la

Tabla 5 Concentración de fumonisinas (mg/kg) en granos de maíz almacenados en los cinco silos bolsa a los 90 días

Fumonisinas	Valor mínimo	Valor máximo	Media	Mediana
Totales	0,120	5,707	1,708	0,479
FB1	0,116	4,166	1,190	0,299
FB2	0,067	1,217	0,446	0,196
FB3	0,049	0,317	0,176	0,171

disminución de la temperatura nocturna, que provocó una condensación de la superficie de los granos y de la cubierta plástica.

Los cambios en la composición de O₂ y de CO₂ durante el período de almacenamiento reflejaron la actividad metabólica en el interior de los silos bolsa. Es así que la respiración de los granos y de la microbiota asociada redujo el nivel de O₂ e incrementó el nivel de CO₂, generando una atmósfera anaerobia. Estos resultados coinciden con los reportados en Italia para el almacenamiento de granos de maíz y de trigo en silos bolsa¹⁸. Por otro lado, en la zona 1 (cierre de la bolsa) de los 5 silos bolsa al final del almacenamiento se determinó la mayor concentración de O₂, lo que podría indicar un cierre inadecuado de aquellas; en consecuencia, se favorecería la producción de microambientes para el desarrollo de la micobiota aeróbica. Respecto del pH de los granos, se determinó su disminución en los granos ubicados en el estrato superior hacia el tercer tiempo del almacenamiento. Este resultado podría ser explicado a partir del registro de un mayor número de UFC/g totales en los granos dispuestos en dicho estrato, ocasionado por la mayor actividad metabólica. El comportamiento de esta variable en condiciones de almacenamiento hermético no fue estudiado hasta el presente. Por ello, el monitoreo de la acidez de los granos durante el almacenamiento puede contribuir a comprender y explicar la dinámica de las poblaciones fúngicas, y en particular la de las micotoxigénicas asociadas a ellos.

El recuento total de la micobiota que colonizó los granos de maíz no presentó variaciones a través del tiempo, coincidiendo con lo informado por otros investigadores en Argentina²⁸. Estos resultados podrían estar determinados por el incremento de la concentración de CO₂ y la acidez de los granos, y por la reducción del nivel de O₂, que afectaron la actividad metabólica. Por el contrario, en Italia los reportes indicaron una reducción en el recuento de hongos totales durante el almacenamiento de maíz en silos bolsa¹⁸.

Otro aspecto relevante de este estudio determinó que los recuentos fúngicos totales fueron afectados por el estrato (posición de los granos en el perfil vertical del silo bolsa): se encontraron los mayores valores en el estrato superior y los menores en el inferior. Este hallazgo diferencial en el recuento poblacional influenciado por la ubicación de los granos nunca fue reportado; esto pudo deberse a los 3 factores extrínsecos explicados precedentemente: a) el incremento de la temperatura en la capa superior de la bolsa, en respuesta a las variaciones diarias de temperatura ambiente; b) la existencia de variación de la humedad en los granos individuales situados en el estrato superior de la bolsa, ocasionada por variaciones diurnas y nocturnas de la temperatura, lo que provoca la condensación en

la superficie de los granos, y c) la influencia de un mayor intercambio de gases entre el medio ambiente y el interior de la bolsa sobre los granos ubicados en el estrato superior³⁵. En el estrato inferior posiblemente se generaron microambientes donde la menor temperatura y humedad y el menor intercambio gaseoso influyeron negativamente en el metabolismo respiratorio, lo que pudo haber afectado la supervivencia de diferentes especies fúngicas, entre ellas las micotoxigénicas.

Respecto de la composición de las poblaciones fúngicas, se observó que la presencia de diferentes especies fue influenciada por las condiciones ambientales dinámicas que dominaron el interior del silo bolsa. En el inicio del almacenamiento, se aislaron especies de *Fusarium* y *Aspergillus* junto con otras especies asociadas a los granos. Sin embargo, la generación de un ambiente anaerobio y el incremento de la temperatura y de la acidez de los granos conforme avanzó el tiempo de almacenamiento favorecieron a una micobiota dominada por especies de *Penicillium*, *Eurotium* y levaduras. El incremento del número de muestras positivas con *Eurotium* hacia el final del almacenamiento pudo deberse a que este género es tolerante al estrés, sus esporas germinan a una temperatura óptima cercana a los 30 °C y es capaz de adaptarse más a pH ácidos¹⁶. Asimismo, la frecuencia de aislamiento y los recuentos de las levaduras se incrementaron hacia el final del período considerado. Si bien estos resultados no coincidieron con los reportados por otros investigadores en condiciones similares²⁸, el incremento pudo ser explicado por la dominancia de una atmósfera anaerobia.

La frecuencia de aislamiento de especies potencialmente productoras de aflatoxinas (*A. flavus*) y fumonisinas (*F. verticillioides* y *F. proliferatum*) se redujo hacia el final del almacenamiento. Algunos investigadores reportaron que las especies de *Aspergillus* estarían mejor adaptadas al crecimiento en sustratos con pH alcalino⁴³, por lo que la reducción del pH de los granos podría haber afectado la supervivencia de tales especies. Por otro lado, podría inferirse que si bien *A. flavus* es considerada una especie favorecida por las condiciones del almacenamiento⁴, tendría probablemente inconvenientes para adaptarse a las condiciones ambientales del almacenamiento en silos bolsa, con importantes restricciones en la concentración de O₂ e incremento de la acidez. La identificación de *A. flavus* en maíz en diferentes condiciones de almacenamiento coincidió con lo informado por otros investigadores en diferentes regiones agroecológicas de la Argentina^{10,17,32}.

La frecuencia de aislamiento de *Fusarium* spp. se redujo hacia el final del almacenamiento; sin embargo, su recuento poblacional no registró variaciones. Estos resultados

concuerdan con los comunicados por otros investigadores en la Argentina^{6,14} y otros países^{13,31}.

A diferencia de lo que ocurrió con el recuento total de las poblaciones fúngicas, que fue afectado por el estrato granario, no se detectó efecto de la posición de los granos en el silo bolsa sobre el recuento de las especies de *Fusarium*. Por primera vez se comunica que la posición de los granos en el interior del silo bolsa no afectó el recuento poblacional; posiblemente esto se deba a que las especies de este género están asociadas con el sustrato maíz y son menos influenciadas por las condiciones ambientales en el interior del silo bolsa^{21,33}.

La capacidad de especies de *Fusarium* y de *A. flavus* para producir fumonisin y aflatoxinas en maíz fue demostrada en diferentes investigaciones realizadas en nuestro país³. Sin embargo, en la Argentina solo existe legislación para las aflatoxinas totales y esta especifica los límites máximos para maní, maíz y sus derivados, y para la aflatoxina M1 en leche fluida y en polvo (<http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigooa>, consultado en abril del 2015). Para las restantes micotoxinas, la Argentina considera los límites de tolerancia indicados por la legislación vigente en la Comunidad Europea¹².

Los niveles de fumonisin totales superaron los valores máximos permitidos de 4 mg/kg¹¹ en 3 de las muestras analizadas, correspondientes las 3 a un mismo silo bolsa (silo bolsa 3). Los granos de este silo bolsa fueron embolsados en el mes de agosto, por lo que las altas concentraciones determinadas podrían estar explicadas por una mayor permanencia de los granos en el cultivo, donde las especies de *Fusarium* poseen mayores ventajas adaptativas para colonizar los granos y producir la micotoxina⁹. Este aspecto es relevante, ya que se podría inferir que un retraso en la cosecha ocasionaría una acumulación de fumonisin en los granos en el campo. Aquellos investigadores que analizaron fumonisin totales en maíz en diferentes zonas productoras de la Argentina determinaron niveles que fueron desde 2,525 mg/kg hasta 11,528 mg/kg¹⁴ y desde 0,01 mg/kg hasta 31,108 mg/kg²⁸, datos que manifiestan una marcada variabilidad.

Respecto de las aflatoxinas, los niveles registrados fueron inferiores a los límites establecidos en nuestro país para granos de maíz (0,020 mg/kg), lo que podría estar relacionado con la menor adaptación de *A. flavus* a las condiciones ambientales descriptas para la zona de estudio. Esta especie es comúnmente aislada en maíces cultivados en las regiones central y norte de la Argentina, donde es favorecida por temperaturas superiores a 30 °C²⁴.

Entre las micotoxinas producidas por *Penicillium* spp. se destacan la ocratoxina A (OTA), la patulina y citrinina²⁷. En este estudio, *P. citrinum* y *P. verrucosum*, potenciales productores de citrinina y OTA, respectivamente, se aislaron con baja frecuencia. Posiblemente, la composición de gases de la atmósfera y el incremento de la acidez no favorecieron su desarrollo.

Con referencia al incremento de *E. amstelodami*, en la actualidad no se conocen informes de la producción de OTA por esta especie en maíces almacenados en silos bolsa. Sin embargo, se comunicó que esta especie produjo OTA en granos de cereales en el almacenamiento¹, por lo que serían necesarios estudios sobre la producción de OTA por *Eurotium* spp. en granos de maíz almacenados en silos bolsa

dado que esta micotoxina, al igual que las ya mencionadas, representa un riesgo potencial para la salud humana y animal.

Si bien el almacenamiento de granos en silos bolsa constituye un sistema de almacenamiento sencillo y con un bajo costo de inversión para conservar granos, es necesario supervisar el estado de los granos antes de que estos sean embolsados y periódicamente en el almacenamiento, con el fin de detectar precozmente su eventual deterioro por el desarrollo de hongos. Los datos sobre la dinámica de las poblaciones micotoxigénicas y los factores que condicionan su aparición y proliferación aportados por este estudio podrían contribuir a diseñar estrategias tendientes a evitar la alteración de la calidad de los granos durante el almacenamiento. Una de ellas podría estar relacionada con el uso de diferentes mezclas de gases (con alto contenido de CO₂), considerando la característica de la baja permeabilidad del plástico del silo bolsa. De esta forma, se contaría con una alternativa válida para reducir las pérdidas de calidad de los granos destinados al consumo humano y animal ocasionadas por la producción de metabolitos tóxicos, cuando aquellos son almacenados por períodos superiores a los 5 meses.

Respecto de la legislación que establece los límites de tolerancia para diferentes micotoxinas en materias primas y alimentos elaborados, sería relevante establecer valores de tolerancia máximos para las fumonisin, ya que su presencia ha sido detectada en un alto porcentaje de muestras de granos de maíz analizadas en los últimos años en la Argentina, situación que podría constituir una problemática para la comercialización e industrialización de los granos, ya sea para consumo humano o animal.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

El presente trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de Mar del Plata (Proyecto AGR375/12) y el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Proyecto AEAL 274.420, Área Estratégica Agroindustria), y fue presentado por Claudia C. Castellari como requisito parcial para obtener el grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Agradecimientos

Al grupo de Poscosecha de granos de la Unidad Integrada Balcarce, Estación Experimental Agropecuaria INTA Balcarce.

Bibliografía

- Al-Julaifi MZ. Ochratoxin. A production by *Eurotium amstelodami* and *Eurotium* spp. isolated from locally grown barley in Saudi Arabia. *Kuwait J Sci Eng.* 2003;30:59–66.
- AOAC Official Methods of Analysis 995.15. Fumonisin B1, B2 and B3 in Corn Liquid Chromatographic Method. *Nat Toxins.* 1998;2:49–51.
- Brogg LE, Pacin AM, Gasparovic A, Sacchi C, Rothermel A, Gally A, Resnik S. Natural occurrence of aflatoxins, deoxynivalenol, fumonisins and zearalenone in maize from Entre Ríos Province, Argentina. *Mycotox Res.* 2007;23:59–64.
- Carrillo L. Los hongos de los alimentos y forrajes. Ediciones Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina. 2003.
- Casini C, Rodríguez JC, Bartosik R, editores. Almacenamiento de granos en bolsas plásticas. Resultados de investigación. [On-line] <http://inta.gov.ar/documentos/almacenamiento-de-granos-en-bolsas-plasticas>. Consultado abril de 2015.
- Castellari CC, Marcos Valle F, Mutti J, Cardoso L, Bartosik R. Toxigenic fungi in corn (maize) stored in hermetic plastic bags. *Julius Kühn Archiv.* 2010;425:501–4.
- Chavarrí M, Luzón O, Mazzani C, González C, Alezones J, Garrido MJ. Mohos toxigénicos y micotoxinas en maíz de grano blanco cosechado bajo riego en los estados Yaracuy y Portuguesa, Venezuela. *Fitopatol Venez.* 2009;22:2–7.
- Chaverri P, Samuels GJ. *Hypocrea/Trichoderma (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores.* *Stud Mycol.* 2003;48:1–116.
- Chulze S, Ramirez ML, Farnochi MC, Pascale M, Visconti A, March G. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinean corn at different ear maturity stages. *J Agric Food Chem.* 1996;44:2797–801.
- Chulze S, Bertinetti C, Dalcero A, Etcheverry M, Farnochi C, Torres A, Rizzo I, Varsavsky E. Incidence of aflatoxin, zearalenone, and deoxynivalenol on corn in Argentina. *Mycotox Res.* 1989;5:9–12.
- EC, European Commission. Commission Regulation (EC) N (1126/2007 of 28 september 2007 amending Regulation (EC) N (1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards *Fusarium* toxins in maize and maize products. *Official Journal of European Union.* 2007;255:16–17.
- EC, European Commission. Commission Regulation (EC) N (165/2010 of 26 February 2010 amending Regulation (EC) N (1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Aflatoxins. *Official Journal of European Union.* 2010;50:11–12.
- Gamanya R, Sibanda L. Survey of *Fusarium moniliforme (F. verticillioides)* and production of fumonisin B1 in cereal grains and oilseeds in Zimbabwe. *Int J Food Microbiol.* 2001;71:145–9.
- Garrido CE, Hernández Pezzani C, Pacin AM. Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays* L.) from 1999 to 2010. *Food Control.* 2012;25:660–5.
- Gerlach W, Nirenberg H. The Genus *Fusarium* a Pictorial Atlas. *Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Institut für Mikrobiologie.* Berlin-Dahlem. 1982, p. 1–406.
- Gock MA, Hocking AD, Pitt JI, Poulos PG. Influence of temperature, water activity and pH on growth of some xerophilic fungi. *J Food Microbiol.* 2003;81:11–9.
- González Pereyra ML, Chiacchiera SM, Rosa CA, Sager R, Dalcero AM, Cavaglieri LR. Comparative analysis of the mycobiota and mycotoxins contaminating corn trench silos and silobags. *J Sci Food Agric.* 2011;91:1474–81.
- Gregori R, Meriggi P, Pietri A, Formenti S, Baccarini G, Battlani P. Dynamics of fungi and related mycotoxins during cereal storage in silo bags. *Food Control.* 2013;30:280–7.
- Hothorn T, Bretz F, Westfall P. Simultaneous inference in general parametric models. *Biomet J.* 2008;50:346–63.
- Houbraken J, de Vries RP, Samson RA. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Adv Appl Microbiol.* 2014;86:199–249.
- Magan N, Hope R, Cairns V, Aldred D. Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *Eur J Plant Pathol.* 2003;109:723–30.
- Marin S, Companys E, Sanchis V, Ramos AJ, Magan N. Colonization and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *Int J Food Microbiol.* 1998;45:107–17.
- Montani ML, Vamonde G, Resnik S, Buera P. Influence of water activity and temperature on the accumulation of zearalenone in corn. *Int J Food Microbiol.* 1988;6:1–8.
- Munkvold G. Mycotoxins in corn: Occurrence impact and management. En: White P, Johnson L, editores. *Corn: Chemistry and Technology (AACC Inc.);* 2003. p. 5–71.
- Navarro S, Donahaye J. Innovative environmentally friendly technologies to maintain quality of durable agricultural produce. En: Shimshon Ben Yeoshua, editor. *Environmentally friendly technologies for agricultural produce quality.* Boca Raton: CRC Press; 2005. p. 203–60.
- Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Press 1983.
- O'Brien M, Nielsen KF, O'Kiely P, Forristal PD, Fuller HT, Frisvad JC. Mycotoxins and other secondary metabolites produced *in vitro* by *Penicillium paneum* Frisvad and *Penicillium roqueforti* Thom isolated from baled grass silage in Ireland. *J Agric Food Chem.* 2006;54:9268–76.
- Pacin AM, Ciancio Bovier E, González HL, Whitechurch EM, Martínez EJ, Resnik SL. Fungal and fumonisins contamination in Argentine maize (*Zea mays* L.) silo bags. *J Agric Food Chem.* 2009;57:2778–81.
- Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and food spoilage.* UK. London: Blackie Academic & Professional; 1997. p. 593.
- Pitt JI, Taylor W. *Aspergillus*, its sexual states and the new International Code of Nomenclature. *Mycologia.* 2014;106:1051–62.
- Pozzi CR, Correa B, Gambale W, Paula CR, Chacon-Reche NO, Meirelles MCA. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. *Food Addit Contam.* 1995;2:313–9.
- Resnik SL, González HHL, Pacin AM, Viora M, Caballero GM, Gros EG. Cyclopiazonic acid and aflatoxins production by *Aspergillus flavus* isolated from Argentinian corn. *Mycotox Res.* 1996;12:61–6.
- Reyneri A. The role of climatic condition on mycotoxin production in cereal. *Vet Res Commun.* 2006;30:87–92.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2012. [On-line] <http://www.R-project.org/>. Consultado junio 2014.
- Rodríguez JC, Bartosik RE, Malinarich HD. Almacenaje de granos en bolsas plásticas: sistema silobag (Storage of grains in hermetic plastic bags: silo bag system). Informe final de trigo. Fundación ArgenINTA. 2001. [On-line] <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/posco/granos/silobag.htm>. Consultado octubre 2014.
- Rodríguez J, Bartosik R, Cardoso L, Croce D. Factors affecting carbon dioxide in interstitial air of wheat stored in hermetic plastic bags (silo-bag). En: Guo D, Navarro S, Jian Y, Cheng J, Zuxun L, Yue L, Haipeng W, editores. *Controlled atmosphere and*

- fumigation, green, safe, harmony and development. Proceedings of the 8th International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products. Chengdu: Schuan Publishing group of Science and Technology; 2008.
37. Romer Labs. Inc.® Manual Quantitative method for DON, total AFB1 and zearalenona. Method MY8402s, versión 94.2, 1994.
 38. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. Introduction to food-borne fungi. 4th ed. Baarn: Centraal Bureau Voor Schimmel cultures; 1995.
 39. Samuels GJ, Ismaiel A, de Sousa J, Chaverri P. *Trichoderma stromaticum* and its overseas relatives. *Mycol Prog.* 2011;11: 215–54.
 40. Sinha RN. The stored grain ecosystems. En: Jayas DS, White NDG, Muir WE, editores. *Stored grain ecosystems*. New York: Marcell Dekker; 1995.
 41. Summerell BA. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. *Plant Dis.* 2003;87:117–27.
 42. Taniwaki MH, Hocking AD, Pitt JI, Fleet GH. Growth and micotoxin production by fungi in atmospheres containing 80% carbon dioxide and 20% oxygen. *Int J Food Microbiol.* 2010;143: 218–25.
 43. Wheeler KA, Hurdman BF, Pitt JI. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Int J Food Microbiol.* 1991;12:141–9.