

## INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y LA ACTIVIDAD ACUOSA EN LA PRODUCCION DE MICOTOXINAS DE *ALTERNARIA* (HYPHOMYCETALES) EN GIRASOL

Por ADRIANA TORRES\*, SOFIA CHULZE, EDITH VARSAVSKY, ANA DALCERO, MIRIAM ETCHEVERRY y CECILIA FARNOCHI<sup>1</sup>

**Summary** *Influence of temperature and water activity on Alternaria (Hyphomycetales) micotoxins production in sunflower seeds.* The fungal secondary metabolites biosynthesis is regulated by physical, chemical and biological factors such as temperature, water activity, chemicals and microbial interaction. In sunflower the optimal conditions of temperature and water activity for *Alternaria sp.* mycotoxins production is unknown. The aim of this work was to investigate the effect of temperature and water activity on alternariol (AOH) and alternariol mono- methyl ether (AME) biosynthesis by *Alternaria alternata* ITEM 539 and *Alternaria alternata* RCY strains the latter isolated from sunflower. When temperature was evaluated (20, 25 and 32 °C) at 0.90 of water activity, it was observed that 25 °C was the optimal temperature for toxin production by both strains, while at 20 and 32 °C the toxin production was lower, being this temperature effect remarkably for AME. This could be explained taking into consideration the biosynthetic pathway of *Alternaria sp.* metabolites. Under the conditions of constant temperature (25 °C) and variable water activity values it was observed that 0.90 was the optimal value for *Alternaria sp.* mycotoxins. In summary, in sunflower both temperature and water activity affect AOH and AME production; particularly, the temperature determined the AME levels produced.

### INTRODUCCION

Se ha comprobado que los frutos de girasol, tanto a campo como después de la cosecha están contaminados con *Alternaria alternata* (Dalcero *et al.*, 1981. 1989). Esta especie produce varios metabolitos tóxicos tales como: alternariol, alternariol monometil éter y ácido tenuazónico, los cuales han sido detectados naturalmente en productos vegetales (Seitz *et al.*, 1975; Schroeder and Cole, 1977; Sauer *et al.*, 1978).

Harvan y Pero (1978) demostraron que los metabolitos de *Alternaria sp.* eran tóxicos para las células de mamíferos y bacterianas. Además se ha observado que alternariol monometil éter posee actividad mutagénica y que juntamente con alternariol tendrían un efecto tóxico sinérgico (King and Schade, 1984). Pero aún, los efectos tóxicos de los metabolitos de *Alternaria sp.* no están bien determinados y se necesitan mayores estudios para conocer los efectos de las toxinas individuales y

combinadas (Logrieco *et al.* 1990; Visconti *et al.* 1986).

La síntesis de los metabolitos secundarios fúngicos está regulada por factores físicos, químicos y biológicos (Lacey, 1989). En girasol no se conocen las condiciones óptimas de temperatura y actividad acuosa que determinan la formación de micotoxinas por *Alternaria alternata*. El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto de la temperatura y la actividad acuosa sobre la formación de alternariol y alternariol monometil éter en girasol.

### MATERIALES Y METODOS

**Microorganismos:** *Alternaria alternata* ITEM 539, cepa aislada de tomate, cedida por el Instituto de Tossine e Micotossine da Parassiti Vegetali, Bari, Italia.

*Alternaria alternata* RCY, aislada de girasol en nuestro laboratorio.

**Condiciones de cultivo e inoculación:** se colocaron 25 g. de frutos de girasol en frascos Erlenmeyer de 250 ml y se llevaron a los porcentajes de humedad correspondientes a: 0,98; 0,90; 0,87 y 0,70 de actividad acuosa de acuerdo a las isotermas de adsorción para girasol en Argentina (Pollió, 1985); luego se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20'.

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología e Inmunología, Orientación Micología, Universidad Nacional de Río Cuarto. Enlace Rutas 8 y 36, Km 603 (5800) Río Cuarto, Córdoba.

\* Becario del Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba (CONICOR).

Los frascos Erlenmeyer se colocaron en desecadores que contenían soluciones saturadas de  $SO_4 K_2$ ;  $Cl_2 Ba$ ;  $CrO_4 K$ ;  $Cl_2 Cu$ ;  $2 H_2O$  para permitir que los frutos se equilibraran a las actividades acuosas de 0,98; 0,90; 0,87 y 0,70 respectivamente. Los frutos equilibrados se inocularon con  $10^6$  esporas/Erlenmeyer y se incubaron durante 7, 14, 21, 28 y 35 días a 20, 25 y 32 °C.

Finalizado cada período de incubación se determinó la producción de alternariol y alternariol monometil éter siguiendo la técnica propuesta por Visconti *et al.* (1986): a partir de 25 g. de semillas se extrajeron las toxinas con 75 ml de metanol, por agitación en un agitador de vaivén durante 1 hora. El homogeneizado se filtró y 30 ml del filtrado se trataron con sulfato de amonio acuoso al 20%. Se

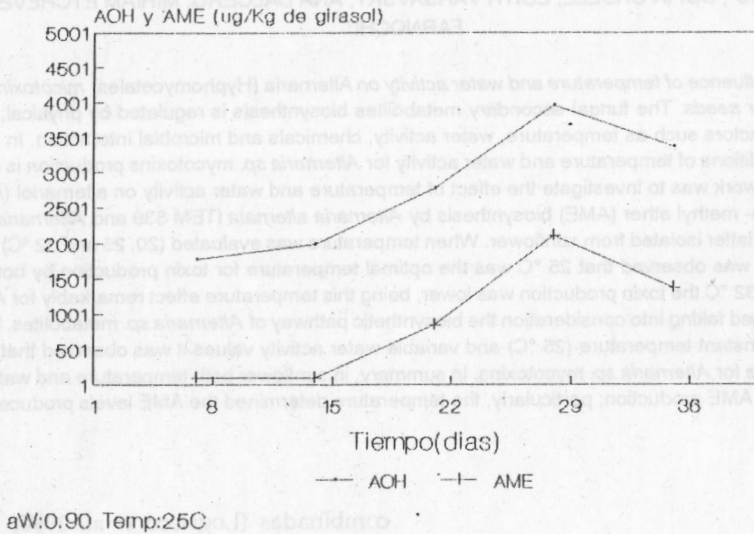


Fig. 1.-- Producción de AOH y AME sobre girasol por *A. alternata* ITEM 539.

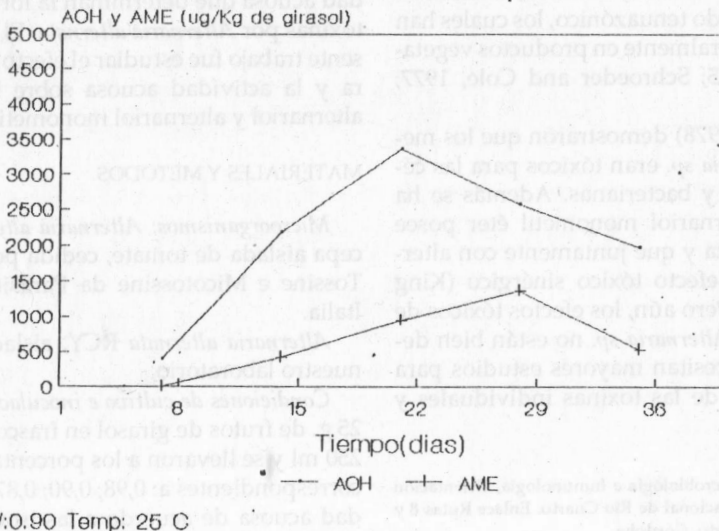
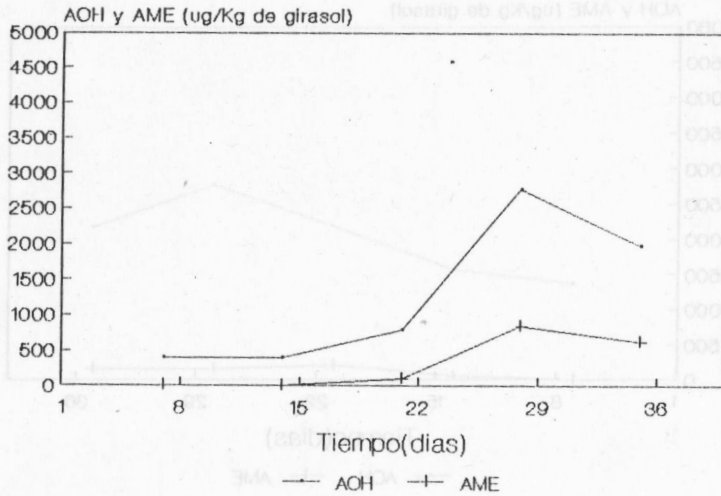
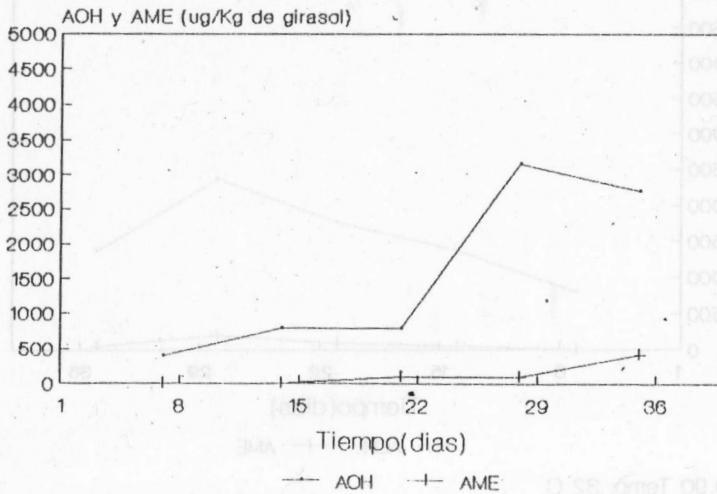


Fig. 2.-- Producción de AOH y AME sobre girasol por *A. alternata* RCY.



aW:0.90 Temp: 20C

Fig. 3.-- Producción de AOH y AME sobre girasol por *A. alternata* ITEM 539.



aW:0.90 Temp: 20C

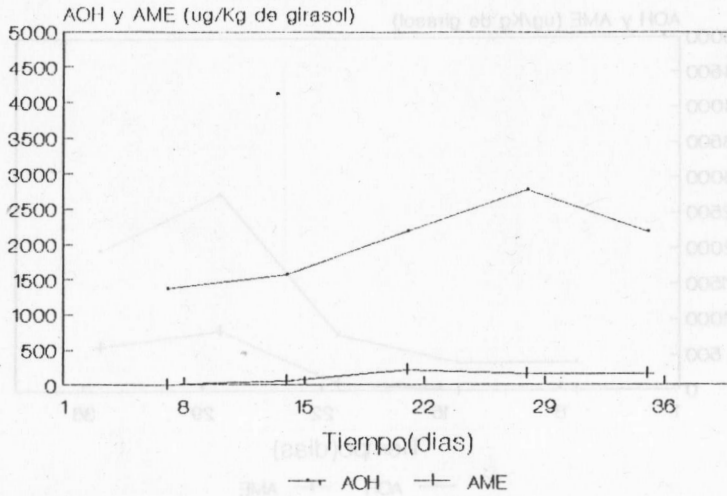
Fig. 4.-- Producción de AOH y AME sobre girasol por *A. alternata* RCY.

filtró el extracto y se desgrasó con hexano; la capa de hexano se descartó y las toxinas se extrajeron con cloroformo a partir de la fase acuosa. Los extractos cloroformícos se evaporaron a sequedad y se redisolieron en 200  $\mu$ l de cloroformo. Los extractos se analizaron por cromatografía en capa delgada, utilizando placas de silicagel (G60) de 0,25 mm de espesor sin indicador de fluorescencia.

El sistema de solventes fue cloroformo- acetona (88:12).

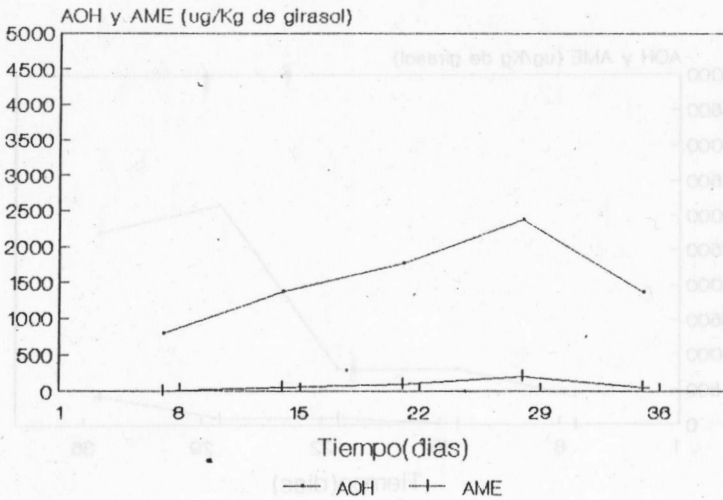
#### RESULTADOS Y DISCUSION

*Efecto de la temperatura:* cuando se analizó el efecto de la temperatura manteniendo la actividad acuosa constante en 0,90 se pudo comprobar que



aW:0.90 Temp:32 C

Fig. 5.-- Producción de AOH y AME sobre girasol por *A. alternata* ITEM 539.

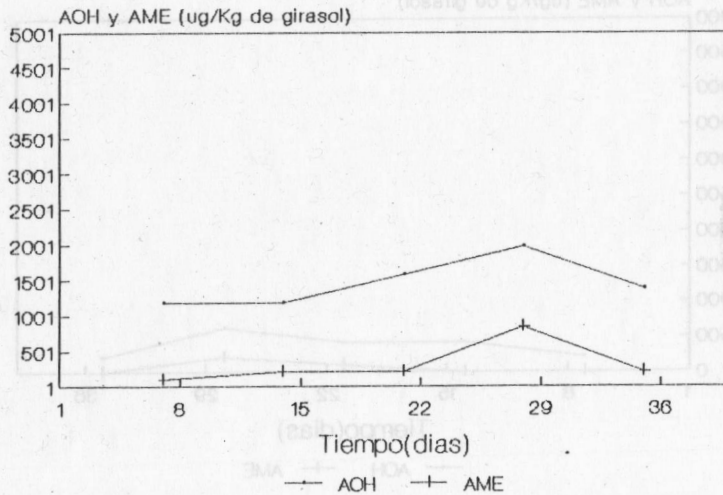


aW:0.90 Temp: 32 C

Fig. 6.-- Producción de AOH y AME sobre girasol por *A. alternata* RCY.

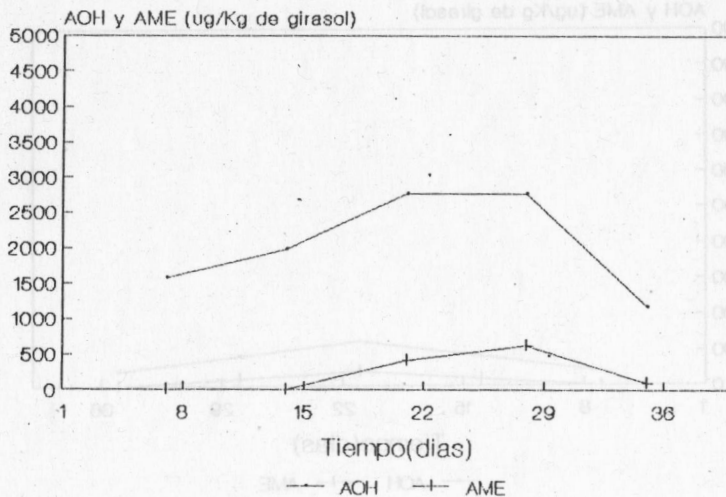
para ambas cepas la máxima producción de toxinas se obtuvo a 25 °C (durante todo el período de incubación). El valor máximo fue entre los 21 y 28 días, obteniéndose un total de toxina (AOH + AME) de 6.068  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con la cepa ITEM 539 y de 3.945  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con la cepa RCY. En ambos casos el 35% del total correspondía a AME (Fig. 1 y 2). A 20 °C y  $a_w$  0,90 la producción de ambas toxinas fue menor, el valor máximo alcanzado a los 28 días fue de 3.615  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AOH + AME con la cepa ITEM

539 y de 3.273  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con la cepa RCY. Se puede notar que la cepa RCY aislada de girasol, en estas condiciones, produce más AOH que la cepa ITEM 539, y que la producción de AME es mínima, siendo 23% del total y del 3%, respectivamente, y recién aparece a los 28 días de incubación (Fig. 3 y 4). A 32 °C y  $a_w$  0,90 la producción también disminuyó con respecto a 25 °C, el valor máximo alcanzado a los 28 días fue de 2.930  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AOH + AME con la cepa ITEM 539 y de 2.587  $\mu\text{g}/\text{kg}$  con la cepa



aW:0.98 Temp:25C

Fig. 7.-- Producción de AOH y AME sobre girasol por *A. alternata* ITEM 539.



aW:0.98 Temp: 25 C

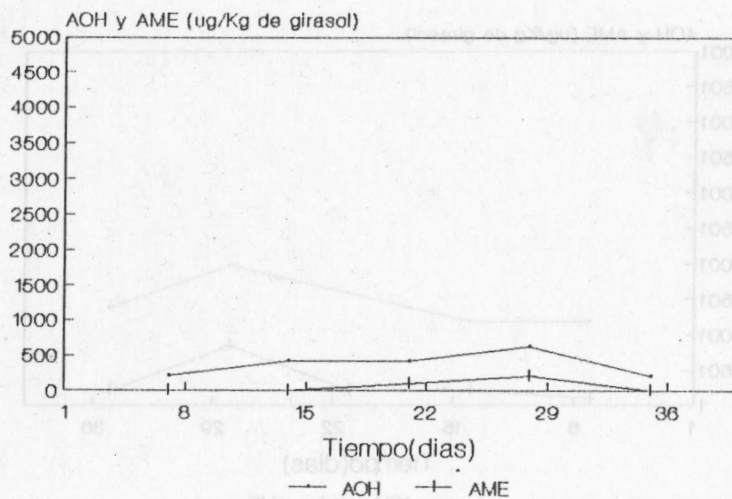
Fig. 8.-- Producción de AOH y AME sobre girasol por *A. alternata* RCY.

RCY. La producción de AME, en estas condiciones, es muy baja, el 5% del total en el caso de la primera cepa y del 8% para la cepa RCY (Fig. 5 y 6).

Es importante notar que, mantenidas en las mismas condiciones de temperatura y  $a_w$ , cada cepa se comporta diferente en cuanto a la producción de cada uno de los metabolitos, a excepción de las condiciones de 32 °C y  $a_w$  0,90 y 25 °C con un  $a_w$

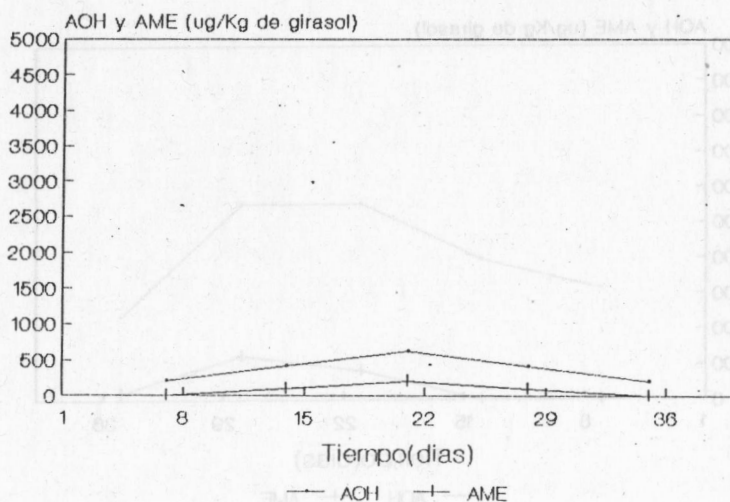
0,87, donde no se observó diferencia entre las cepas. Esto demuestra la importancia de las condiciones de desarrollo para la producción de toxinas, especialmente durante el almacenamiento, ya que pequeñas variaciones en dichos parámetros pueden modificar los niveles de toxinas producidos.

Como se puede observar se produce mayor cantidad de AME, en relación con el total de toxinas a



aW:0.87 Temp: 25 C

Fig. 9.-- Producción de AOH y AME sobre girasol por *A. alternata* ITEM 539.



aW:0.87 Temp: 25 C

Fig. 10.-- Producción de AOH y AME sobre girasol por *A. alternata* RCY.

25 °C, con respecto a las otras temperaturas. La mejor producción de AME a 25 °C podría explicarse considerando la vía biosintética, dado que AME deriva de AOH a través de una transformación llevada a cabo por la enzima O- metil transferasa cuya actividad óptima es a 28 °C (Stinson, 1985).

*Efecto de la actividad acuosa:* cuando se mantiene constante la temperatura a 25 °C y se varía la activi-

dad acuosa los resultados fueron los siguientes: con una  $a_w$  de 0,98, los valores máximo también se obtuvieron a los 28 días, en el caso de la cepa ITEM 539 fueron de 2.823  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AOH + AME y de 3.404  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para la cepa RCY. El porcentaje de AME fue del 30% y 19%, respectivamente. Con esta  $a_w$  se nota una marcada disminución en la producción de toxinas de la cepa ITEM 539 con respecto a

lo obtenido a 0,90, mientras que para la cepa RCY la disminución es mínima para AOH, pero es evidente para AME (Fig. 7 y 8). A  $a_w$  0,87 el crecimiento del hongo fue mínimo (detectado visualmente) y el valor máximo de toxinas alcanzado a los 28 días fue de 842  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de AOH + AME con la cepa ITEM 539 y con la cepa RCY el mismo valor, pero a los 21 días de incubación. En ambos casos la producción de AME es el 25% del total de toxinas (Fig. 9 y 10).

Cuando los frutos fueron mantenidos a una  $a_w$  de 0,70 no se observó crecimiento fúngico sobre ellos y tampoco hubo producción de toxinas.

Podemos concluir que la actividad acuosa óptima para la producción de los metabolitos de *Alternaria* sobre girasol es de 0,90. Comparando los datos obtenidos sobre girasol con aquellos de Magan y Lacey (1984) sobre trigo, podemos poner en evidencia la importancia del sustrato en la producción de toxinas, cuando las demás condiciones son iguales: Dichos autores encuentran que en trigo la máxima producción de toxinas se obtuvo a 25 °C pero a una  $a_w$  de 0,98, mientras que a la misma temperatura y a 0,90 de  $a_w$  detectaron mínimas concentraciones de toxina, datos que estarían contrapuestos con lo obtenido en girasol. A  $a_w$  de 0,98 ellos detectaron cantidades trazas de AOH y AME a 20- 25°C, los autores encuentran una mayor producción de AME que de AOH, esto puede depender de la cepa o del sustrato utilizado.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba (CONICOR) y a la IFS, quienes han apoyado económicamente a través de los subsidios N° 1539/90 y E/1896-1, la realización del presente trabajo.

#### BIBLIOGRAFIA

- DALCERO, A., S. CHULZE & E. VARSAVSKY. 1981. Aflatoxins and fungal flora in sunflower seeds. *Proc. Int. Symp. Mycotoxins* p. 434-441, El Cairo, Egipto.
- DALCERO, A., S. CHULZE; M. ETECHEVERRY, C. FARNOCCHI & E. VARSAVSKY. 1989. Aflatoxin in sunflower seeds: influence of *Alternaria alternata* on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* *Mycopathologia*, 108: 31-35.
- HARVAN, D. & R. W. PERO. 1976. The structure and toxicity of *Alternaria* metabolites *Adv. Chem. Series* 49: 344-355.
- KING, A. D. Jr. and J. E. SCHADE. 1984 *Alternaria* toxins, and their importance in food. *J. Food Protection* 47: 886-901.
- LACEY, J. 1989 Pre and Post harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. In: *Filamentous fungi in foods and feeds* (Moss, M. O.; Jarvis, B. and Skinner, F. Eds.) Blackwell Scientific Publications.
- LOGRIECO, A., A. BOTTALICO, M. SOLFRIZZO & G. MULE. 1990. Incidence of *Alternaria* species in grains from mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins. *Mycologia* 82 (4): 501-505.
- MAGAN, N. and J. LACEY, 1984. The effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and wheat grain. In: *Proceedings 5th Meeting on Mycotoxins in Animal and Human Health*, Edinburge (Moss, M. O. and M. Frank Eds.).
- POLLIO, N. 1985. Isotherms of Argentine varieties of sunflower seeds. *Int. Z. Lebensmittel Technol.* 6: 27-31.
- SAUER, D., L. SEITZ; R. BURROUGHS, H. MOHR; J. WEST; L. MILLERER & H. ANTHONY. 1978. Toxicity of *Alternaria* metabolites found in weathered sorghum grain at harvest. *J. Agr. Food Chem.* 26: 1380-1383.
- SCHROEDER, H. and R. COLE. 1977. Natural occurrence of alternariol in discolored pecans *J. Agr. Food Chem.* 25: 204-206.
- SEITZ, L., D. SAUER, H. MOHR & R. BURROUGHS. 1975. Weathered grain sorghum: natural occurrence of alternariol and storability of the grain. *Phytopathologia* 65: 1259-1263.
- STINSON, E. E. 1985. Mycotoxins their biosynthesis in *alternaria* *J. Food Protection* 48: 80-91.
- VISCONTI, A.; A. LOGRIECO & A. BOTTALICO. 1986. Natural occurrence of *Alternaria* mycotoxins in olive, their production and possible transfer into the oil, *Food Additives Contam.* 3: 323-330.