

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

ALTERACIONES BIOQUIMICAS Y MICROBIOLÓGICAS PRODUCIDAS
DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE TRIGO

SANDRA LEONOR AILAN

TESIS DOCTORAL

1988

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1° subsuelo
biblioteca@ciencias.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-8977/9 int. 129

DEX-53191

El presente trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Bioquímicas fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA), Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Doctora María Cristina Añón.

AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo financiero aportado para la realización del presente trabajo y al Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) por brindarme sus instalaciones e instrumental necesarios para la concreción del mismo.
- A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por la formación científica que me brindó.
- A la Dra. María Cristina Añón por su constante apoyo y dedicación en la dirección de este trabajo de tesis.
- A las Dras. Alicia Chaves y Cecilia E. Lupano por su paciente colaboración en el manejo de instrumental.
- A los Sres. Eduardo Mercatilli y Arturo Colavita por su responsabilidad y solidario apoyo técnico.
- A la Sra. Silvia A. Moya por su excelente desempeño en el mecanografiado de este manuscrito.
- Y a todos mis compañeros del CIDCA, amigos y familiares quienes de alguna manera me alentaron e impulsaron a la concreción del presente trabajo.

A mi esposo,
a mi hijo,
a mis padres.

INDICE

	Página
Abreviaturas	iv
 INTRODUCCION	
1. CONSIDERACIONES GENERALES	1
2. DESCRIPCION DEL GRANO DE TRIGO	2
2.1. Morfología	2
2.2. Composición química y función de las diferentes partes que componen el grano	3
3. IMPORTANCIA DEL TRIGO COMO PRODUCTO ALIMENTICIO	5
4. IMPORTANCIA DEL TRIGO EN ARGENTINA	6
4.1. Consideraciones generales	6
4.2. Exportaciones	7
5. TRATAMIENTO DEL GRANO POST-COSECHA	8
6. PERDIDAS POST-COSECHA	12
7. ALMACENAJE Y ACONDICIONAMIENTO DE LA PRODUCCION EN ARGENTINA	17
8. OBJETIVOS	20
 MATERIALES Y METODOS	
1. MUESTRAS EMPLEADAS	21
2. HUMECTACION DEL GRANO ORIGINAL	21
3. SEPARACION DEL GERMEN	22
4. MUESTREO	22
5. ALMACENAMIENTO "IN VIVO"	23
5.1. Recipientes	23
5.2. Gases intersticiales	25
6. ENSAYOS "IN VITRO"	26
6.1. Aislamiento de la flora fúngica	26
6.2. Siembra e incubación	27
6.3. Preparación de agar papa glucosa	28
6.4. Composición del agar extracto de malta	28
6.5. Humectante	28

	Página
7. PRUEBAS FISIOLÓGICAS	29
7.1. Germinación	29
7.2. Respiración	30
8. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE GERMEN	31
9. LIBERACIÓN DE METABOLITOS A TRAVÉS DE MEMBRANAS DE GERMEN	31
10. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	32
10.1. Contenido de humedad	32
10.2. Proteína soluble	33
10.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	33
10.3.1. Descripción del gel y de las soluciones empleadas	33
10.3.2. Preparación del gel separador	34
10.3.3. Preparación del gel apilador (stacking)	35
10.3.4. Patrones marcadores de peso molecular (PM)	35
10.3.5. Coloración de bandas	36
10.3.6. Equipo y condiciones de corrida	36
10.3.7. Análisis densitométrico	36
10.4. Cromatografía	37
10.4.1. Cromatografía gaseosa (CG)	37
10.4.2. Cromatografía en placa delgada (TLC)	37
10.4.2.1. TLC azúcares	37
10.4.2.2. TLC aminoácidos	38
10.4.2.3. Preparación de las placas y la cuba	38
10.4.2.4. Patrones marcadores de R_f	38
10.4.2.5. Siembra y corrida de la muestra	39
10.4.2.6. Revelado de las placas	40
10.4.2.7. Densitometría	40
 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
COMPORTAMIENTO DE LOS GRANOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO	
1. GERMINACIÓN	43
2. INVASIÓN FUNGICA DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE TRIGO	55
2.1. Aislamiento e identificación de las cepas fúngicas presentes en trigo almacenado	57
2.2. Influencia de las condiciones del entorno sobre el desarrollo fúngico	65
3. CAMBIOS METABÓLICOS ASOCIADOS CON LA CONTAMINACIÓN	73
3.1. Respiración	73
3.2. Proteínas	80
3.3. Metabolitos liberados a partir de germen de trigo	91
3.3.1. Liberación de glúcidos	93
3.3.2. Liberación de aminoácidos	104

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO FUNGICO EN MEDIOS DE
CULTIVO ARTIFICIALES

1. INFLUENCIA DE LA ATMOSFERA Y LA TEMPERATURA SOBRE EL DESARROLLO FUNGICO	111
1.1. Influencia del nitrógeno	111
1.2. Influencia del dióxido de carbono	115
2. EFECTOS DEL CAMBIO DE ATMOSFERA DURANTE EL DESARROLLO FUNGICO	117
3. INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD ACUOSA SOBRE EL DESARROLLO FUNGICO	121
CORRELACION DE RESULTADOS "IN VIVO" E "IN VITRO"	124
CONCLUSIONES	132
BIBLIOGRAFIA	134

ABREVIATURAS

Ala : alanina
Arg : arginina
Asn : asparagina
Asp : ácido aspártico
 a_w : actividad acuosa
c.h.: contenido de humedad
Cys : cistina
d : días
Fru : fructosa
GC : cromatografía gaseosa
Gln : glutamina
Glu : ácido glutámico
gluc: glucosa
ha : hectárea
Ileu: isoleucina
 K_m : constante de velocidad de crecimiento
Lag : tiempo de latencia
Leu : leucina
Lys : lisina
ME : 2-mercaptoetanol
P.A.: pro análisis
PM : peso molecular
ppm : partes por millón
Pro : prolina
Q.R.: cociente respiratorio
Ser : serina
SDS : dodecil sulfato de sodio
T : temperatura (°C)
 t_0 : tiempo inicial
Thr : treonina
TLC : cromatografía en capa delgada
Ton : tonelada
Tyr : tirosina
Val : valina

I N T R O D U C C I O N

1. CONSIDERACIONES GENERALES

El trigo es uno de los cultivos más antiguos, difundidos e importantes que se realizan, ocupando un papel preponderante en las necesidades nutricionales de la humanidad. Se trata de un pequeño grano perteneciente a la familia Gramineae, género *Triticum*, en el cual se incluyen todas las especies silvestres y cultivadas.

Los intentos de clasificar y agrupar las distintas especies datan de muy antiguo, son numerosos y se han ido perfeccionando a medida que se han profundizado los estudios morfológicos, citológicos, hibridológicos, etc. Entre los autores que más contribuyeron con sus conocimientos a esta clasificación, citamos a Hackel (1890) quien agrupó las distintas especies de la siguiente manera (Shellenberger, 1978):

vulgare
durum
compactum
turgidum
dicoccum
spelta
polonicum
monococcum

Las especies de importancia comercial son *Triticum aestivum*, *Triticum durum* ; *Triticum compactum*. En nuestro país se comercializan las especies *aestivum* y *durum*. La primera

corresponde al trigo pan, existiendo dos tipos: duro y semiduro. La clasificación en estos tipos se hace en base a su identificación varietal, siendo las variedades incluidas en cada tipo las que periódicamente determina la Junta Nacional de Granos. La segunda especie corresponde al trigo "candeal" o trigo "fideo", caracterizándose en nuestro país, desde hace ya algunos años, por una constante caída en el área dedicada a su cultivo. No obstante, actualmente se están realizando serios intentos para poder recuperar esta variedad.

2. DESCRIPCION DEL GRANO DE TRIGO

2.1. Morfología

El término cereal involucra una gran diversidad de pequeños granos pertenecientes a la familia Gramineae. El rasgo morfológico esencial que los distingue de otros pequeños granos es la manera en que el endosperma se ha desarrollado para formar el órgano de almacenamiento mayor del grano. A pesar de existir esta similitud entre todos ellos, podemos decir que se distinguen variaciones estructurales considerables, tanto en forma y tamaño de las semillas como en el número y distribución de las células que conforman los diferentes tejidos (Simmonds, 1978).

En el caso del trigo, podemos decir que se trata de un grano ovoide, redondeado en los vértices. Mide 5 a 8 mm de largo por 2,5 a 4,5 mm de ancho. Su peso varía para el *Triticum*

aestivum entre los 30 y 45 mg y para el *Triticum durum* entre los 34 y 46 mg en función de la variedad.

Presenta vellosidades en un extremo y un germen prominente en el extremo opuesto. A lo largo de la porción ventral, se distingue un canal o hendidura que es una invaginación de la aleurona y de las distintas capas que forman la cubierta (Kent, 1984a).

2.2. Composición química y función de las diferentes partes que componen el grano

El grano en sí está compuesto de una semilla y una cobertura o pericarpio. La semilla consta de endosperma, cobertura y germen en la proporción 81-84%, 14-16% y 2-3%, respectivamente. La Tabla I muestra la distribución de algunos componentes de trigo en las distintas porciones del grano.

Tabla I: Composición del grano de trigo (los componentes se expresan como porcentaje del total)

	ALMIDON	PROTEINAS	LIPIDOS	MINERALES
Pericarpio, testa, aleurona	0	20	30	67
Endosperma	100	72	50	23
Embrión, escutelo	0	8	20	10

El endosperma, al igual que en otros cereales, se halla muy desarrollado y es el órgano de almacenamiento más importante. Las células que lo forman contienen almidón y proteínas. La porción proteica se puede considerar como una fase continua

dentro de cada célula estando los gránulos de almidón lenticulares o esféricos dispersos en ella.

El endosperma está rodeado de una monocapa de células cúbicas que forman la aleurona. Esta representa el 7% del grano en peso y es continua salvo en la región del escutelo, sitio en que se adosa al germen. Químicamente la aleurona se halla compuesta por lípidos, proteínas y minerales. Entre los azúcares presentes se encuentran sacarosa, neocetosa y rafinosa. También es rica en niacina y presenta gránulos pequeños que contienen un compuesto fosforado, el ácido fítico.

El germen se halla constituido por el escutelo, el eje embrionario y el epiblasto. El escutelo funciona como órgano de almacenamiento, digestivo y de absorción. La parte superior del eje embrionario constituye el brote de la planta cuando la semilla germina. Este consta de algunas hojas rudimentarias unidas a un pequeño tallo. La porción inferior del eje corresponde a la raíz primaria.

El porcentaje de azúcares, lípidos y proteínas del germen varía dentro de amplios rangos de acuerdo al método de extracción y a la variedad estudiada.

En base al análisis bibliográfico realizado, podemos citar los siguientes valores (Hinton y col., 1953; Dubois y col., 1960; Shurpalekar y Haridas Rao, 1977; Kent, 1984b):

Azúcares : 16 - 23%

Lípidos : 6 - 11%

Proteínas: 24 - 30%

El rol que desempeñan la aleurona y el germen conjuntamente

es la movilización de las reservas alimenticias durante la germinación, desde el endosperma hacia el embrión (Simmonds, 1978).

El pericarpio, cobertura de protección del fruto, así como la cobertura de la semilla se componen a su vez de una serie de capas o tejidos diferenciados observables al microscopio.

3. IMPORTANCIA DEL TRIGO COMO PRODUCTO ALIMENTICIO

Las dos terceras partes de la población mundial consumen dietas que aportan menos de 2.500 calorías por día, compuestas principalmente de hidratos de carbono, con sólo una pequeña proporción de proteínas y minerales (Hall, 1971a). Los cereales se consideran alimentos de alta energía por ser la fuente principal de hidratos de carbono de la dieta. No obstante, el aporte proteico también es importante por proporcionar aminoácidos esenciales. La composición aminoacídica de proteínas de trigo no es constante para un rango dado de contenidos proteicos. En particular, se ha observado que el contenido del aminoácido esencial lisina está inversamente relacionado con el contenido proteico. Es notable además, el alto contenido de ácido glutámico y de prolina en granos y en harina así como también el bajo contenido de lisina.

Por el contrario, el valor biológico de la proteína del germen y de la aleurona es alto en comparación con el endosperma ya que el contenido de lisina por ejemplo, es 2 a 2,5 veces mayor en las proteína de estos tejidos que en las de endosperma. A pesar que la cantidad de proteínas en trigo puede variar entre

el 7 y el 22%, el valor promedio es mayor si se lo compara con otros cereales. En el caso de trigos argentinos, el rango para los distintos tipos oscila entre el 10 y el 16% (Kent, 1984c). Además de proteínas y carbohidratos, hallamos lípidos localizados principalmente en el germen, minerales como calcio y hierro en la cáscara y vitaminas como tiamina, riboflavina y nicotinamida (Mac Masters y col., 1978).

Para cualquier cereal es difícil obtener un único valor representativo para cada uno de sus componentes químicos. Lo que se determina es un rango de valores en función de las distintas especies analizadas para cada género. En valor promedio, la relación en gr% de proteínas, grasas y carbohidratos presentes en trigo es 11,5 , 2,0 y 70 respectivamente.

El aporte energético por cada 100 gr de porción comestible de este cereal es de 344 Kcal, lo cual pone de manifiesto la importancia del mismo como nutriente en las dietas (Hall, 1971a).

4. IMPORTANCIA DEL TRIGO EN ARGENTINA

4.1. Consideraciones generales

Argentina es el país productor más importante de "trigo pan" (*Triticum aestivum*) en Sud América. Este trigo se clasifica como "tipo duro" y se lo nombra de acuerdo a la región de la cual proviene como Rosafe, cultivado en Rosario y Santa Fé; Baril, en el centro de la provincia de Buenos Aires y Baruso, en la zona de Bahía Blanca (Kent, 1984c).

Otras regiones de importancia para este cultivo son el sur y centro de Córdoba, este de La Pampa, Entre Ríos y con menor volumen de siembra, las provincias de Santiago del Estero, Chaco y Tucumán.

Para poder estimar la importancia de este cereal en la economía del país, podemos evaluar los resultados de la campaña 1985-86:

Area sembrada: 5,7 millones ha (15.800 ha para trigo candeal o fideo y 3.684.200 para trigo duro o pan).

Area cosechada: 5,3 millones ha (representa el 2,3% del área mundial cosechada)

Producción (trigo pan): 8,7 millones Ton

Rendimiento promedio (trigo pan): 1.607 kg/ha

4.2. Exportaciones

Del total mundial de trigo exportable en 1985 (95,9 millones toneladas), el 25,9% fue aportado por los Estados Unidos, 17,7% por Canadá, 28,2% por países europeos, 16% por Australia y el 10% por Argentina.

El récord histórico argentino en materia de exportaciones se alcanzó en la campaña 82-83 con 10,2 millones de toneladas lo cual rindió 1.474.025 miles de dólares. En 1984, se exportaron 7,3 millones de toneladas con un valor de exportación de 922.012 miles de dólares. El principal comprador fue la Unión Soviética, adquiriendo casi el 40% del total señalado. Durante los 8 primeros meses del año 1985, casi el 90% del saldo

exportable de trigo pan se había colocado con la siguiente distribución: Unión Soviética 50%, Latinoamérica 21%, Mercado Asiático 16% y República Popular China 8,5%.

Durante los primeros 9 meses de 1986 los envíos de trigo pan fueron sólo algo más de 3,7 millones de toneladas. Se advirtió una transformación en el espectro de adquirentes donde la retracción soviética constituyó el rasgo más destacable. Brasil se convirtió en el principal adquirente con compras equivalentes al 17% de las ventas totales (Bolsa de Cereales de Buenos Aires, 1986).

5. TRATAMIENTO DEL GRANO POST-COSECHA

Luego de la cosecha, el grano queda en pilas a la intemperie, sobre la superficie del suelo o sobre plataformas. Esto constituye la forma inicial de almacenamiento en ciertos países donde la recolección coincide con el principio de una estación seca.

En general, las técnicas de almacenamiento siguen dos modalidades distintas: en sacos o a granel en gran diversidad de recipientes. La elección entre ambos procedimientos depende de factores tales como tipo de producto, duración del almacenamiento, valor del producto, clima, etc. El almacenamiento tradicional a granel utiliza graneros, fosos, cestos, recipientes de arcilla, etc; en tanto que los procedimientos modernos utilizan silos construídos en madera, ladrillo, hormigón o metal con capacidad variable de acuerdo a su uso.

Otra forma es almacenar el grano en silos total o parcialmente bajo el nivel del suelo de manera de resguardarlo de las fluctuaciones atmosféricas y parcialmente de la contaminación. Estos silos subterráneos están dotados de sistemas de ai reacción que permiten la recirculación de la atmósfera interior con mínima renovación de aire.

Como lugares de acopio central existen elevadores rurales y elevadores terminales. Los primeros se encargan de reunir la cosecha de la zona y los segundos reciben granos de los elevadores rurales, los almacenan y distribuyen de acuerdo a la demanda (Bailey, 1982).

Otro tipo de almacenamiento es el hermético, que se basa en crear una atmósfera cuyo contenido de oxígeno sea reducido, de manera tal que inhiba el crecimiento de insectos. Esas condiciones pueden obtenerse por la actividad de los propios insectos, o bien creando una atmósfera regulada artificialmente (Shejbal y Di Magio, 1976). En nuestro país, esta modalidad de acopio fue utilizada durante la Segunda Guerra Mundial debido al gran volumen de granos que no se podía exportar. Los experimentos previos realizados dieron resultados tan alentadores que el Gobierno construyó silos con una cabida de un millón de toneladas. A título experimental, se conservó de 1943 a 1956 un lote de trigo de 6.000 toneladas; las pérdidas fueron insignificantes y ese trigo se exportó a Europa en perfectas condiciones. Otro lote almacenado por 18 meses con contenido de humedad del 12-13%, no experimentó cambios de importancia. Los valores de proteína, gluten y maltosa se mantuvieron,

registrándose sólo una pequeña disminución de la germinación. Las pruebas de molienda y cocción fueron satisfactorias (Hyde y Burrell, 1982).

La Junta Nacional de Granos de la Argentina dispone de silos subterráneos de más de 2 millones de toneladas de capacidad. En la actualidad, muchos de estos silos no son ya herméticos, a pesar de haber sido construídos como tales (Hall, 1971c; Hyde y col., 1974).

El uso indiscriminado de insecticidas y fumigantes por largos períodos ha hecho posible el desarrollo de resistencia a los mismos por parte de los insectos. Consecuentemente, nuevos productos químicos ingresan al mercado obligando al hombre de campo a conocerlos y utilizarlos, lo cual requiere un cierto período de adaptación. Debido a esto, surgió la necesidad de crear formas no-químicas para el control de plagas, tales como atmósferas controladas y refrigeración (Hunter y Taylor, 1980; Elder, 1980). Ensayos de campo mostraron que la cantidad de pesticidas a usar era menor si el grano había sido previamente enfriado. El aumento de la población de insectos se inhibe en frío, inhibiéndose a su vez los mecanismos de resistencia a insecticidas y fumigantes (Thorpe y Elder, 1980).

No obstante, para la mayoría de los cereales resulta antieconómico enfriar la masa de granos para evitar el desarrollo de microorganismos o la iniciación de reacciones químicas. Debido a esto, se utiliza la desecación del grano con el fin de reducir el contenido de agua hasta un valor tan bajo que sea desfavorable para el desarrollo de contaminantes y evite

también la germinación de la semilla durante el tiempo de almacenamiento (Hall, 1971b).

El secado artificial con aire caliente afecta la calidad del grano pues puede conducir a la desnaturalización de proteínas y ácidos nucleicos, a la ruptura de membranas y eventualmente a modificaciones no enzimáticas del almidón y reacciones de Maillard (Steponkus, 1981; Multon, 1982b; Lupano y Añón, 1986).

Las altas temperaturas provocan daño por sobrecalentamiento o bien daño por secado rápido. En el primer caso, se reduce la calidad del grano para ciertos usos comerciales y en el segundo se obtienen granos de tipo quebradizos (Foster, 1982).

Como dijimos previamente, una forma eficaz de reducir los niveles de oxígeno en el silo es la introducción de atmósferas controladas. Si bien los costos de estas instalaciones son mayores que los de silos tradicionales, se evita la fumigación frecuente, eliminando así los riesgos potenciales de los residuos que estos dejan (Shejbal y col., 1973), el desarrollo de resistencia a insecticidas y los problemas de reinfestación puesto que la estructura del silo es hermética (Williams y col., 1980).

La utilización de atmósferas de nitrógeno permite el almacenamiento de granos particularmente cuando el contenido de humedad es superior al crítico. El tiempo de almacenamiento en nitrógeno técnico (contenido de oxígeno = 0,2 - 0,5%) es función de la proliferación fúngica, ya que si bien la velocidad

de desarrollo disminuye, no se inhibe por completo. Solamente el nitrógeno puro es capaz de detener el crecimiento totalmente (Shejbal, 1978; Quaglia y col., 1980).

Experiencias a nivel de laboratorio y en escala piloto mostraron que la preservación de trigo duro y blando en anoxia total o parcial mantenía la calidad tecnológica de la harina obtenida tanto en forma experimental como industrial, observándose un efecto protector del nitrógeno para granos de contenido de humedad medio y alto (Shejbal y col., 1974; Lombardi y col., 1976; Lombardi y col., 1980).

6. PERDIDAS POST-COSECHA

A medida que la población mundial aumenta el suministro de los alimentos es cada vez una prioridad más urgente. Un paso hasta hoy descuidado para conseguir este objetivo es el de reducir las mermas que ocurren entre la cosecha y el consumo.

Grandes pérdidas resultan del derrame, de la contaminación, de los ataques de insectos, hongos, pájaros, roedores y por el deterioro ocurrido durante el almacenamiento. Estas pérdidas son consecuencia de las variedades de los cultivos, de los tipos de plagas y de la combinación de las mismas, del clima, de los sistemas de cosecha, del procesamiento, del manejo y del mercadeo. La importancia de las pérdidas en algunas regiones varía también de acuerdo con el grado de disponibilidad de los alimentos y del poder adquisitivo de los varios sectores de la sociedad.

Las pérdidas sufridas por los cultivos en pie se notan inmediatamente al observarse menor cantidad de frutos o mieses a recoger. Por el contrario, las pérdidas durante el almacenamiento no son siempre evidentes y el deterioro de calidad rara vez se aprecia en toda su magnitud (Hall, 1971d).

Los granos dañados sufren transformaciones químicas en el interior de sus células. La hidrólisis y la oxidación de aceites provocan aumento de la acidez lo cual puede evolucionar hasta la ranciedad. Cuando se desarrollan bacterias y hongos, tanto en la planta en pie como durante el almacenamiento, ocurren pérdidas por descomposición de proteínas y por la interacción de los metabolitos de las esporas e hifas de los hongos sobre las células. En ciertas especies de hongos pueden formarse compuestos químicos tóxicos capaces de originar procesos carcinomatosos en el hígado de animales. Estos compuestos son metabolitos secundarios que se forman al final de la fase de crecimiento exponencial del hongo y que aparentemente carecen de significado en el crecimiento fúngico o en su fisiología. Uno de los postulados más aceptados dice que éstos se formarían cuando se acumulan precursores (metabolitos primarios) tales como acetato, malonato, piruvato y aminoácidos (Maggon y col., 1977).

Las infestaciones debidas a hongos, ácaros e insectos pueden causar también decoloración, llegando en algunos casos a la carbonización del producto, como consecuencia de un fenómeno de recalentamiento localizado en ciertos puntos del interior del silo. Existe además un gradiente de temperatura entre

las capas más externas de la masa de granos, que se hallan en contacto con aire frío. De esta manera se inicia una corriente de convección que traslada vapor de agua de las áreas cálidas del silo hacia la periferia. Las pequeñas áreas calientes localizadas en el interior también se acompañan de acumulación de vapor de agua producida por el metabolismo de hongos e insectos (Milner y col., 1947). Christensen (1957) señaló que el factor crítico para el crecimiento fúngico y el consecuente deterioro del cereal dependería del máximo contenido de agua existente en alguna porción considerable de granos.

Otra forma de ingresar humedad al silo es la cosecha y almacenamiento de granos diferentes con contenido de agua elevado. Así, un leve aumento de temperatura y humedad por alguno de los mecanismos antes citados establecería las condiciones adecuadas para el desarrollo de insectos, ácaros y hongos. Muchos insectos y ácaros viven a expensas de la flora fúngica, aumentando así la velocidad de multiplicación de los mismos. A su vez, ellos se encargan de diseminar la contaminación ya que son capaces de transportar en sus cuerpos hifas y esporas fúngicas de un lugar a otro del silo. Se genera así un proceso autoacelerado: la presencia de hongos e insectos aumenta la temperatura y humedad debido a un aumento de la velocidad de metabolismo de los mismos; esto hace que aumente la multiplicación de los organismos con el consiguiente aumento de temperatura (Sinha, 1958; Sinha y Wallace, 1965).

Además de los daños citados puede haber disminución de la capacidad germinativa, disminución de calidad para el

procesamiento y daño a nivel del germen (Christensen, 1957; Wallace y Sinha, 1962).

En general, las bacterias no se involucran en el deterioro de semillas durante el almacenamiento puesto que ellas requieren mayor disponibilidad de agua libre para crecer. No obstante existen algunas excepciones capaces de desarrollar, pertenecientes a las familias Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Micrococcaceae, Lactobacillaceae y Enterobacteriaceae. Mientras que los hongos de almacenamiento crecen bien en granos de contenido de humedad 14% o menor, las bacterias desarrollan sólo si el contenido de humedad es igual o mayor al 20%.

Se considera que las bacterias son causa de deterioro secundario mientras que los hongos son causa de deterioro primario. Bajo condiciones adecuadas, los hongos elevan la temperatura a valores cercanos a los 55°C aumentando también el contenido de humedad. De esta manera, sólo pueden crecer las bacterias termofílicas que a su vez elevan la temperatura hasta valores de 70-75°C.

Cuando el cereal almacenado a granel está muy húmedo, la superficie se llena rápidamente de hongos, de manera que el oxígeno es consumido alcanzando niveles mínimos. En estas condiciones, las bacterias anaeróbicas o microaerófilas desarrollan y fermentan el grano (Bulla Jr y col., 1978).

En relación a la flora fúngica, existe una clasificación arbitraria que agrupa a los hongos de acuerdo al momento en que éstos atacan al grano. Así se los divide en flora de campo y flora de almacenamiento. Los primeros invaden el grano

mientras éste se halla aún en la planta. Los más representativos son *Alternaria*, *Drechslera* (*Helminthosporium*) y *Fusarium*, siendo *Fusarium* el más agresivo. Entre la flora que desarrolla sobre y dentro de las semillas en las condiciones comúnmente halladas en los lugares de acopio, citamos los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, con variado número de especies (Christensen, 1957; Wallace y Sinha, 1962; Lacey y col., 1980).

El tipo particular de microorganismo que crece en el grano almacenado está determinado por la interacción de muchos factores tales como actividad acuosa del medio, temperatura, aireación, duración del almacenamiento, composición química del producto, presencia de materiales extraños, infestación por insectos y el uso de preservativos químicos. La abundancia relativa de cada tipo de microorganismo aislado del cereal puede utilizarse para conocer la historia de la muestra y las condiciones en que fue almacenada (Lacey y col., 1980).

Puede ocurrir también que la manipulación, la desecación y el transporte empeoren la calidad. Las pérdidas pueden ser de varias clases: de peso, de valor nutritivo, de calidad, de rendimiento como semilla, etc. La merma de peso durante el almacenamiento que no haya sido producida por disminución de la humedad, es una indicación de la pérdida del valor nutritivo. Esto puede ser consecuencia de la exposición del producto a condiciones extremas de temperatura y humedad durante el secado, la elaboración y el almacenamiento (Hall, 1971d).

7. ALMACENAJE Y ACONDICIONAMIENTO DE LA PRODUCCION EN ARGENTINA

El almacenamiento, transporte e industrialización y/o embarque son actividades que se influyen recíprocamente. Es por eso que toda esta infraestructura requiere de un alto grado de coordinación para su eficiente funcionamiento.

Según un informe elaborado a fines de 1985 por la Junta Nacional de Granos, la capacidad total de almacenaje del país supera los 31 millones de toneladas. Si se analiza la última década se observa un crecimiento anual del 6% en la capacidad instalada. Dado que la producción sufrió un crecimiento similar, la relación capacidad de almacenaje/producción no experimentó mejora apreciable. Tal relación oscila para Argentina en valores del 75 al 80%, siendo para otras naciones exportadoras de granos significativamente mayor (Estados Unidos: 123% y Canadá: 110%).

Además, aproximadamente el 20% de dicha capacidad está conformada por galpones precarios y tinglados que por sus limitaciones de estructura no permiten un resguardo por tiempo prolongado de la mercadería. De la capacidad total, 1,4 millones de toneladas corresponden a silos subterráneos que pertenecen a la Junta Nacional de Granos y que también tienen serias limitaciones en su uso. Finalmente, la capacidad de almacenaje en condiciones adecuadas se reduce al 60% del volumen producido en el último ciclo comercial.

Con respecto a la propiedad de las instalaciones de almacenaje, sólo el 8,2% pertenece al ente oficial (Junta Nacional

de Granos). A pesar de la difícil situación económica financiera que ha caracterizado los últimos años, el mayor volumen de granos almacenados lo absorbe el sector privado: acopiadores (34%), cooperativas (21%), industriales (13,5%) y productores no autorizados (20%).

Con respecto a la distribución zonal de las instalaciones, ocurre que en determinados momentos del año existen instalaciones de almacenaje ociosas en algunas zonas, mientras que en otras hay déficit. A pesar de ello el traslado de la producción hacia los silos vacíos resultaría antieconómico.

En la actualidad se cuenta con la aprobación de un crédito para la construcción y ampliación de plantas de almacenamiento de granos. Los proyectos aprobados significan una inversión cercana a los 32 millones de dólares que involucran nueve plantas nuevas a construirse y 26 ampliaciones de plantas ya existentes, incrementando así la capacidad de almacenamiento en 553.000 toneladas en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe.

La manera más eficiente de aprovechar la capacidad de almacenamiento es acondicionar bien el grano a ser ensilado. Ello es vital para asegurar la conservación de la mercadería en el tiempo sin desmedro en la calidad del grano producido. Un ejemplo típico es el uso de altas temperaturas en los procesos de secado, muchas veces utilizado para acelerar las tareas de secado de una infraestructura deficitaria.

Al disminuir el contenido de humedad del grano, disminuyen los riesgos de infección por microorganismos pero las altas

temperaturas afectan la calidad intrínseca del mismo (Lupano y Añón, 1986).

En naciones competidoras de la Argentina, es frecuente advertir que el productor dispone de equipos propios de acondicionamiento, lo cual le permite entregar su cosecha en condiciones adecuadas o bien almacenarla en sus propias instalaciones.

Del volumen total de trigo producido en el país, se seca artificialmente el 30,5% (valor promedio para las últimas 5 campañas), siendo la capacidad global de secado del orden de 45.000 toneladas/hora (Miró, 1986).

8. OBJETIVOS

El presente trabajo, realizado en escala de laboratorio, tuvo por objeto evaluar el grado de deterioro de trigo almacenado bajo distintas condiciones de humedad, temperatura y atmósfera. Para ello se estudió la evolución de ciertos indicadores biológicos tales como germinación, respiración, contaminación fúngica, patrón proteico y glucídico.

A su vez se estudió el comportamiento "in vitro" de las cepas fúngicas aisladas de granos, al ser incubadas en condiciones semejantes a las reinantes en el interior de los silos.

Finalmente, correlacionando los resultados obtenidos "in vivo" e "in vitro", se intentó optimizar las condiciones de temperatura, humedad y atmósfera tendientes a minimizar el daño por almacenamiento.

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S

1. MUESTRAS EMPLEADAS

Los ensayos se realizaron con granos de "trigo pan" (*Triticum aestivum*) pertenecientes al cultivar Marcos Juárez, INTA, Pergamino, cosechas 82-83, 83-84 y 85-86 y al cultivar Leones INTA, Pergamino, cosecha 83-84.

2. HUMECTACION DEL GRANO ORIGINAL

El trigo perteneciente a la cosecha 82-83 se almacenó con el contenido de humedad original con que se recibió el grano (10,2% en base húmeda). Los cultivares Marcos Juárez y Leones cosecha 83-84 se mezclaron en partes iguales y se humectaron en el laboratorio hasta alcanzar valores superiores a los originales (aproximadamente 16 y 22%). Para ello, la mezcla se dividió en 2 lotes que se colocaron en 2 recipientes distintos. Ambos se cubrieron con agua destilada y se dejaron en cámara a 4°C durante 10 minutos uno y durante 3 horas el otro (estos tiempos se determinaron previamente en base a los niveles de humedad que se deseaba alcanzar). Una vez concluido el tiempo establecido, el exceso de agua se volcó y los granos se secaron externamente con un paño. Posteriormente se los extendió sobre papel absorbente formando una capa delgada, expuestos al aire.

Los granos de la cosecha 85-86 se humectaron también para alcanzar valores aproximados del 14 y 19%. En este caso, el aumento de humedad se logró agregando a cada lote la cantidad

de agua destilada calculada para humectar una masa determinada de granos, para lo cual se tuvo en cuenta la siguiente relación:

$$m_{wa} = \left(\frac{M_M - M_O}{1 - M_M} \right) \cdot m_{SO} \quad (1)$$

donde:

M_{wa} : masa de agua a agregar (gr)

M_M : contenido de humedad al que se quiere llegar (expresado en base húmeda en forma decimal)

M_O : contenido de humedad del grano original (expresado en base húmeda en forma decimal)

m_{SO} : masa sólido original (gr)

Los granos quedaron en contacto con el agua durante un día a temperatura ambiente, con agitación frecuente de modo de alcanzar una distribución de humedad lo más homogénea posible.

3. SEPARACION DEL GERMEN

Se realizó en forma manual, bajo lupa, utilizando una pinza de punta fina.

4. MUESTREO

Se realizó a distintos tiempos según la cosecha:

Cosecha 82-83: 0, 15, 30, 60, 90, 120, 130 y 150 días.

Cosecha 83-84: 0, 10, 40 y 64 días.

Cosecha 85-86: 0, 11, 20, 55, 90, 123, 155 y 182 días.

Para ello se empleó una sonda de muestreo de 30 cm de largo, con 4 divisiones o compartimientos de 2 cm cada uno. De esta manera se logró recoger pequeñas muestras de granos provenientes de zonas diferentes a lo largo del eje de penetración de la sonda en el silo.

5. ALMACENAMIENTO "IN VIVO"

5.1. Recipientes

Se utilizaron recipientes cilíndricos de 2 kg (cosechas 82-83 y 83-84) y 7 kg (cosecha 85-86) de capacidad, adaptados para recibir flujos continuos o intermitentes de aire o nitrógeno. Los silos pequeños eran de vidrio con tapa a rosca y una vez cargados se sellaron con masilla para hacerlos lo más herméticos posible. Los silos más grandes se construyeron en material acrílico, con tapas también acrílicas que daban sello hermético al conjunto merced a un sistema de ajuste diseñado específicamente (Fig. 1). En ambos casos, el gas ingresaba desde la superficie por una tubuladura hasta el fondo del recipiente y salía por una abertura en la tapa del recipiente que a su vez servía para extraer muestras (en el caso de los recipientes pequeños). Los silos de mayor capacidad contaban con tres sitios (dos laterales y uno central) en la superficie para la obtención de muestras. También se incluyeron tres termocuplas cobre-constantán a diferentes niveles para registrar cambios térmicos.

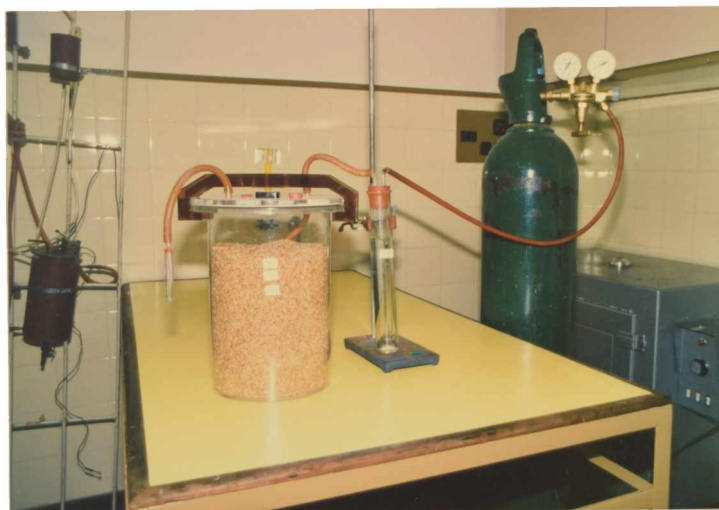
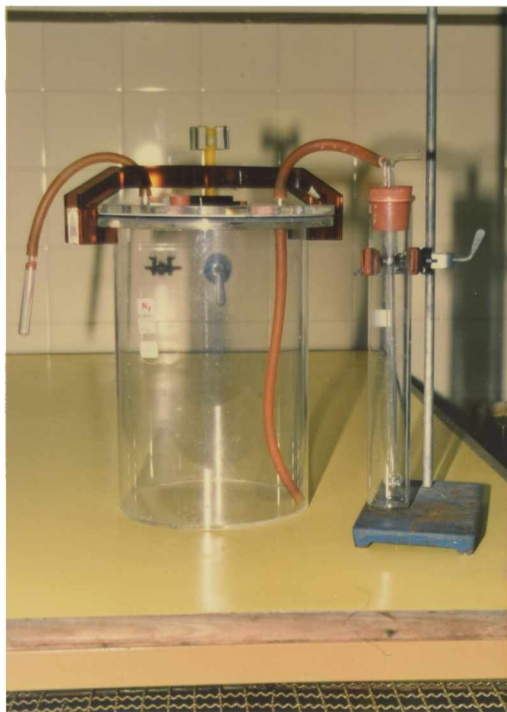


Figura 1: Silos acrílicos adaptados para el almacenamiento de trigo en atmósfera controlada (capacidad 7 kg).

Los silos se colocaron en cámara a 4°C o en cuarto calefaccionado a 20°C.

5.2. Gases intersticiales

En los silos control se forzó la circulación de aire conectando los mismos a pequeñas bombas aireadoras, mientras que los silos de atmósfera controlada se conectaron a tubos de nitrógeno Se de pureza 99,998% con 5 ppm de oxígeno provistos por AGA.

Tanto el aire como el nitrógeno fueron humectados antes de pasar al interior del silo mediante burbujeo en soluciones salinas saturadas lográndose alcanzar la humedad relativa de equilibrio con el contenido de humedad del grano almacenado. La Tabla II muestra las soluciones salinas seleccionadas que más se acercan a las condiciones de humedad relativa deseadas a las temperaturas de trabajo (Greenspan, 1977; Spencer, 1926).

Tabla II: Soluciones salinas utilizadas para mantener constante el grado de humedad

FASE SOLIDA	T (°C)	HUMEDAD (%)
NO_2Na	20	66,00
$\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20	90,00
BrK	4	85,00
NO_3NH_4	4	7,00
ClNH_4	20	79,20
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	4	82,42
ClK	4	87,70

6. ENSAYOS "IN VITRO"

6.1. Aislamiento de la flora fúngica

Las cepas fúngicas estudiadas se aislaron de muestras de trigo Marcos Juárez cosecha 84-85 por el método de cámara húmeda. Para ello se tomaron 100 semillas y se colocaron en placas de Petri a razón de 25 semillas en cada una. Las placas contenían tres discos de papel de filtro embebidos en 6 ml de agua destilada estéril. Las placas se dejaron a temperatura ambiente (aproximadamente 20°C) durante 7 días. Al cabo de ese tiempo se observaron bajo estereomicroscopio Zeiss con aumento máximo de 50x. Con la ayuda de una aguja histológica se tomaron muestras (esporas, micelio) de cada especie que presentara características macroscópicas diferentes y se sembraron en tubos inclinados de agar papa glucosa. Se incubaron en estufa a 27-30°C.

Para la identificación se realizaron microcultivos en agar papa glucosa. Para ello se prepararon cápsulas de Petri conteniendo un trozo de algodón y sobre el mismo un portaobjetos. El conjunto se esterilizó en estufa durante 2 horas a 160°C. En el momento de la siembra se montó sobre el portaobjetos un trozo de agar papa glucosa (área aproximada 1 cm²) que se cortó con bisturí estéril a partir de una cápsula de Petri previamente preparada con dicho medio. Con ansa recta, se tomó material de tubos inclinados que posefan las cepas aisladas y se sembraron las cuatro aristas del trozo de agar. Con pinza estéril se colocó encima un cubreobjetos previamente flameado

a la llama de un mechero Bunsen.

El algodón se embebió con 1 ml de agua destilada estéril y se llevó a incubar a 27-30°C.

Todas las maniobras se realizaron bajo flujo laminar para evitar la contaminación.

Luego de 48 horas de incubación, los portaobjetos se retiraron de las cajas y los microcultivos se observaron al microscopio con diferentes aumentos. En base a la morfología y tamaño de las esporas y teniendo en cuenta el aspecto macroscópico de las colonias, se pudieron identificar las distintas especies presentes.

6.2. Siembra e incubación

Las cepas aisladas a partir del trigo, se sembraron con ansa recta en forma puntual sobre placas de Petri conteniendo distintos medios de cultivo. Para el crecimiento en atmósfera distinta al aire, las placas ya sembradas se colocaron semiabiertas dentro de una jarra de anaerobiosis Oxoid.

El aire contenido en la misma fue desplazado por un flujo continuo de N_2 o CO_2 durante 30 minutos aproximadamente. Al cabo de este tiempo, la llave de salida se cerró aumentando levemente la presión en el interior de la jarra. Posteriormente se cerró la llave de entrada de gas, manteniéndose la sobrepresión durante el tiempo de incubación.

6.3. Preparación de agar papa glucosa

Doscientos gramos de papas peladas y cortadas se colocaron en un recipiente con 500 ml de agua destilada y se hizo hervir durante 1 hora. Luego se solubilizaron 17 gr de agar-agar en 500 ml de agua destilada caliente y se mezclaron al agua de cocción (previa decantación de las papas). Doscientos gramos de glucosa se disolvieron en agua destilada y se agregaron a la mezcla anterior. Se llevó el volumen a 1 litro y se ajustó el pH. Luego se filtró, entubó y esterilizó en autoclave a 120°C durante 15 minutos.

6.4. Composición del agar extracto de malta

Se utilizó el producto comercial de Merck, número de catálogo 5398. Su composición es la siguiente:

Extracto de malta	30 gr	} Composición en g/litro de agua
Peptona de harina de soja	3 gr	
Agar-agar	15 gr	

pH 5,6 ± 0,1

6.5. Humectante

El medio base utilizado fue agar extracto de malta (Merck N° 5398) y como humectante se utilizó glicerol P.A. (Merck N° 4094). La cantidad de glicerol necesario para producir

diferentes niveles de actividad acuosa (a_w) se obtuvieron de los gráficos de Northolt (1979). Los valores de a_w utilizados fueron 0,777; 0,805; 0,835; 0,907 y 0,999. La isoterma de sorción a 25°C para trigos argentinos viene dada por la siguiente ecuación (González y col., 1986):

$$M = 9,25 \left(\frac{a_w}{1-a_w} \right)^{0,49} \quad (2)$$

donde M: contenido de humedad, expresado en porcentaje de base seca

a_w : actividad acuosa

Teniendo en cuenta esta expresión, el rango de a_w al cual se ajustaron los medios de cultivo se correspondería con contenidos de humedad para los granos del 14,5% a valores superiores al 22% (expresado en base húmeda).

Los medios con glicerina se esterilizaron en autoclave.

7. PRUEBAS FISIOLÓGICAS

7.1. Germinación

La capacidad germinativa se evaluó de acuerdo al método de Wallace y Sinha (1962). El ensayo se realizó sobre 100 semillas de trigo que se distribuyeron en 4 cajas de Petri (25 por caja). Las cápsulas de Petri se prepararon conteniendo 3 papeles de filtro, y el conjunto así se esterilizó en estufa. Luego se agregaron 6 ml de agua destilada estéril para mantener

el tenor de humedad durante el período de germinación. Luego de plaquear las semillas, las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante 1 semana. Transcurrido este tiempo, se contabilizó el número de semillas germinadas sobre el total de 100 examinadas.

7.2. Respiración

Se utilizó un respirómetro diferencial Gilson de válvula simple. El ensayo se realizó por duplicado sobre 20 granos que se colocaron en los recipientes correspondientes a la muestra, previamente esterilizados. Los granos se humectaron con 3 ml de agua destilada y los recipientes se sumergieron en un baño a 30°C. El sistema quedó abierto durante aproximadamente 15 minutos, hasta alcanzar el equilibrio térmico y gaseoso. Luego las válvulas se cerraron de manera que todo intercambio gaseoso (consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono) se registró en los micrómetros digitales unidos a los recipientes con muestras. Para poder medir exclusivamente el consumo de oxígeno, el dióxido de carbono liberado se retuvo sobre solución de KOH al 10% que se colocó a razón de 0,2 ml por muestra. Esta solución alcalina, se absorbió sobre un trozo de papel de filtro plegado que se colocó en un compartimiento central de los recipientes que contenían las semillas. Las variaciones de presión de vapor se registraron a intervalos primero de 15 y luego de 30 minutos durante un período máximo de 4 horas.

Los micrómetros digitales, calibrados en microlitros, se

ajustaron luego de un período en el cual el tejido respiró y por ende desplazó el líquido manométrico del nivel original. Los valores leídos indicaron directamente el volumen de gas (en μl) consumido o producido en cada recipiente en las condiciones del ensayo.

La velocidad de consumo de oxígeno se obtuvo de la pendiente de la curva μl de oxígeno consumidos/gr versus tiempo.

8. EXTRACCION DE PROTEINAS DE GERMEN

Se utilizó NaCl al 5% en la relación solvente:sólido 25:1. La extracción se realizó en tubos de centrifuga de 10 ml, donde los embriones en contacto con el extractante se trituraron con varilla y se dejaron en contacto con la solución durante 3 horas. Luego se centrifugó a 10.000 xg durante 20 minutos. La extracción se practicó a 0-4°C.

9. LIBERACION DE METABOLITOS A TRAVES DE MEMBRANAS DE GERMEN

Se adaptó el método de Harman y col. (1972) para 150 embriones de trigo separados manualmente del grano. Estos se colocaron en tubo de hemólisis y se les agregó glicerol 0,5M en la proporción 70 mg germen : 1 ml solvente. Se colocaron en agitador mecánico durante 2 horas a 20°C. Luego de este tiempo, se separó el sobrenadante turbio y se guardó en heladera hasta su centrifugación a 3.000 x g, durante 10 minutos (se trabajó a 4°C). Una vez clarificado el sobrenadante, se guardó en

pequeños tubos plásticos con tapa hermética y se los congeló a -70°C hasta su posterior análisis.

Entre los metabolitos liberados en este ensayo se hallaron azúcares y aminoácidos.

10. DETERMINACIONES ANALITICAS

10.1. Contenido de humedad

El ensayo se realizó sobre granos enteros, determinando el peso de los mismos antes y después de secarlos en estufa a 130°C durante 2 horas (Giner y Calvelo, 1987). La diferencia de pesada corresponde al agua cedida por la muestra. El contenido de humedad por ciento se expresó como gr agua/100 gr muestra húmeda (base húmeda).

La correlación con el método convencional de la AOAC (1980) viene dado por la siguiente expresión (Giner y Calvelo, 1987):

$$M_R = \frac{0,9258 M_C + 0,0279}{1,0279 - 0,0742 M_C} \quad (3)$$

donde,

M_R : contenido de humedad decimal, en base húmeda, determinado por la técnica de la AOAC

M_C : contenido de humedad decimal, en base húmeda, determinado en este trabajo.

10.2. Proteína soluble

Se siguió el método de Lowry y col. (1951) empleando albúmina bovina como standard para la curva de calibración.

10.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

10.3.1. Descripción del gel y de las soluciones empleadas

Se realizó a pH 8,3 en placas verticales (180 x 140 x 0,7 mm) de acuerdo al sistema de buffer discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970; Laemmli y Favre, 1973). El gel se realizó a una concentración del 12,6% en el separador y del 5,3% en el gel apilador (stacking).

Las soluciones empleadas fueron:

- Solución madre de acrilamida-bisacrilamida (N,N'-metilen-bis-acrilamida):

Se prepara una solución acuosa de acrilamida al 30% p/v y bisacrilamida al 0,8% p/v.

- Solución buffer para preparar el gel apilador (stacking):

Se prepara una solución de Tris 0,5M (Tris-hidroximetil aminometano) con SDS al 0,4% y TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilen diamina) al 0,4%. Se lleva a pH 6,8 con HCl 1N.

- Solución buffer para preparar el gel separador:

Preparar una solución de Tris 1,5M con SDS al 0,4% y TEMED al 0,4%. Se lleva a pH 8,8 con HCl 1N.

- Solución buffer de corrida:

La solución se compone de Tris 0,05M, glicina 0,384M y SDS al 0,1%. Se llevó a pH 8,3 con HCl 1N.

- Solución buffer para preparar la muestra:

La solución se compone de Tris 0,01M, EDTA 0,001M, SDS 1%, mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol. Se llevó a pH 8,0 con HCl 1N. El mercaptoetanol puede o no agregarse a esta solución.

- Solución fijadora:

Se prepara una solución acuosa de isopropanol al 25% y ácido acético al 10%.

- Solución colorante:

Se compone de Comassie Brilliant Blue R-250 en solución acuosa al 7% de ácido acético glacial.

- Solución decolorante:

Se mezclan metanol al 25% con ácido acético al 10% en agua destilada.

10.3.2. Preparación del gel separador

Para preparar dos placas se requieren los siguientes volúmenes:

Buffer para gel separador	11,5 ml
Solución madre de acrilamida-bisacrilamida	18,8 ml
Agua destilada	6,4 ml
Persulfato de amonio al 0,32%	9,2 ml

La solución acuosa de persulfato de amonio (catalizador de la reacción) se prepara en el momento de ser utilizada.

10.3.3. Preparación del gel apilador (stacking)

Los volúmenes requeridos para preparar 2 placas son los siguientes:

Buffer para gel apilador (stacking)	2,5 ml
Solución madre de acrilamida-bisacrilamida	1,5 ml
Glicerol	2,0 ml
Agua destilada	4,7 ml
Persulfato de amonio al 0,32%	1,3 ml

10.3.4. Patrones marcadores de peso molecular (PM)

Para poder evaluar el peso molecular de las bandas obtenidas de las diferentes muestras, se sembró en cada placa una mezcla de proteínas de peso molecular conocido (Kit Pharmacia)

	PM (daltons)
fosforilasa B	94.000
seroalbúmina bovina	67.000
ovoalbúmina	43.000

anhidrasa carbónica	30.000
inhibidor de tripsina de soja	20.100
α -lactalbúmina	14.400

La curva de calibración se trazó graficando el log PM versus distancia recorrida.

10.3.5. Coloración de bandas

Para poner en evidencia las diferentes bandas, los geles se sumergieron en solución fijadora durante 2 horas, luego en solución colorante 24 horas y finalmente se colocaron en solución decolorante hasta aclarar completamente el fondo.

10.3.6. Equipo y condiciones de corrida

Se utilizó un equipo para electroforesis Pharmacia GE-2/4 al cual se conectó la fuente de poder. La intensidad máxima por placa se reguló en 25 mA y el tiempo total de corrida fue de aproximadamente 24 horas.

10.3.7. Análisis densitométrico

Luego de coloreados, los geles se densitografiaron en un equipo Shimadzu de doble longitud de onda TLC Scanner CS-910. La longitud de onda seleccionada para la muestra y la referencia fueron 570 nm y 395 nm, respectivamente.

10.4.2.2. TLC aminoácidos

- Solvente de corrida: 1-butanol 35 ml
 acetona 35 ml
 ácido acético 7 ml
 agua destilada 23 ml

- Revelador: Solución madre: disolver 3,75 gr de ninhidrina en 50 ml de una mezcla de 25 ml 1-butanol y 25 ml de acetona.

 Solución para revelado: tomar 7 ml de la solución madre y agregar sobre 150 ml de metanol.

10.4.2.3. Preparación de las placas y la cuba

Las placas se activaron en estufa, previamente a la siembra, durante 1 hora a 110°C. La cuba se dejó en saturación con el solvente de corrida. Para ello, una hoja de papel de filtro se adosó sobre una cara de la cuba y se dejó que pescara en el solvente de corrida. Una vez saturada la cuba, se retiró el papel y se colocó la placa ya sembrada.

10.4.2.4. Patrones marcadores de R_f

Tanto para el análisis de azúcares como de aminoácidos se prepararon patrones individuales de concentración conocida (1 mg/ml) y mezcla de aminoácidos o azúcares de manera que la concentración final de cada uno de ellos en la mezcla fuera de 1 mg/ml.

De esta manera se pudieron obtener los R_f de cada azúcar o aminoácido patrón e identificar así por comparación aquéllos obtenidos en las muestras. El R_f se calculó de acuerdo a la siguiente relación:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por la mancha}}{\text{distancia recorrida por el frente}}$$

En las condiciones de corrida, los R_f de los patrones de azúcares fueron

rafinosa : 0,21

sacarosa : 0,59

glucosa : 0,65

fructosa : 0,66

y los R_f de patrones de aminoácidos fueron los siguientes:

histidina : 0,063

prolina : 0,517

cistina : 0,113

alanina : 0,541

lisina : 0,132

treonina : 0,570

arginina : 0,160

valina : 0,717

asparagina: 0,352

metionina : 0,794

ácido aspártico: 0,365

leucina : 0,799

glutamina : 0,456

tirosina : 0,799

serina : 0,472

isoleucina : 0,821

hidroxiprolina : 0,497

fenilalanina: 0,849

ácido glutámico: 0,503

triptofano : 0,852

10.4.2.5. Siembra y corrida de la muestra

Las muestras se sembraron en forma puntual a 2 cm del

borde inferior de la placa. Los volúmenes sembrados en cada caso fueron:

	Volumen sembrado
muestra para azúcares	6 μ l
patrones individuales azúcares	6 μ l
patrón mezcla azúcares	6 μ l
muestra para aminoácidos	10 μ l
patrones individuales aminoácidos	1 μ l
patrón mezcla aminoácidos	1 μ l

La corrida duró aproximadamente 3 horas y 30 minutos; la placa se secó por aire caliente y se corrió por segunda vez en la misma dirección. Con esto se logró una mejor resolución de la muestra.

10.4.2.6. Revelado de las placas

Una vez concluida la corrida, la placa se secó por aire caliente y se sumergió en un recipiente conteniendo el líquido revelador. La inmersión fue instantánea, luego de lo cual se secó y llevó a estufa a 100-110°C hasta desarrollar color en caso de los azúcares y por 10 minutos, en caso de los aminoácidos.

10.4.2.7. Densitometría

Las placas se leyeron en un espectrofotodensitómetro Shimadzu de doble longitud de onda Scanner CS-910, unido a un

registrador C-RIA Chromatopac. Las lecturas se hicieron por reflexión, con barrido lineal a una velocidad de 20 mm/min. La longitud de onda para la muestra fue de 720 nm y para la referencia de 425 nm en el caso de los azúcares y de 435 nm para la muestra y 750 nm para la referencia en el caso de los aminoácidos.

R E S U L T A D O S

Y

D I S C U S I O N

Los resultados que comentaremos en las próximas secciones fueron obtenidos durante el almacenamiento de trigo en silos a escala de laboratorio. El mismo se realizó tanto en atmósfera de aire como de nitrógeno con contenidos de oxígeno del orden de 0,06% a dos temperaturas. El seguimiento de la calidad del grano se llevó a cabo midiendo la evolución de los siguientes parámetros: germinación del grano, tiempo de aparición de contaminantes observables dentro del silo, determinación de la flora fúngica presente en los granos pero no visible macroscópicamente (esporas e hifas), respiración del grano, alteraciones proteicas a nivel de germen y metabolitos liberados a partir de embrión que actuarían como indicadores del estado metabólico del grano.

Discutimos a continuación cada uno de estos parámetros detalladamente.

COMPORTAMIENTO DE LOS GRANOS DURANTE EL ALMACENAMIENTO

1. GERMINACION

La calidad del grano de trigo puede determinarse evaluando diferentes factores tales como germinación, respiración, contaminación, etc. Puesto que la capacidad germinativa es el indicador más sensible del deterioro de la semilla (Shejbal, 1979), se eligió este parámetro para poder evaluar la calidad de trigo almacenado bajo distintas condiciones de atmósfera y temperatura.

Las figuras 2-5 muestran la variación de la capacidad germinativa en función del tiempo de almacenamiento. Los valores se expresaron en cada caso en forma relativa al tiempo inicial. Los contenidos de humedad analizados fueron 10, 14, 16, 19 y 22%. En las curvas a 20°C (Fig. 2 y 3) se incluyeron valores obtenidos por diferentes autores para otros contenidos de humedad (17, 18 y 21%). Estos también se expresaron en forma relativa al valor inicial.

Las curvas muestran claramente la dependencia del poder germinativo con el contenido de humedad del grano y con la temperatura y atmósfera de almacenamiento.

El tratamiento a 20°C, tanto en aire como en nitrógeno, muestra que la capacidad germinativa disminuye en primer término para granos almacenados con contenidos de humedad muy elevados (mayores a 16%) y luego para aquellos de contenido de humedad inferior. A igual contenido de humedad, la velocidad de decaimiento fue mayor para aquellos granos almacenados en aire que para aquellos almacenados en nitrógeno. De esta manera, el

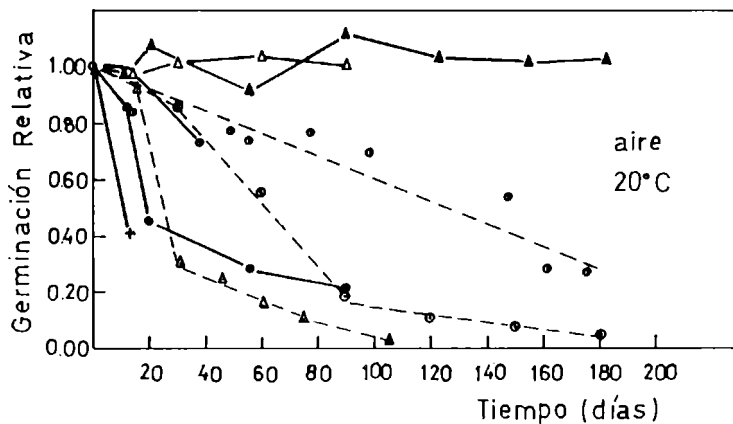


Figura 2: Variación de la capacidad germinativa de trigo almacenado en aire a 20°C con distinto contenido de humedad (Δ 10%; ▲ 14%; ○ 16%; ● 19%; + 22%). Los valores se expresaron en forma relativa al valor inicial.

La figura incluye datos bibliográficos (línea de trazos) para trigo almacenado con los siguientes contenidos de humedad: ● 17% (Shejbal y col., 1974); ○ 18% (Glass y col., 1959); Δ 21% (Abramson y col., 1980).

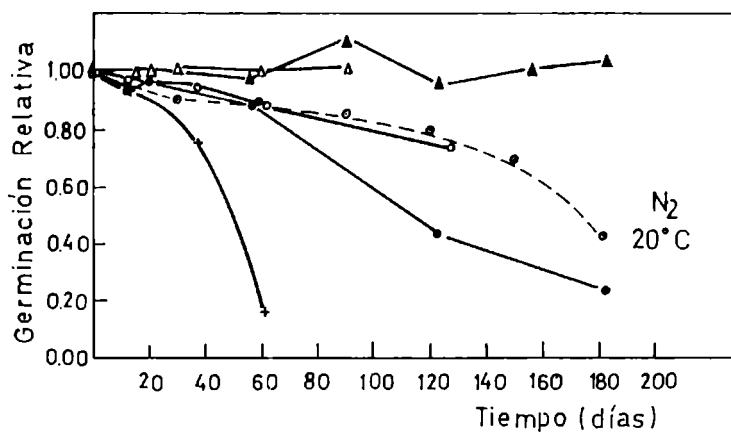


Figura 3: Variación de la capacidad germinativa de trigo almacenado en nitrógeno a 20°C con distinto contenido de humedad (Δ 10%; ▲ 14%; ○ 16%; ● 19%; + 22%). Los valores se expresaron en forma relativa al valor inicial.

En línea de trazos se incluye el dato bibliográfico para trigo de contenido de humedad 18% (○) (Glass y col., 1959).

tiempo necesario para que la germinabilidad de trigo almacenado con contenidos de humedad del 22 y del 19% descienda al 50% de su valor original fue de 12 y 20 días respectivamente, para granos almacenados en aire a 20°C y de 50 y 115 días para aquellos mantenidos en nitrógeno.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con los informes previamente por Glass y col. (1959) quienes observaron que el deterioro de trigo almacenado a 20°C era mucho más lento en muestras mantenidas en nitrógeno que en aquellas mantenidas en aire.

Los valores bibliográficos insertados en las figuras 2 y 3 siguen un comportamiento semejante a los obtenidos en el presente trabajo. No obstante, se debe tener en cuenta que tanto el trigo utilizado como las condiciones de almacenamiento no fueron exactamente las mismas en todos los casos.

Con relación a la temperatura del grano durante el almacenamiento, Glass y col. (1959) hallaron que la velocidad de cambios biológicos en granos preservados en nitrógeno a 20°C era mucho menor que la correspondiente a granos mantenidos en igual atmósfera pero a 30°C. Esto señala el fuerte efecto que ejerce la temperatura. Las dos temperaturas ensayadas en este trabajo fueron 4 y 20°C, pero el efecto hallado fue el mismo que señalaron estos autores para temperaturas más elevadas. Cabe destacar que dicho efecto no sólo se verificó en atmósfera de nitrógeno sino que también se observó en aire. De la comparación de las figuras 2 y 4 y de las figuras 3 y 5 surge que independientemente de la atmósfera, la disminución de temperatura de 20°C a 4°C

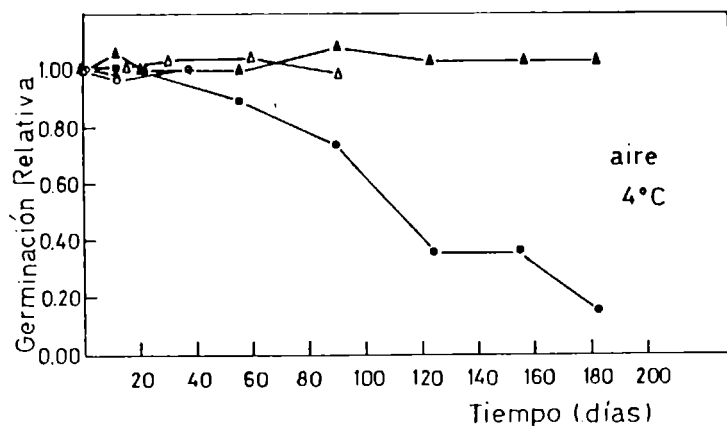


Figura 4: Variación de la capacidad germinativa de trigo almacenado en aire a 4°C, con distinto contenido de humedad.

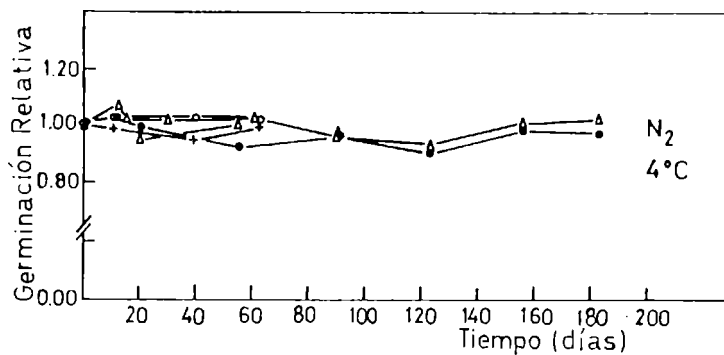


Figura 5: Variación de la capacidad germinativa de trigo almacenado en nitrógeno a 4°C, con distinto contenido de humedad.

Nota: En las figs. 4 y 5 los valores de germinación se expresaron en forma relativa al valor inicial.

(Δ) c.h. 10%; (▲) c.h. 14%; (○) c.h. 16%; (●) c.h. 19%;
(+) c.h. 22%.

mantuvo prácticamente invariable la capacidad germinativa durante seis meses para trigos de contenido de humedad menor o igual al 16%. Para trigo almacenado en atmósfera de nitrógeno, esto se verificó para contenidos de humedad hasta el 19%, pero para contenidos de humedad superiores (22%) sólo se mantuvo durante los dos primeros meses de almacenamiento. Al cabo de cuatro meses, la capacidad germinativa de este trigo había descendido un 20% de su valor original.

De esta manera es posible afirmar que en nitrógeno la viabilidad del grano se preserva mucho mejor que en aire. A su vez, el descenso de la temperatura en atmósfera de nitrógeno protege aún más la calidad del trigo, especialmente cuando el tenor de agua del cereal es elevado (mayor o igual al 22%).

Si observamos ahora lo sucedido durante el almacenamiento en aire podemos decir que a 4°C la capacidad germinativa se preservó por más tiempo, especialmente para trigos de contenido de humedad elevado (por ejemplo 19%). De esta manera, el tiempo necesario para que la capacidad germinativa disminuyera al 50% de su valor original fue de 20 días para trigo almacenado a 20°C y de 114 días para el almacenado a 4°C.

Podemos estudiar ahora la variación de la capacidad germinativa exclusivamente en función del contenido de humedad del grano, que incide directamente sobre la conservación del cereal.

La Figura 6 muestra la variación de la capacidad germinativa a los 30, 60, 90 y 120 días de almacenamiento de trigo con contenido de humedad variable (10, 14, 16, 19 y 22%). Los valores se expresaron en forma relativa al valor inicial; algunos

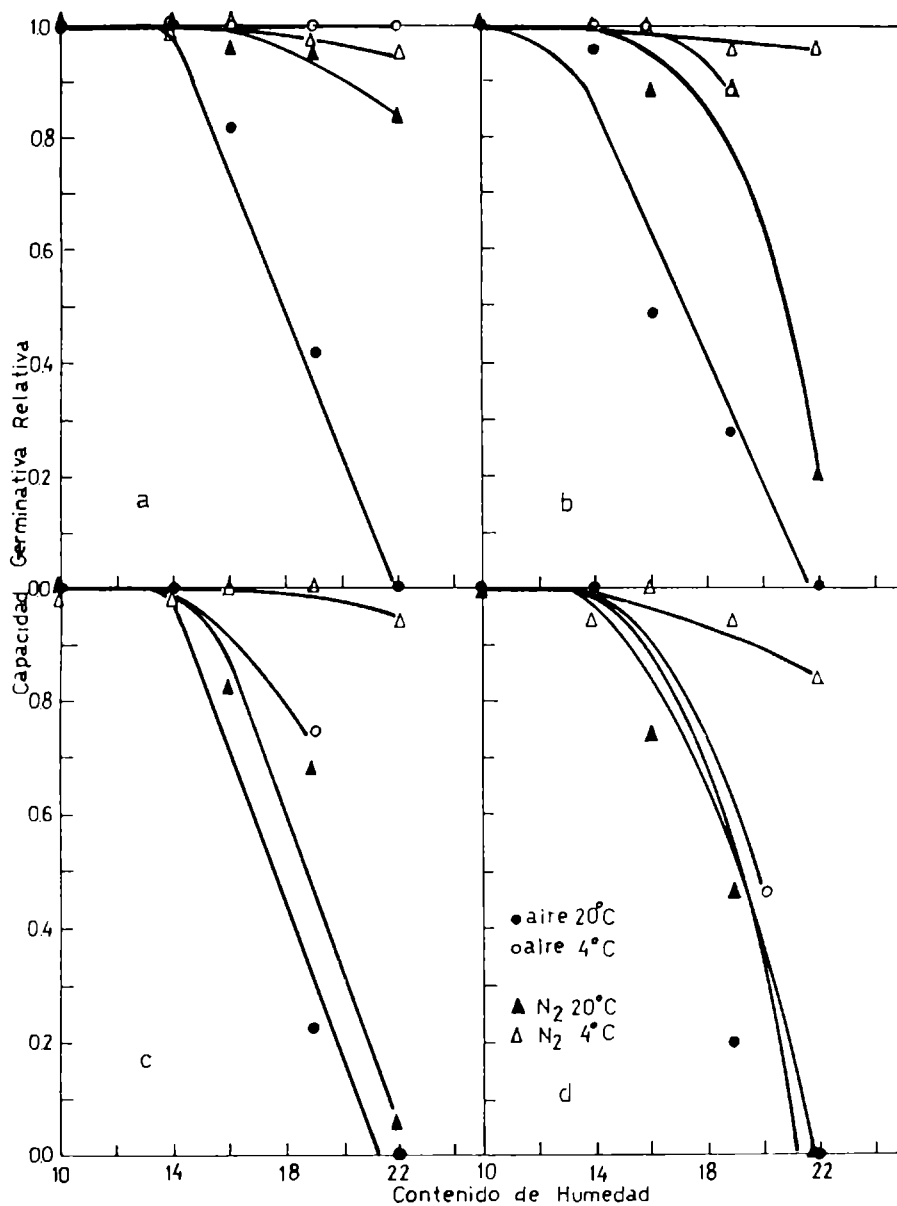


Figura 6: Variación de la capacidad germinativa de trigo almacenado con distinto contenido de humedad durante a) 30 días; b) 60 días; c) 90 días y d) 120 días.

de ellos fueron extrapolados de las curvas obtenidas experimentalmente (Fig. 2, 3, 4 y 5) ya que los tiempos de muestreo fueron distintos para cada cosecha utilizada.

Del análisis de estas curvas se desprende que para trigos de contenido de humedad menor o igual al 14% la capacidad germinativa se mantiene en niveles óptimos independientemente de la atmósfera (aire o nitrógeno) y de la temperatura (4 o 20°C), hasta cuatro meses de almacenamiento. Para trigo con contenido de humedad mayor al 14% mantenidos en aire a 20°C la germinabilidad decreció linealmente con el aumento de humedad. La velocidad de decaimiento observada en granos almacenados por 30 días fue semejante a la de aquellos almacenados 60, 90 y 120 días. De estos resultados podríamos inferir que el deterioro de la germinabilidad en aire alcanzaría su máxima expresión dentro del primer mes de almacenamiento, cuando la temperatura es de 20°C y el contenido de humedad del grano superior al 14%.

Tratemos ahora lo sucedido en nitrógeno a 20°C. Durante los 30 primeros días de almacenamiento, la capacidad germinativa se mantuvo elevada para todo el rango de humedades hasta el 19%. Para contenidos de humedad del 22% se registró un valor 15% inferior al original. Cabe aquí destacar que luego del segundo mes de almacenamiento, la caída de germinabilidad de trigo de humedad 22% fue muy superior a lo verificado a los 30 días de almacenamiento. La velocidad de decrecimiento de la germinabilidad fue la misma para los tiempos 60, 90 y 120 días aunque disminuyó individualmente en el tiempo para cada contenido de humedad.

El tratamiento en aire a 4°C mantuvo en niveles óptimos la germinación de granos almacenados con humedades hasta del 22%, por un lapso de 30 días. Cuando el tiempo de acopio se prolongó hasta 120 días, la capacidad germinativa decreció. Este decaimiento fue tanto mayor cuanto mayor fue el contenido de humedad del grano y mayor el tiempo de almacenamiento.

En nitrógeno a 4°C, la germinabilidad no se modificó para ningún contenido de humedad hasta los 90 días de almacenamiento. A los 120 días sólo decayó un 15% para trigos muy húmedos (contenido de humedad 22%).

Otra forma de estudiar la variación de la capacidad germinativa es teniendo en cuenta la actividad acuosa del cereal lo que representa un parámetro más real respecto a la disponibilidad de agua libre que el contenido de humedad.

Sabemos que siempre que un producto húmedo se coloca en una atmósfera gaseosa que contiene vapor de agua, existe en general un intercambio de calor y vapor de agua entre ambas fases; el producto se puede rehumidificar por absorción de agua o se puede secar por pérdida de humedad hacia la atmósfera. Esto ocurre hasta que se alcanza el equilibrio termodinámico donde las presiones y temperaturas son iguales y constantes en ambas fases.

En el equilibrio, y admitiendo que el vapor de agua es un gas perfecto, podemos definir el concepto de actividad acuosa (a_w) del producto como:

$$a_w = \frac{p}{p'} = \frac{\text{HRE}\%}{100} \quad (4)$$

donde p es la presión de vapor de agua en el alimento y p' es la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. La humedad relativa de equilibrio (HRE) se refiere a la atmósfera en equilibrio con el alimento (Multon, 1982a).

Conociendo el contenido de humedad del grano y la temperatura de almacenamiento, es posible calcular la actividad acuosa mediante la ecuación de Henderson-Thompson (Bakker y col., 1978):

$$R.H. = 1 - \exp [-k (T+C) \cdot (100 \times M_e)^N] \quad (5)$$

donde k , N y C son constantes a saber:

$$k = 2,3008 \times 10^{-5}$$

$$N = 2,2857$$

$$C = 55,815$$

T es la temperatura en °C y M_e es la humedad en base seca (expresada en forma decimal) calculada como:

$$M_e = \frac{c.h. (base húmeda)}{1 - c.h. (base húmeda)} \quad (6)$$

donde $c.h.$ es el contenido de humedad del grano

La Figura 7 muestra la capacidad germinativa al cabo de dos meses de almacenamiento en aire o nitrógeno, a 4 o 20°C para trigos de distinta actividad acuosa.

A 4°C la conservación es óptima aún para valores de actividad acuosa altos. Pero para 20°C, la caída del poder germinativo en aire comienza a disminuir para valores de actividad acuosa mayores a 0,54 (equivalente a contenido de humedad del

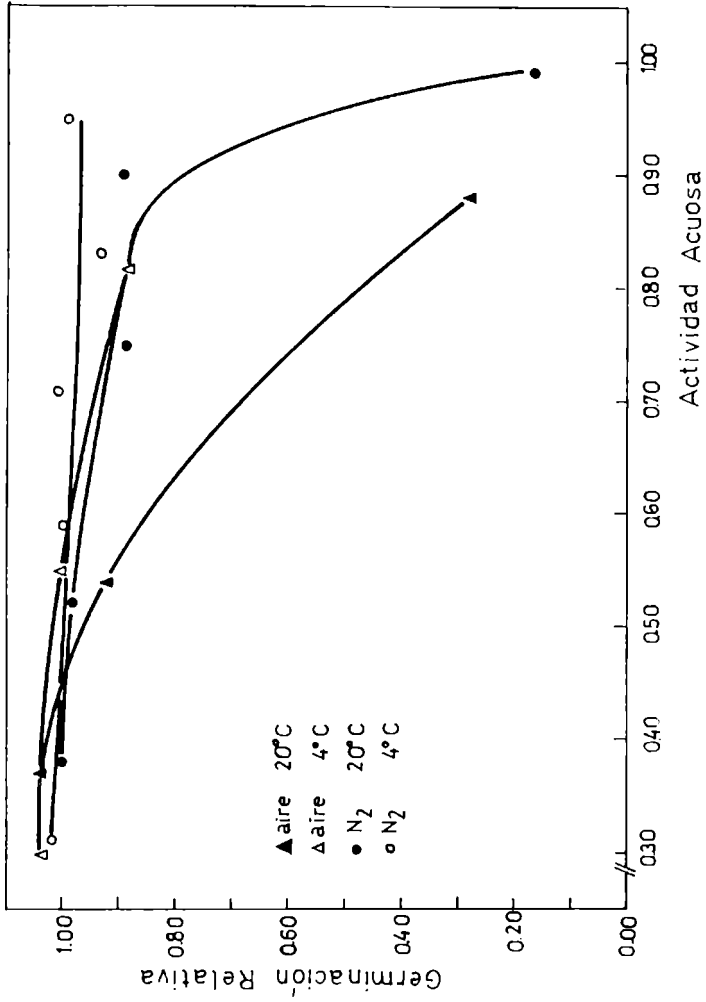


Figura 7: Capacidad germinativa de granos de trigo de diferente actividad acuosa, almacenados durante dos meses en aire o nitrógeno, a 4 o a 20°C.

12,6%). En nitrógeno a 20°C el rango de seguridad se amplia mucho más ya que el riesgo se iniciaría para valores de actividad acuosa superiores a 0,90 (equivalente a contenido de humedad del 18,8%). Cabe destacarse que el nitrógeno logra preservar la viabilidad más que el aire para el rango citado, pero una vez que el límite de actividad acuosa es superado, la velocidad de caída del poder germinativo es mucho más marcada que en aire.

2. INVASION FUNGICA DURANTE EL ALMACENAMIENTO DE TRIGO

La incidencia de hongos, en particular durante el tiempo de almacenamiento, representa un serio problema tanto para el cereal como para los productos obtenidos de la molienda. Entre los problemas que estos contaminantes pueden ocasionar, citamos decoloración, olores rancios, disminución de la germinabilidad, manchado del grano, formación de micotoxinas, etc. (Hummel y col., 1954; Christensen, 1957; Wallace y Sinha, 1962; Abramson y col., 1980; Sankaran y Mohan, 1984).

El contenido de humedad del grano y la temperatura de almacenamiento son los factores principales que determinan la intensidad de respiración y daño del cereal y sus derivados (Milner y Geddes, 1945). El tipo de cepa fúngica capaz de desarrollar en el grano va a depender del contenido de humedad inicial, de la temperatura, del nivel de oxígeno y de la magnitud y dirección que estas variables tomen a medida que el hongo crece. Otros factores que también van a influir son la disponibilidad de nutrientes y la velocidad de crecimiento inherente a cada hongo (Daftary y col., 1970).

La detección y aislamiento de las cepas contaminantes es de relevante importancia en el estudio de trigos almacenados a distinta actividad acuosa, distintas atmósferas y temperaturas, ya que da información acerca de las condiciones en que ese cereal fue almacenado. Los llamados "hongos de campo" no compiten bien con otras cepas en condiciones de almacenamiento normales. Si el grano está seco, el micelio de estos hongos puede

sobrevivir por años, pero en semillas con contenido de humedad del 15 al 19%, la mayoría de ellos muere. Si durante el almacenamiento el porcentaje de semillas con *Alternaria*, hongo de campo, decrece y el porcentaje con *Aspergillus*, hongo de almacenamiento, aumenta es señal de daño incipiente (Christensen y Saucr, 1982).

En general, bajo condiciones adecuadas, los hongos de almacenamiento desarrollan sobre el germen. Las infecciones suelen ser a una sola cepa fúngica, siendo raras las infecciones múltiples. En este trabajo el registro de hongos se realizó contando el número de semillas infectadas en cada muestra según se describió previamente en la sección 6.1. de Materiales y Métodos.

Cabe destacar aquí que una semilla puede estar infectada tanto por esporas como por micelio fúngico. En el silo y durante el muestreo, las esporas así como el micelio desarrollado en tejidos subsuperficiales pueden no advertirse a simple vista, pero al colocar dichos granos en condiciones adecuadas de humedad y temperatura, éstos son capaces de desarrollar y multiplicarse.

Si el porcentaje de granos infectados en el silo permanece constante, significaría que el micelio no fructifica o que las esporas permanecen en estado vegetativo; si dicho porcentaje aumenta, implicaría que las esporas están desarrollando micelio o que el micelio presente está fructificando y aumentando de esta manera el número de esporas viables. Finalmente, si dicho porcentaje decrece en el tiempo, sería un indicio de

condiciones no adecuadas en el silo para el desarrollo o permanencia de ese contaminante.

2.1. Aislamiento e identificación de las cepas fúngicas presentes en trigo almacenado

La microflora hallada en cereales es la misma que la hallada en suelos, aire, plantas y animales vivos o muertos. El mecanismo y el momento en el cual se produce la invasión fúngica no está del todo claro.

Los hongos de campo atacan semillas en desarrollo o maduras pero con contenido de humedad de por lo menos el 20%, o con una humedad relativa de equilibrio del 90 al 100%.

Los hongos de almacenamiento se encuentran especialmente cuando el grano cosechado es almacenado con niveles de agua del orden del 13 al 20% o con humedades relativas de equilibrio del 70 al 90%.

A pesar de la clasificación en "campo" o "almacenamiento", existen excepciones ya que *Aspergillus flavus* (hongo de almacenamiento) puede invadir en el campo y *Fusarium* (hongo de campo) puede continuar presente durante el almacenamiento si el contenido de humedad es lo suficientemente alto (Bothast, 1978).

Con el fin de evaluar el comportamiento fúngico en el silo, se aislaron e identificaron las cepas contaminantes. Los hongos presentes antes y durante el almacenamiento correspondieron principalmente a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Helminthosporium*, *Alternaria* y *Fusarium*. Los rasgos macro y

microscópicos que los caracterizan son los siguientes (Hazen, 1960):

Alternaria spp

Colonia de crecimiento rápido; primero tiene color blanco pardo y luego se hace verde negruzca. La superficie es afelpada y el borde presenta micelio blanco parduzco. Microscópicamente presenta hifas hialinas u oscuras; los conidioforos son cortos o elongados, sueltos o agrupados, de color marrón o marrón verduzco; los conidios aparecen septados en forma transversal y longitudinal, son marrones y nacen en forma aislada o en cadenas (Fig. 8).

Helminthosporium spp (Drechslera)

Colonia de crecimiento moderado, color verde parduzco, con micelio abundante de aspecto velloso. Microscópicamente se observan hifas claras y oscuras con conidioforos largos septados y conidios marrones ovalados que contienen cuatro o más células (Fig. 9).

Fusarium spp

Colonia de crecimiento rápido, primero blanca, luego lilá cea, que presenta un micelio abundante y plumoso en el centro con bordes planos color blanco. Este género consta de muchas especies algunas de las cuales son de colores diferentes: blanco,



a



b



c

Figura 8: *Alternaria* spp. a) Aspecto macroscópico de la colonia; b) y c) Observación microscópica de los conidios característicos (10 x y 25 x).



Figura 9: *Helminthosporium* spp. Observación microscópica de hifas y conidios (10 x y 25 x).

tostado, rosa, violeta o rojo. Microscópicamente se observan conidioforos ramificados o no sobre hifas delgadas. Los conidioforos producen dos tipos de esporas: macroconidios que son largos, multiseptados y con forma de media luna y microconidios que son unicelulares, de forma ovoide (Fig. 10).

Penicillium spp

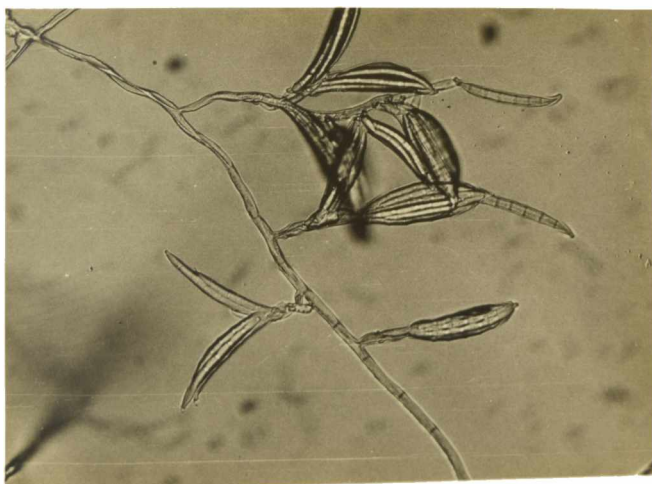
Colonia de crecimiento rápido, aplanada con superficie pulverulenta color verde azulado, rodeada de un halo angosto blanco. Microscópicamente se observan cadenas de esporos que parten de fiálides que conforman la estructura típica de "cepillo". De acuerdo a la especie existen diferencias apreciables en cuanto a color, textura y velocidad de crecimiento (Fig. 11).

Aspergillus spp

Colonia de rápido crecimiento, plana, con micelio central delgado, color pardo o azul verdoso y ralo, parcialmente sumergido en los bordes. Por el reverso aparece pálida, color verde amarillento. Microscópicamente presenta conidioforos no ramificados, no septados que nacen de una célula especializada del micelio; en el ápice del conidioforo hallamos la vesícula globosa que sostiene las fiálides de donde nacen las cadenas de conidios (Fig. 12).



a



b

Figura 10: *Fusarium* spp. a) Aspecto macroscópico de las colonias;
b) Observación de macroconidios (25 x).

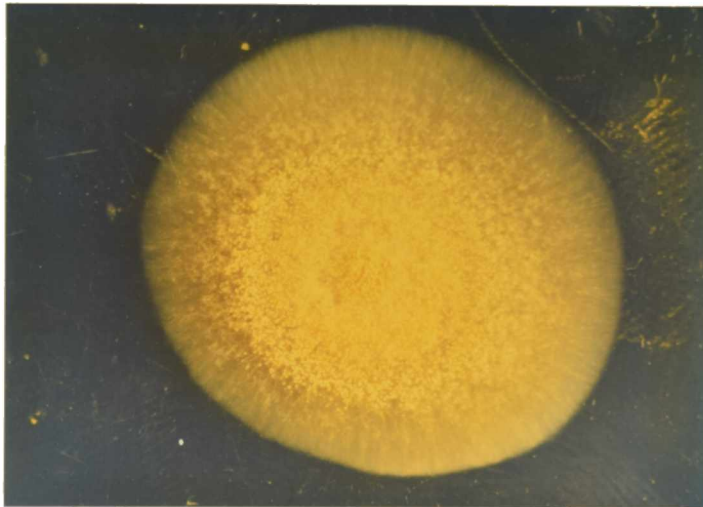


a

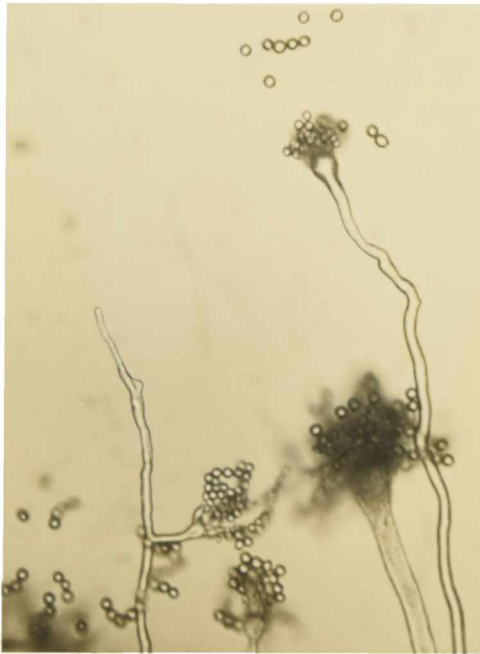


b

Figura 11: Características (a) macroscópicas y (b) microscópicas del género *Penicillium* (25 x).



a



b

Figura 12: Características (a) macroscópicas y (b) microscópicas del género *Aspergillus* (25 x).

A partir del trigo cosecha 83-84 se aislaron las especies *Aspergillus flavus* Link, *Penicillium cyclopium*, *Fusarium graminearum* y una cepa perteneciente al género *Alternaria* a la cual no se le pudo determinar la especie correspondiente.

2.2. Influencia de las condiciones del entorno sobre el desarrollo fúngico

Las figuras 13 a 16 muestran el porcentaje de granos contaminados a lo largo del almacenamiento con las cepas fúngicas más difundidas.

Analizando en forma individual cada uno de ellos se puede destacar que *Aspergillus*, en las condiciones de humedad, temperatura y atmósfera utilizadas no modifica su desarrollo (Fig. 15), mientras que *Penicillium*, otra cepa de almacenamiento, se multiplica infectando mayor número de granos cuando se almacena trigo en aire con contenidos de humedad superiores al 16% (Fig. 16). La velocidad de multiplicación es función de la temperatura del silo, lo cual se visualiza en la Figura 16a y b. A 20°C, *Penicillium* alcanzó su valor máximo durante los primeros 10 a 15 días de almacenamiento para trigo con contenido de humedad igual o mayor al 16%. A 4°C, se registró un tiempo de latencia de 20 y 25 días para trigo de contenido de humedad del 19 y 16% respectivamente, durante el cual el nivel de infección permaneció constante. Luego de este período, se alcanzaron valores máximos de infección pero a una velocidad inferior a la obtenida a 20°C.

Estos resultados correlacionan bien con aquellos

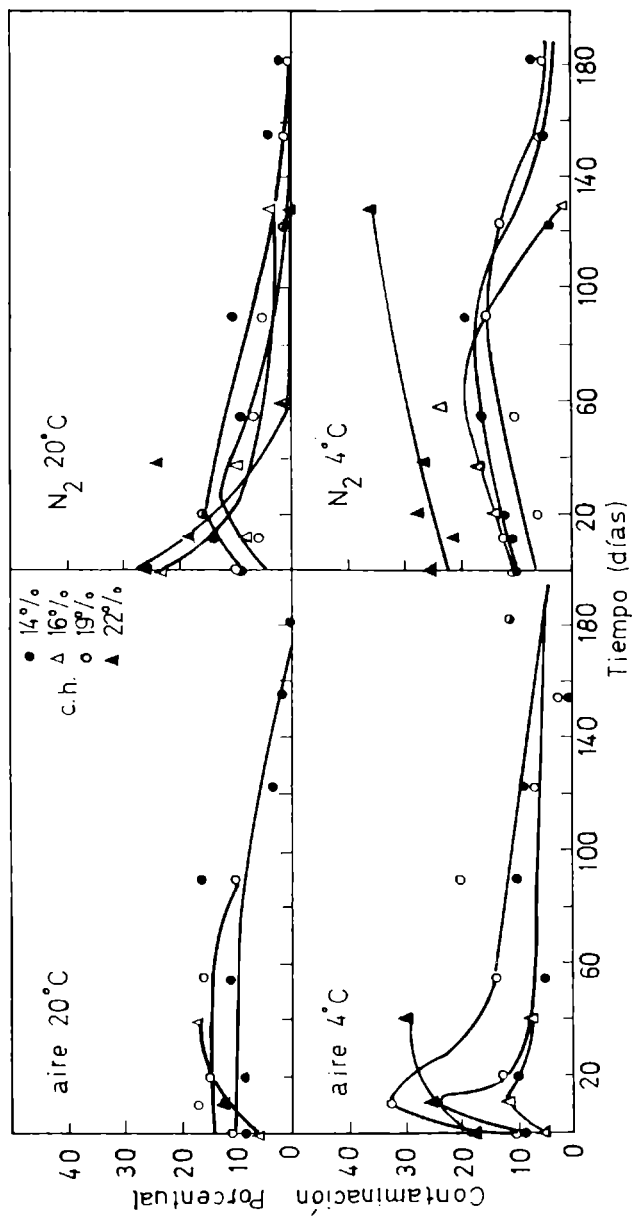


Figura 13: Porcentaje de granos contaminados con *Alternaria* spp. durante el almacenamiento en aire y en nitrógeno a 4 y 20°C.

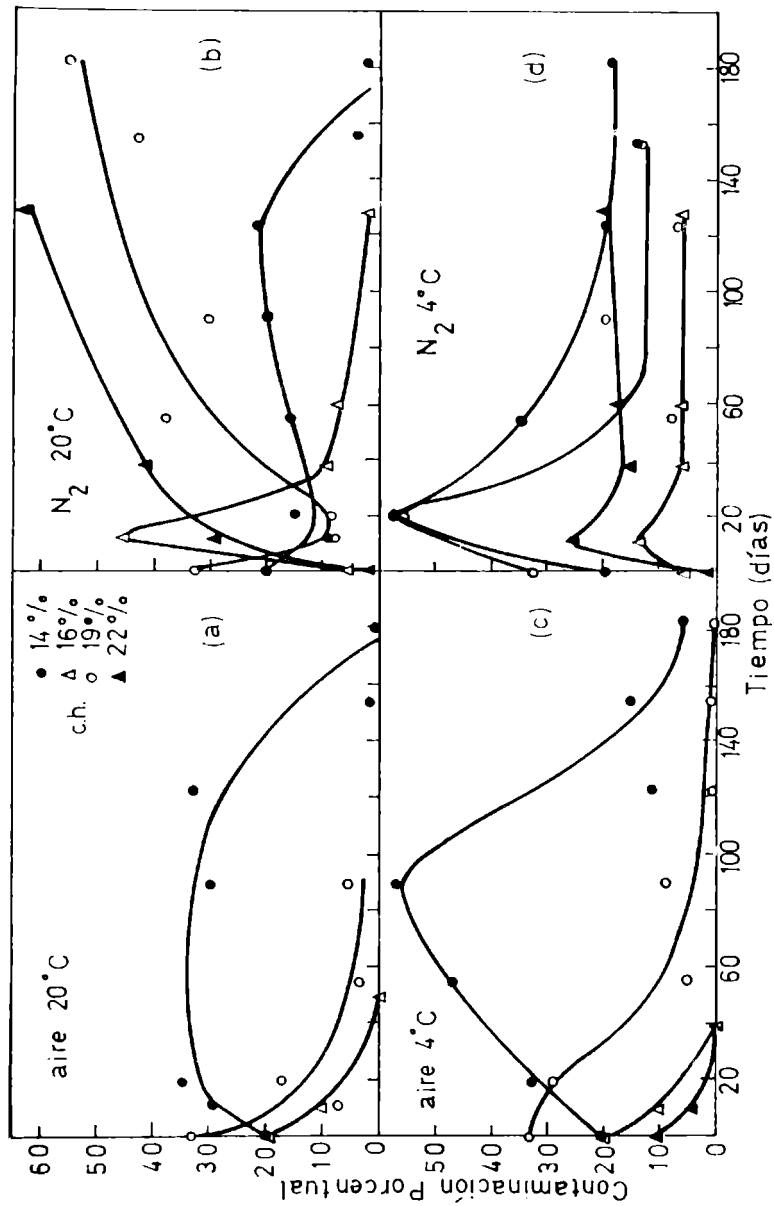


Figura 14: Porcentaje de granos contaminados con *Fusarium* spp. durante el almacenamiento en aire y en nitrógeno a 4 y 20°C.

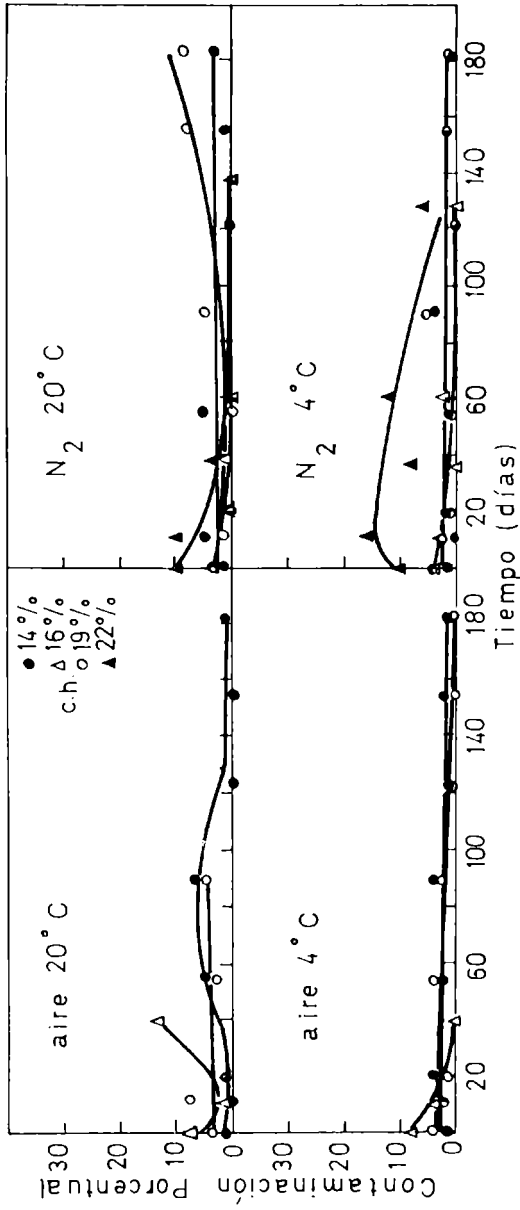


Figura 15: Porcentaje de granos contaminados con *Aspergillus* spp. durante el almacenamiento en aire y en nitrógeno a 4 y 20°C.

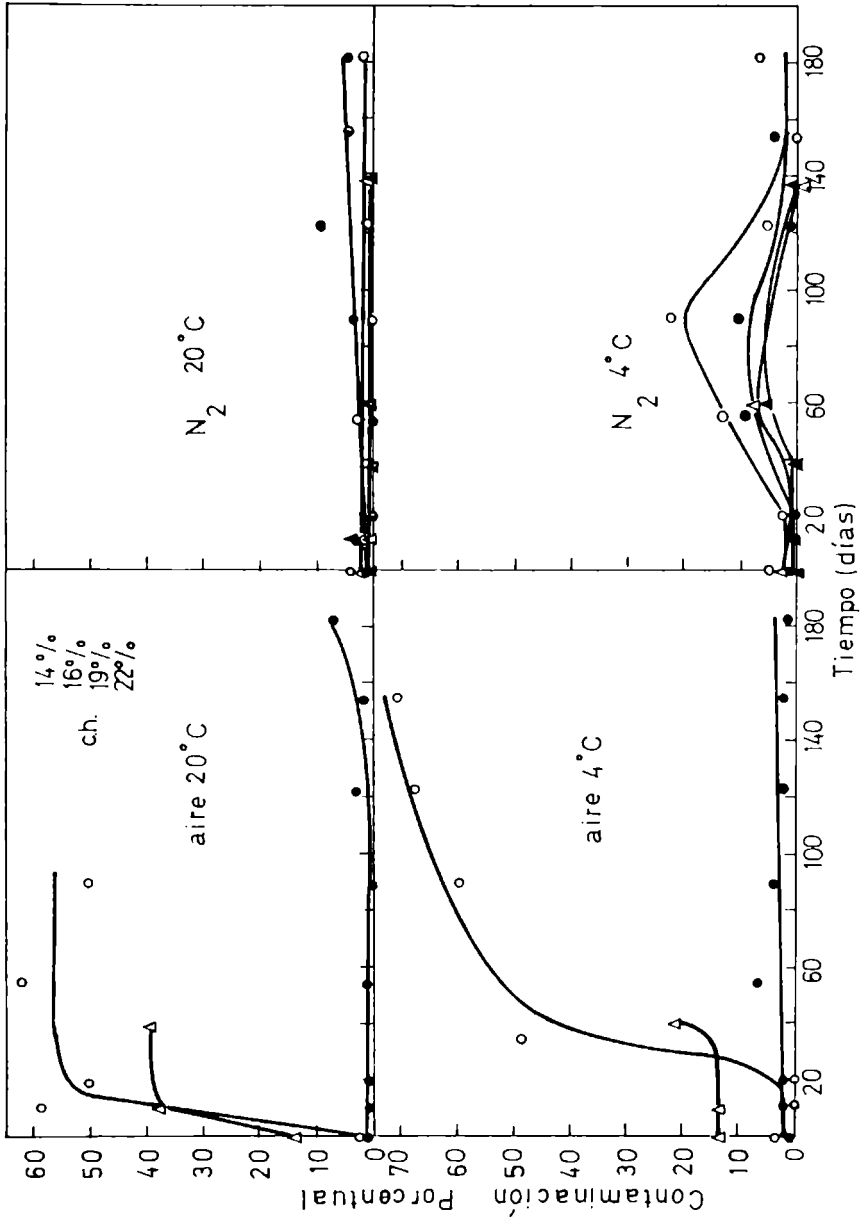


Figura 16: Porcentaje de granos contaminados con *Penicillium* spp. durante el almacenamiento en aire y en nitrógeno a 4 y 20°C.

encontrados por Abramson y col (1980) quienes trabajando con trigo de contenido de humedad 21% almacenado en aire a 21-23°C, hallaron que la frecuencia de aparición de *Penicillium* (identificado principalmente como *Penicillium verrucosum* variedad *cyclopium*) alcanzaba valores máximos en las primeras dos semanas de almacenamiento y permanecía elevado a lo largo del mismo. Con respecto a *Aspergillus flavus*, lo pudieron aislar recién después de 16 semanas de almacenamiento.

Con relación a los contaminantes de campo, describiremos a continuación el comportamiento de *Alternaria* (Fig. 13). A 20°C, las esporas e hifas de este contaminante tienden a morir a medida que el almacenamiento se prolonga. Cuanto mayor es el contenido de humedad del grano, más rápido desaparecen o mueren estos contaminantes. Abramson y col. (1982) hallaron que *Alternaria* caía a nivel cero de infección en trigo húmedo (20,5%) alrededor de la segunda semana de almacenamiento a 22°C. Nosotros hallamos que en aire a 20°C la infección se mantenía constante durante los primeros tres meses y luego comenzaba a decaer. Por el contrario, luego de los primeros 20 días en atmósfera de nitrógeno donde se verificó un leve aumento de la población fúngica, el número de granos infectados con *Alternaria* comenzó a disminuir hasta hacerse nulo. En aire a 4°C, este incremento inicial se verificó a los 10 días de almacenamiento para luego caer hasta los valores originales y mantenerse constante en ellos. La única condición en la que se verificó aumento de la población para todos los contenidos de humedad hasta los 70 días y para trigos muy húmedos (22%) hasta los 130 días fue al

utilizar atmósfera de nitrógeno a 4°C. Para contenidos de humedad menores al 22%, la infección comenzó a decaer del día 70 en adelante. Este mantenimiento y multiplicación de cepas de campo durante el almacenamiento da indicios de que las condiciones en que se realizó el mismo fueron buenas, ya que la flora inicial sobrevivió gracias a que *Aspergillus* y *Penicillium* no lograron desarrollarse tempranamente.

En el caso de *Fusarium*, el otro contaminante de campo estudiado, el almacenamiento a 4°C en nitrógeno (condiciones óptimas de acopio) le permitió mantener constantes los niveles de infección (entre 5 y 20% para contenidos de humedad superiores al 14%) a partir de los 40 días de almacenamiento (Fig. 14d). Entre el día 10 y el 20 se obtuvo un resultado de infección máxima al igual que lo ya descripto para el caso de *Alternaria*. En general, para ambas cepas, este aumento inexplicable y súbito de la población podría ser la respuesta al frío o a la atmósfera de nitrógeno.

En aire, tanto a 4°C como a 20°C, *Fusarium* decae hasta alcanzar valores nulos luego de los 60 días de almacenamiento para granos con contenido de humedad mayores al 14%. Para humedades del 14%, en aire a 20°C, la infección se mantuvo constante hasta los 120 días y cayó a cero a los 180 días. En el caso de aire a 4°C, aumentó el nivel de infección hasta los 90 días y luego cayó hasta alcanzar valores del 5% a los 6 meses (Fig. 14 a y c).

La única condición en la que *Fusarium* creció bien fue a 20°C en nitrógeno sobre granos de contenido de humedad superior

al 16% (Fig. 14b).

Dado que en un silo los contaminantes existen en forma si multánea, el hecho que una condición favorezca el desarrollo de un tipo de cepa y no de otra hace que una se pueda ver inhibida en función del crecimiento de la otra. De esta manera, observando conjuntamente las figuras 13, 14, 15 y 16, vemos que para cada combinación de atmósfera y temperatura existe una sola cepa capaz de desarrollar bien.

Finalmente, para granos de alto contenido de humedad, la sola disminución de la temperatura no es suficiente para evitar la contaminación (en aire a 4°C y humedad del 19% crece bien Penicillium), sino que se debe modificar también la atmósfera.

3. CAMBIOS METABOLICOS ASOCIADOS CON LA CONTAMINACION

3.1. Respiración

La respiración en presencia de oxígeno es un proceso que involucra la destrucción de materia orgánica (hidratos de carbono, lípidos, proteínas y vitaminas) con la consecuente pérdida de nutrientes. Dicho proceso rinde anhídrido carbónico, agua y genera calor. En condiciones anaeróbicas se obtiene menor cantidad de anhídrido carbónico, agua y calor y además se producen otros compuestos tales como ácido acético y etanol. El efecto directo de la respiración en los granos es la pérdida de materia seca así como también aumento del contenido de humedad, aumento del anhídrido carbónico intergranular y aumento de la temperatura (Bothast, 1978).

Las primeras investigaciones en relación a la respiración de granos almacenados bajo distintas condiciones de humedad, temperatura y atmósfera, medían la actividad metabólica del grano y sus contaminantes dentro mismo del silo. Un buen índice para calcular el alcance relativo del metabolismo aeróbico o anaeróbico en granos es el cociente respiratorio (QR) que se define de la siguiente manera:

$$QR = \frac{\text{moles de CO}_2 \text{ producidos}}{\text{moles de O}_2 \text{ consumidos}} \quad (7)$$

En el caso de consumir glucosa aeróbicamente, el cociente respiratorio sería igual a 1, mientras que en el caso de consumir lípidos aeróbicamente, por ejemplo tripalmitina, el cociente respiratorio es 0,7. La utilización de proteínas como

sustrato en la oxidación da como resultado cocientes respiratorios que pueden ser mayores o menores que 1. Esto dependerá del contenido en aminoácidos. Umbreit y col. (1959) dan el valor 0,9 para la mayoría de las proteínas mientras que aquellas proteínas ricas en aminoácidos cuyos esqueletos carbonados están estrechamente relacionados con intermediarios respiratorios (por ejemplo alanina, ácido glutámico y ácido aspártico) dan un cociente respiratorio mayor a 1 (Lupano, 1986).

Milner y Geddes (1945) hallaron que bajo condiciones óptimas de ventilación, la respiración fúngica mostraba un cociente respiratorio igual a 1, mientras que el cociente respiratorio de porotos de soja en estado latente era menor a 0,85. También hallaron que las semillas en atmósfera de nitrógeno respiraban, en promedio, a una velocidad que era el 3% del valor máximo hallado para muestras similares almacenadas con ventilación óptima. Para la respiración en atmósfera de nitrógeno conteniendo trazas de oxígeno, se obtuvieron valores muy elevados del cociente respiratorio en el rango de 3 a 23, lo cual indicaría su naturaleza anaeróbica. A pesar de los numerosos factores que pueden influir los valores del cociente respiratorio, es éste un buen índice para calcular el alcance relativo del metabolismo aeróbico o anaeróbico en granos (Pomeranz, 1982).

El objetivo de este estudio fue observar en qué medida se afectaba la respiración de semillas con contenido de humedad del 14 y del 19% luego de haber sido almacenadas a distintas temperaturas y atmósferas por un período máximo de seis meses. Para ello se midió la velocidad de consumo de oxígeno durante

las primeras horas posteriores a la imbibición en agua destilada de semillas provenientes de pequeños silos de laboratorio, bajo distintas condiciones. Se debe tener en cuenta que aunque algunas muestras provienen de silos en anaerobiosis, la medida de respiración se realizó en recipientes aireados, por lo tanto, en todos los casos se midió consumo de oxígeno y no fermentación.

Paralelamente se tomaron semillas de los mismos lotes y se les practicó el ensayo de germinación, descrito en la sección 7.1. de Materiales y Métodos. Las Figuras 17 y 18 muestran las curvas de consumo de oxígeno por minuto y por gramo de muestra y la capacidad germinativa expresada como valor relativo al valor inicial, para muestras tomadas a distintos tiempos durante el almacenamiento. Los números que se observan sobre algunas curvas de germinación representan el porcentaje del contaminante principal hallado en los granos al momento del muestreo.

En general, podemos apreciar que el consumo de oxígeno es menor para semillas que han sido almacenadas durante más tiempo. No obstante, a tiempos cortos, todas las muestras almacenadas en nitrógeno y aquella almacenada en aire a 20°C con contenido de humedad del 19%, mostraron un aumento del consumo de oxígeno hasta los 55 días de almacenamiento.

Los cuatro silos con trigo de contenido de humedad 14% y el de nitrógeno a 4°C con trigo de contenido de humedad 19% mostraron un nivel de germinación constante a lo largo del tiempo, pero el consumo de oxígeno disminuyó. En estos cinco silos el consumo de oxígeno fue mayor a $1 \mu\text{l O}_2/\text{min}/\text{gr}$ al comenzar el

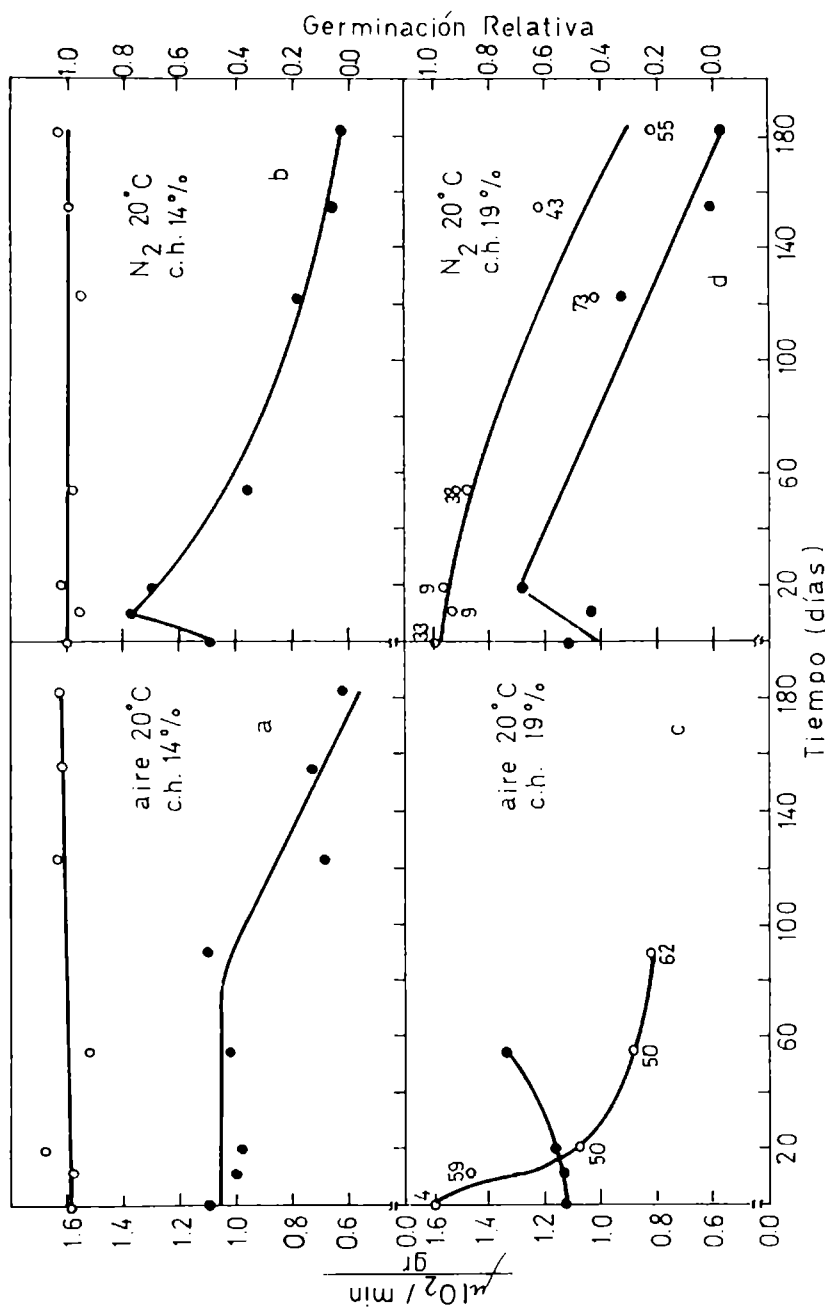


Figura 17: Consumo de oxígeno (●) y germinación relativa (○) de semillas almacenadas en aire o en nitrógeno a 20°C, con contenido de humedad (c.h.) del 14 y del 19%. Contaminantes: (c) *Penicillium*; (d) *Fusarium*.

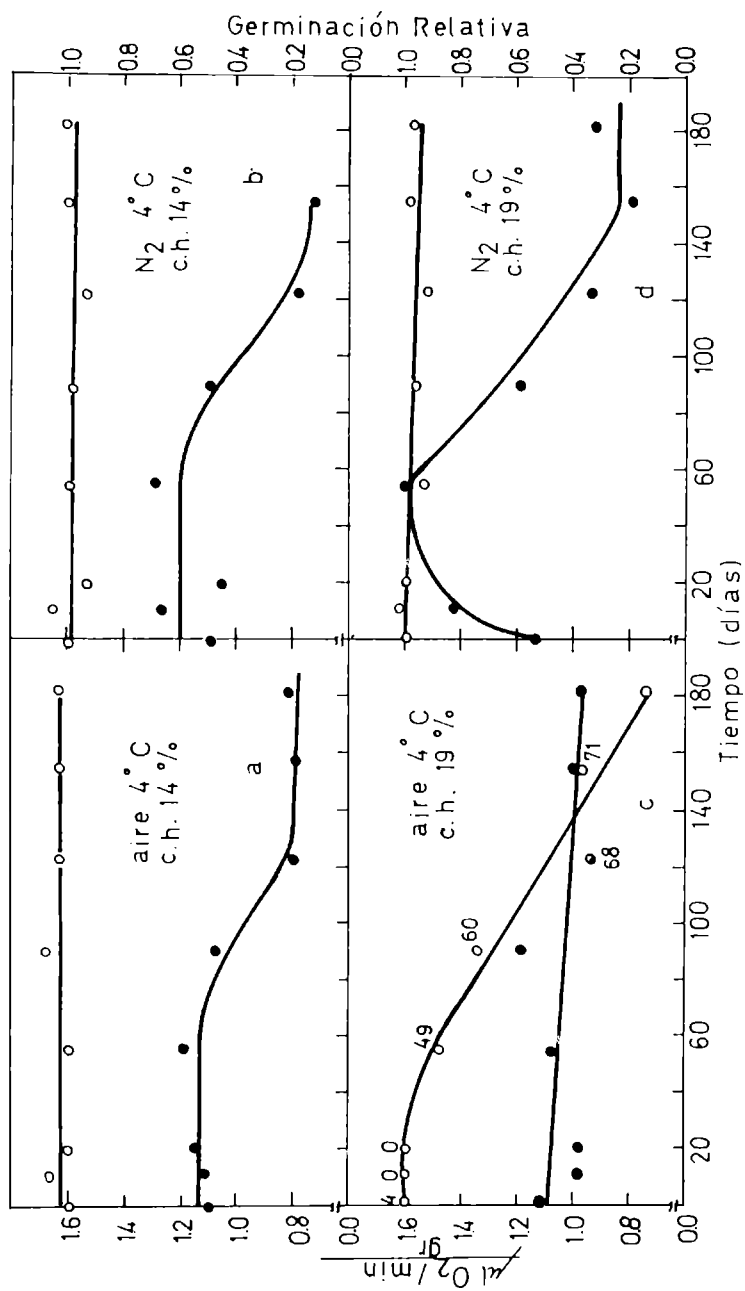


Figura 18: Consumo de oxígeno (●) y germinación relativa (○) de semillas almacenadas en aire o en nitrógeno a 4°C, con contenido de humedad (c.h.) del 14 y del 19%. Contaminante: (c) *Penicillium*.

almacenamiento y cayó a valores entre 0,6 y 0,8 $\mu\text{l O}_2/\text{min}/\text{gr}$ al final del mismo.

Inicialmente todos los granos presentaron un cierto porcentaje de contaminantes, pero a medida que transcurrió más tiempo el recuento de los mismos fue declinando y con ellos la respiración. Posiblemente, el valor entre 0,6 y 0,8 $\mu\text{l O}_2/\text{min}/\text{gr}$ corresponda a semillas en estado latente, libres de contaminación. Lupano (1986) halló valores algo superiores a éstos para granos sin contaminantes (1 $\mu\text{l O}_2/\text{min}/\text{gr}$). La diferencia registrada a cortos tiempos en las curvas de trigo almacenado con contenido de humedad del 14% y del 19% en nitrógeno a 4°C podría atribuirse a que si bien en ambos silos desarrolló *Penicillium*, en trigo de contenido de humedad 19% creció en mayor proporción (a los 90 días de almacenamiento se contabilizó el doble de semillas infectadas a 19% de humedad que a 14%).

Estudiaremos ahora los tres silos restantes en los que sí se registró disminución de la capacidad germinativa. En el silo a 20°C en aire, con trigo de contenido de humedad 19%, se verificó caída de la germinabilidad a partir de la primera semana de almacenamiento. Simultáneamente hubo invasión masiva de *Penicillium* que destruyó el germen siendo esto causa de la pérdida de viabilidad. A pesar de ello, en el ensayo de respiración se midió aumento continuo de la cantidad de oxígeno consumido. En base a estos resultados podemos afirmar que la velocidad de decaimiento de la respiración del grano es menor que la velocidad con que aumenta la respiración del hongo. El aumento de respiración medido en el ensayo es la resultante de

estos dos procesos opuestos y en este caso corresponde a la respiración fúngica.

Consideremos ahora lo que sucede cuando el grano se almacena en iguales condiciones que el anterior (aire y contenido de humedad 19%) pero a menor temperatura, 4°C. En estos granos también creció *Penicillium*, aunque a menor velocidad. Se puede observar que a 20°C se alcanzó un nivel de contaminación del 59% en 11 días, mientras que a 4°C demoró 90 días para alcanzar el mismo valor (60%). Hubo también pérdida de viabilidad por tratarse del mismo género invasor y destructor de germen. En este caso, a pesar de estar contaminado el grano, los valores de respiración permanecieron casi constantes, declinando un poco hacia finales del almacenamiento (seis meses). ¿Cómo podemos explicar este resultado, teniendo en cuenta el caso anterior? Debemos tener presente que el metabolismo fúngico a 4°C seguramente es más lento que a 20°C y que las cepas provenientes de silos refrigerados respiran por ende a menor velocidad que las de silos no refrigerados. El tiempo que dura el ensayo de respiración sería probablemente insuficiente para que estas cepas se recuperen y comiencen a respirar a la velocidad de las otras. De esta forma la velocidad de respiración de la semilla que está disminuída por la invasión fúngica es similar a la velocidad de respiración del hongo. Al medir la resultante de estos dos procesos similares pero opuestos obtenemos un nivel respiratorio casi constante a lo largo del almacenamiento.

El tercer caso que nos ocupa corresponde al silo en nitrógeno a 20°C con trigo de contenido de humedad 19%. En él la

contaminación principal fue debida a *Fusarium*, hongo capaz de crecer en semianaerobiosis, invadiendo el grano y provocando pérdida de viabilidad. La medida de respiración dio como resultado disminución del consumo de oxígeno. Esto sería la resultante de dos procesos simultáneos como ya explicamos en los dos casos anteriores: disminución de la respiración del grano invadido y aumento de respiración por parte de los contaminantes. En este caso particular, no se observó el segundo proceso o fue menos importante que el primero. Lo que se registró en este caso fue la disminución del consumo de oxígeno por parte de la semilla. Estos granos se obtuvieron de silos mantenidos en condiciones anaeróbicas donde *Fusarium* creció a expensas de un metabolismo acorde a las condiciones de anaerobiosis. Es posible que al pasar a condiciones con libre acceso de oxígeno las cepas no puedan utilizarlo a la velocidad que lo harían aquellas crecidas en aerobiosis o bien que sean incapaces de crecer en presencia de oxígeno. De igual manera, la disminución de la velocidad de respiración de la semilla sería debida en parte a la contaminación, con la consecuente pérdida de viabilidad, y en parte también a que el grano podría requerir un cierto tiempo de recuperación de su metabolismo aerobio al abandonar las condiciones de anoxia reinantes en el silo.

3.2. Proteínas

En términos generales, la composición del embrión

representa la porción del grano menos estudiada, en parte debido a su menor importancia en tecnología de cereales. No obstante, desde el punto de vista de nutrición se lo reconoce desde hace ya tiempo como alimento rico en proteínas, aminoácidos esenciales y lípidos. Pomeranz y col. (1970) determinaron que aproximadamente el 86% de la proteína total del embrión de trigo podía ser extraída en soluciones acuosas diluídas de cloruro de sodio y que contenía un espectro muy completo de componentes de rápida movilidad electroforética. Ellos hallaron que la composición aminoacídica de las proteínas presentes en el germen de trigo difería en gran medida de aquella de proteínas de almacenamiento del endosperma, ya que las del germen poseían mayor cantidad de aminoácidos esenciales tales como arginina, histidina, lisina, metionina, treonina y valina y mucha menor cantidad de ácido glutámico y prolina.

Entre las proteínas presentes en germen de trigo existen algunas solubles y otras insolubles. Dentro de las solubles se distinguen cuatro tipos principales de acuerdo a la clasificación dada por Osborne (1907): albúminas, solubles en agua; globulinas, solubles en soluciones salinas diluídas; gliadinas, solubles en alcohol al 70-90%, y gluteninas, insolubles en los medios anteriores pero que se extraen en ácidos, álcalis, detergentes, urea, etc. (Kasarda y col., 1976; Shurpalekar y Haridas Rao, 1977).

Comparando el porcentaje de las distintas fracciones en harina y en germen, Grewe y Le Clerc (1943) hallaron que las gliadinas en germen constituyen el 15% del nitrógeno soluble,

mientras que en harina representan más del 50% del total de proteínas. Por el contrario, la fracción compuesta por albúminas y globulinas representa en germen casi el 60% del nitrógeno total, mientras que en harina representa sólo el 15%. Finalmente, la porción de gluteninas en germen es prácticamente nula (0,3 al 0,37% del total de proteínas), mientras que en endosperma, las gluteninas más el residuo insoluble constituyen entre el 30 y el 40% (Simmonds, 1978).

Con el fin de determinar si el contenido proteico del germen se alteraba o no durante los diferentes tipos de almacenamiento a los que era sometido el grano, el embrión se separó manualmente de la semilla y se extrajo con solución de NaCl al 5% dado el alto rendimiento que la técnica ofrece (Pomeranz y col., 1970).

Los extractos se analizaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida con docecil sulfato de sodio (SDS). La porosidad del gel se seleccionó en base al tamaño de proteínas a estudiar y el agregado de SDS cargó a todas las proteínas negativamente de manera que la separación se realizó exclusivamente por tamaños.

Las figuras 19, 20 y 21 muestran los geles obtenidos para extractos proteicos de germen provenientes de una mezcla al 50% de granos de trigo cultivares Marcos Juárez y Leoncs almacenados por cuatro meses en nitrógeno a 4 y 20°C con contenidos de humedad del 16 y del 22% (Fig. 19) y a extractos proteicos de germen obtenidos de mezclas iguales a la anterior pero almacenadas en aire a 4, 10 y 20°C con contenidos de humedad del 10 y

21% (figuras 20 y 21). El muestreo se realizó al tiempo 0, 7, 14 y 24 días.

En la Figura 19 podemos observar el diagrama obtenido para los controles de contenido de humedad baja (16%) y alta (21%). En ambos casos se destacan numerosas especies proteicas siendo las principales las correspondientes a una banda de peso molecular aproximado 67.000; dos bandas en la zona de peso molecular 43.000; tres bandas de peso molecular mayor a 30.000 y menor a 43.000; una banda cercana a peso molecular 30.000 y otra cercana a 20.100; una zona continua de peso molecular superior a 14.400 y una banda oscura en el frente de corrida lo cual indicaría la existencia de proteínas o polipéptidos menores. Los controles se estudiaron también luego de haber sido tratados con mercaptoetanol. Como es sabido, el mercaptoetanol separa subunidades o cadenas proteicas que se hallan ligadas por puentes disulfuro. Los resultados obtenidos para los dos controles tratados con mercaptoetanol fueron similares para ambos contenidos de humedad. Se aprecia en ellos la aparición de una nueva banda de peso molecular 94.000, otra de peso molecular menor a 67.000 y una tercera de peso molecular algo menor a 30.000.

Si se comparan las especies proteicas presentes en lotes almacenados en nitrógeno durante cuatro meses con los correspondientes a los controles de humedad baja (10%) y alta (21%), se puede decir que las muestras de humedad 16% no sufrieron cambios apreciables con el almacenamiento, mientras que aquellas de contenido de humedad 22% presentaron alteraciones. Los cambios

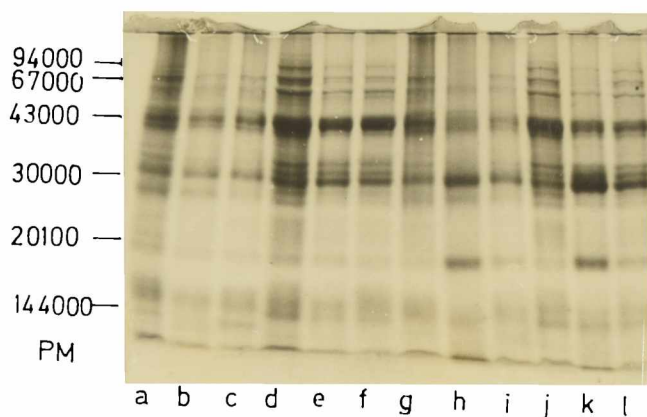


Figura 19: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, de proteínas de germen de trigo almacenado en nitrógeno durante 4 meses.

- a) Control, c.h. 10%; b) N_2 , 20°C, c.h. 16%; c) N_2 , 4°C, c.h. 16%; d) control tratado con ME, c.h. 10%; e) N_2 , 20°C, c.h. 16% con ME; f) N_2 , 4°C, c.h. 16% con ME; g) control, c.h. 21%; h) N_2 , 20°C, c.h. 22%; i) N_2 , 4°C, c.h. 22%; j) control con ME, c.h. 21%; k) N_2 , 20°C, c.h. 22% con ME; l) N_2 , 4°C, c.h. 22% con ME.

más notables que observamos aparecen en granos almacenados a 20°C. En la zona de peso molecular 67.000 desaparece una banda mientras que para peso molecular 20.100 hay una banda que adquiere gran importancia. También se registraron cambios para bandas en la zona de peso molecular menor a 14.400. El ensanchamiento de esta zona podría atribuirse a hidrólisis de proteínas mayores, a separación de cadenas de proteínas oligoméricas, o bien a la síntesis de nuevas proteínas. Las muestras tratadas con mercaptoetanol presentaron al igual que los controles, una banda de peso molecular cercano a 94.000 que no apareció en las muestras sin tratar. Esto indicaría la existencia de moléculas de peso molecular elevado formadas por cadenas de peso molecular cercano a 94.000 unidas entre sí o a otras subunidades por puentes disulfuro. El resto del diagrama es muy semejante para ambos tipos de extractos. Lupano (1986), trabajando bajo las mismas condiciones, obtuvo resultados semejantes.

La otra experiencia similar que se llevó a cabo con germen proveniente de trigo almacenado en aire a 4 y 10°C (Fig. 20 y 21) mostró que tanto para contenidos de humedad del 10 o del 21% no se registraron cambios del patrón proteico hasta el mes de almacenamiento. A 20°C ocurrió lo mismo para granos de contenido de humedad bajos (10%), pero para contenidos de humedad del 21% el espectro se modificó mucho ya a partir del séptimo día de almacenamiento. También aquí, las bandas que desaparecieron primero fueron las de peso molecular elevado (mayor a 43.000). Cuanto mayor es el tiempo de almacenamiento, se obtiene menor número de especies proteicas y adquiere importancia el frente

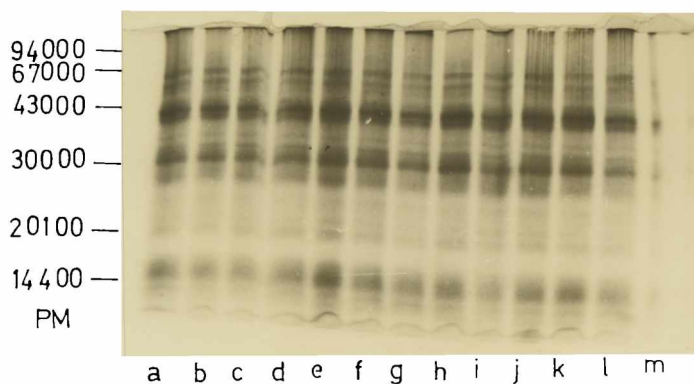


Figura 20: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, de proteínas de germen de trigo almacenado en aire a 4 y 10°C. El muestreo se realizó a los 7, 14 y 24 días de almacenamiento.

- a) Control, c.h. 10%; b) control, c.h. 21%;
- c) 7 días, 4°C, c.h. 10%; d) 14 días, 4°C, c.h. 10%;
- e) 24 días, 4°C, c.h. 10%; f) 7 días, 4°C, c.h. 21%;
- g) 14 días, 4°C, c.h. 21%; h) 24 días, 4°C, c.h. 21%;
- i) 7 días, 10°C, c.h. 10%; j) 14 días, 10°C, c.h. 10%;
- k) 24 días, 10°C, c.h. 10%; l) 7 días, 10°C, c.h. 21%;
- m) 14 días, 10°C, c.h. 21%.

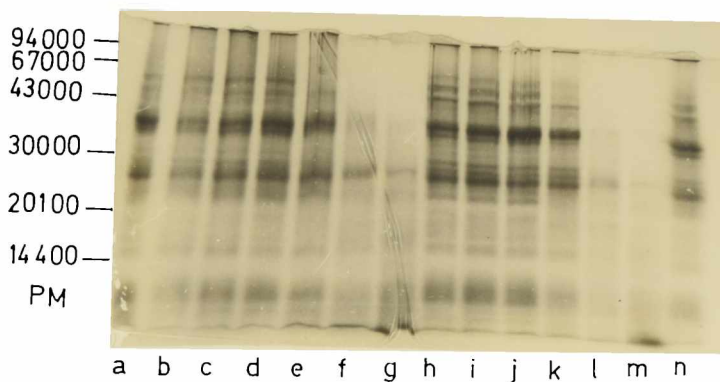


Figura 21: Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, de proteínas de germen de trigo almacenado en aire a 10 y 20°C. El muestreo se realizó a los 7, 14 y 24 días de almacenamiento.

- a) 24 días, 10°C, c.h. 21%; b) 7 días, 20°C, c.h. 10%;
 c) 14 días, 20°C, c.h. 10%; d) 24 días, 20°C, c.h. 10%;
 e) 7 días, 20°C, c.h. 21%; f) 14 días, 20°C, c.h. 21%;
 g) 24 días, 20°C, c.h. 21%; h) 7 días, 20°C, c.h. 10%
 con ME; i) 14 días, 20°C, c.h. 10% con ME; j) 24 días,
 20°C, c.h. 10% con ME; k) 7 días, 20°C, c.h. 21% con
 ME; l) 14 días, 20°C, c.h. 21% con ME; m) 24 días,
 20°C; c.h. 21% con ME; n) control, c.h. 10% con ME.

de corrida.

Una tercera experiencia se realizó con trigo cultivar Marcos Juárez almacenado en nitrógeno pero con contenidos de humedad del 14 y 19%, a 4 y 20°C. Los gérmenes se extrajeron y analizaron por la misma técnica anterior y se compararon con controles en aire almacenados en forma paralela. El almacenamiento duró seis meses salvo en aquellos casos en que la gran contaminación fúngica presente obligó a desechar el lote. Las figuras 22 y 23 muestran los densitogramas de geles en poliacrilamida con SDS obtenidos para extractos proteicos de germen separados de granos de trigo a distintos tiempos durante el almacenamiento.

Para granos de contenido de humedad del 14% no se observaron variaciones cualitativas entre las especies proteicas presentes, tanto a 4 como a 20°C en aire o nitrógeno para los distintos tiempos analizados. Contrariamente, a 19% de humedad, el diagrama electroforético muestra especialmente para germen de trigo almacenado en aire (Fig. 23c), que a medida que pasan los días, las proteínas de mayor peso molecular van desapareciendo y la zona que ocupan las proteínas de bajo peso molecular se va ensanchando. Estos resultados son equivalentes a los observados en el gel de la Figura 21 para germen de trigo almacenado con contenido de humedad del 21%. A 4°C (Fig. 22c) se observa lo mismo pero para tiempos mucho mayores (182 días).

Los tres ensayos estudiados muestran finalmente que para trigos con contenidos de humedad menores o iguales al 14% no es necesario modificar la atmósfera del silo o descender la

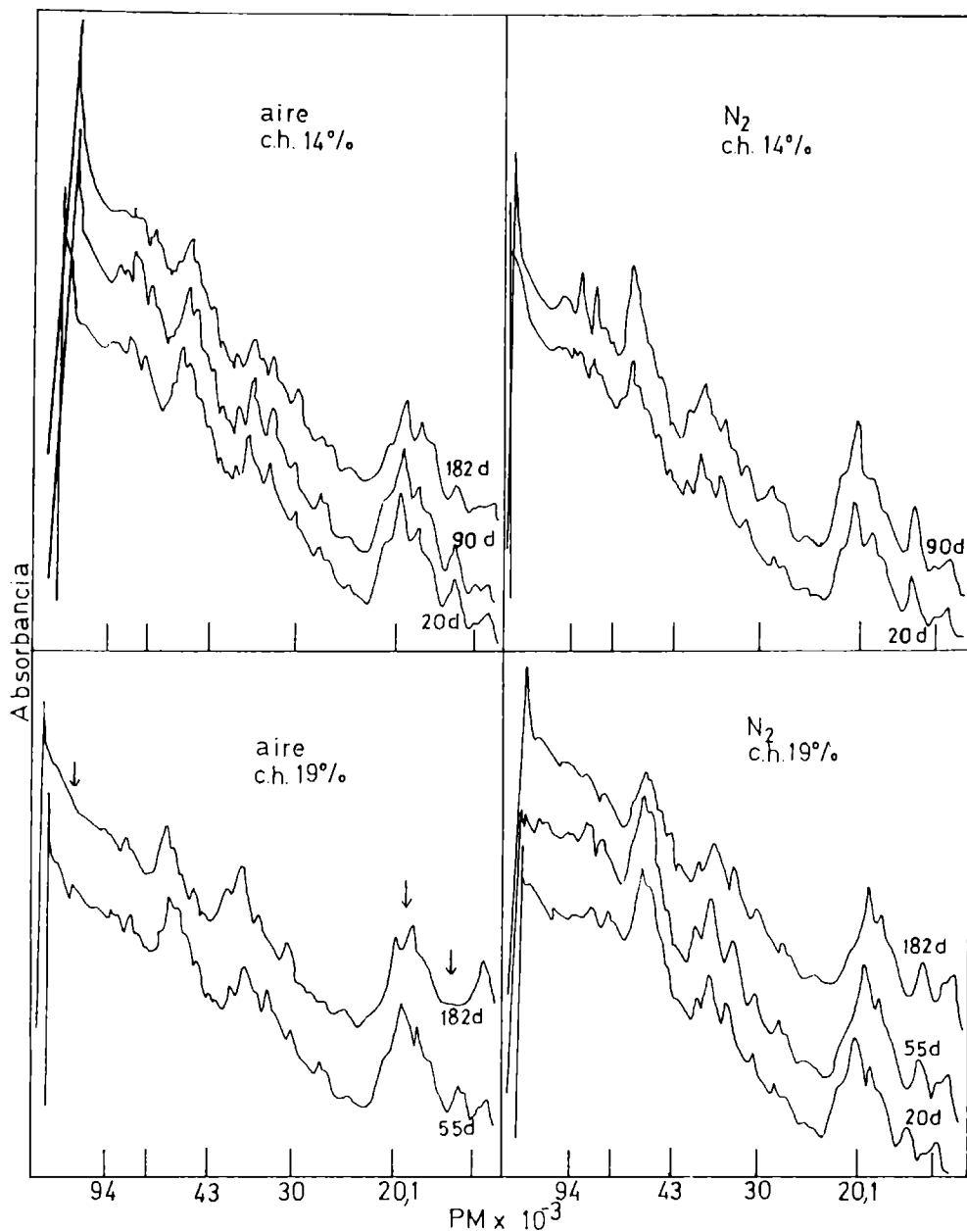


Figura 22: Diagramas electroforéticos de proteínas de germen de trigo almacenado a 20°C bajo distintas condiciones de humedad y atmósfera. El tiempo de muestreo se indica en cada diagrama. Las flechas señalan los picos que se modificaron.

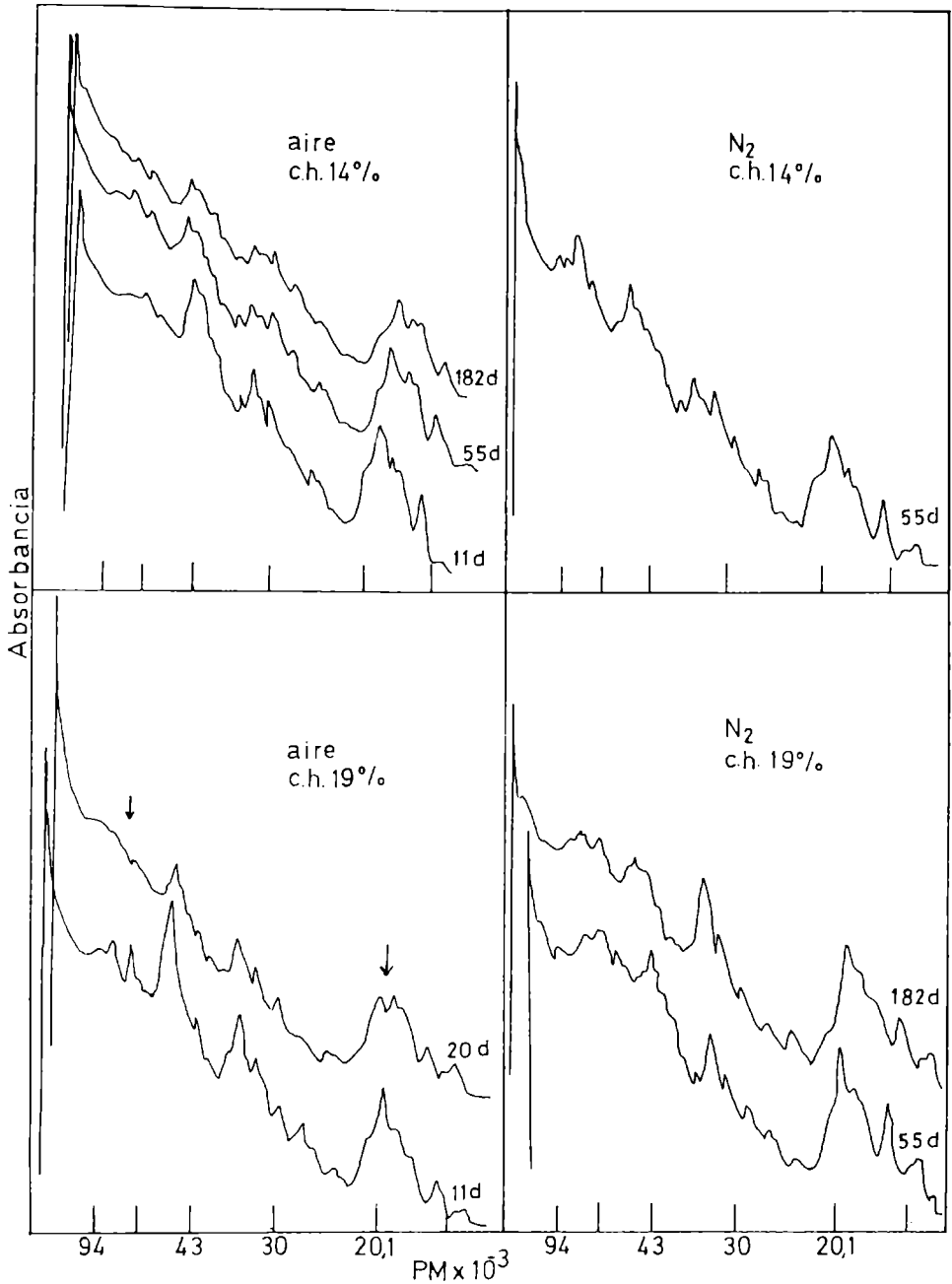


Figura 23: Diagramas electroforéticos de proteínas de germen de trigo almacenado a 4°C bajo distintas condiciones de humedad y atmósfera. El tiempo de muestreo se indica en cada diagrama. Las flechas señalan los picos que se modificaron.

temperatura del grano para poder mantener las características cualitativas originales del embrión. Paralelamente, la capacidad germinativa de estos trigos se mantuvo alta lo cual correlaciona bien con el mantenimiento del patrón proteico de germen.

Para contenidos de humedad mayores al 14% y menores al 19% no se observó alteración del patrón proteico de trigo mantenido en nitrógeno a 4 o 20°C. Para humedades mayores (por ejemplo 19 o 22%) es necesario almacenar en nitrógeno a 4°C para poder mantener el patrón proteico.

Contrariamente, en aire a 20°C, trigos de alto contenido de humedad (mayor o igual al 19%) mostraron desaparición de bandas de peso molecular elevado a la par que se ensanchó el bando en la zona de bajo peso molecular. La modificación del patrón proteico correlaciona bien con el hecho de que estas muestras mostraron disminución de germinabilidad respecto al valor original (Fig. 2) y presentaron además infección fúngica apreciable.

3.3. Metabolitos liberados a partir de germen de trigo

Como dijimos anteriormente, los hongos que contaminan granos almacenados son responsables, entre otras cosas, de la pérdida de viabilidad. Muchas veces estos contaminantes producen metabolitos capaces de dañar las membranas de tejidos vegetales enfermos, alterando su permeabilidad (Harman y Granett, 1972). Anderson y col. (1970) sugirieron que los miembros del

grupo *Aspergillus glaucus* eran capaces de deteriorar los sistemas de membranas en trigo.

El objetivo de este ensayo fue determinar cómo se afectaba la integridad de las membranas de germen de trigo almacenado bajo distintas condiciones, según muestra la Tabla III. Para ello se estudió la concentración de algunos metabolitos (glúcidos y aminoácidos) liberados a partir del germen separado del grano y colocado en medio glicerol 0.5 M.

Tabla III: Condiciones de almacenamiento de trigo

ATMOSFERA	TEMPERATURA (°C)	CONTENIDO DE HUMEDAD (%)
Aire	20	14
		19
	4	14
		19
Nitrógeno	20	14
		19
	4	14
		19

Los métodos de separación del germen involucraron dos formas principales: disección manual y separación por tratamiento mecánico en molinos. La primera es laboriosa pero logra separar componentes como el escutelo y el eje embrionario. La segunda por el contrario, es más sencilla pero es imposible separar completamente todos los componentes del germen.

Previamente a la disección manual, los granos pueden ser

humedecidos, lo cual si bien facilita la extracción posterior, se movilizan y redistribuyen los componentes solubles alterando así la composición química de las diferentes partes. En el ensayo que se analiza a continuación, solamente aquellos granos muy contaminados fueron sometidos a un lavado con hipoclorito de sodio al 10% previamente a la disección.

3.3.1. Liberación de glúcidos

El contenido de azúcares de germen disecado fue estudiado por primera vez por Dubois y col. (1960). Ellos hallaron que el contenido total de azúcares en embrión delipidado representaba el 20,1% de su peso seco. De tal porcentaje, el 41,5% era rafinosa y el 58,5% era sacarosa; de glucosa sólo hallaron trazas.

El ensayo de liberación de azúcares de germen realizado en glicerol 0,5M mostró por análisis en cromatografía en capa delgada (TLC) que había fundamentalmente tres azúcares bien definidos. Las muestras se corrieron con patrones internos identificándose así los picos como rafinosa, sacarosa y glucosa más fructosa (el método no logra separarlos).

En las figuras 24 y 25 se pueden apreciar los densitogramas obtenidos para muestras provenientes de cada uno de los ocho silos estudiados por TLC. En cada figura se puede observar el diagrama obtenido para los azúcares liberados al tiempo inicial y luego de seis meses de almacenamiento. Sólo las muestras de contenido de humedad 19% que fueron almacenadas en aire a 4

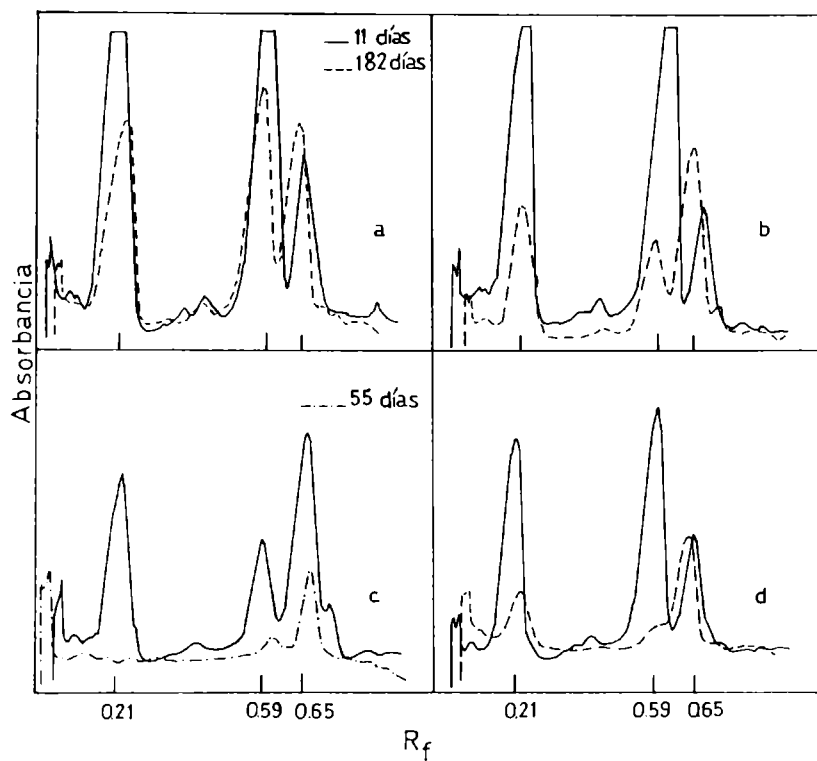


Figura 24: Cromatogramas de glúcidos liberados de germen de trigo almacenado a 20°C. a) aire, c.h. 14%; b) N₂, c.h. 14%; c) aire, c.h. 19%; d) N₂, c.h. 19%.

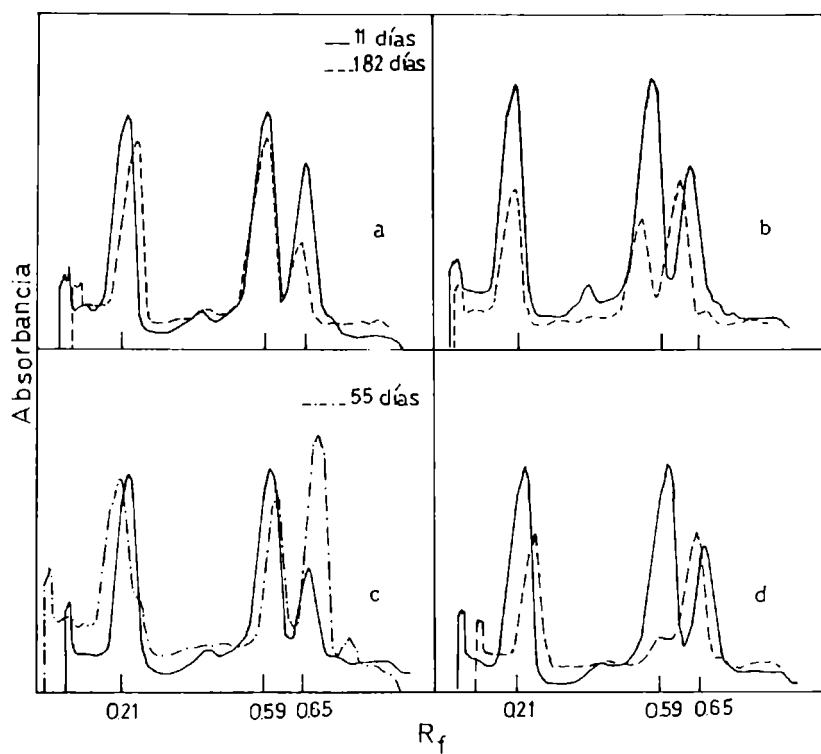


Figura 25: Cromatogramas de glúcidos liberados de germen de trigo almacenado a 4°C. a) aire, c.h. 14%; b) N₂, c.h. 14%; c) aire, c.h. 19%; d) N₂, c.h. 19%.

y 20°C se analizaron para el tiempo inicial y los 55 días. La razón por la cual se tomó un tiempo menor para estos silos fue porque a 20°C la contaminación fúngica deterioró los granos a mayor velocidad. A pesar de que la muestra a 4°C se mantuvo sin contaminar por un lapso mayor que la de 20°C, en ambos casos se trazaron los diagramas para los 55 días de almacenamiento. De esta manera fue posible comparar y discutir los resultados.

El porcentaje de cada azúcar en el sobrenadante se calculó en función del área total obtenida en el densitograma al tiempo inicial. Los valores obtenidos fueron: rafinosa 40,13%; sacarosa 47,60%; glucosa más fructosa 7,70%; otros 4,57%.

Comparando estos valores con los antes citados por Dubois y col. (1960) podemos apreciar que los azúcares liberados guardan entre sí aproximadamente la misma relación que en el interior de las células.

Del análisis cualitativo se desprende que a contenidos de humedad del 14% aún a los 182 días siguen liberándose los tres azúcares hallados. Por el contrario, para contenidos de humedad del 19% y en atmósfera de nitrógeno tanto a 20 como a 4°C, el pico de sacarosa tiende a desaparecer con el tiempo. Cabe señalar que el almacenamiento en aire a este contenido de humedad varía mucho cuando se realiza a 20 o a 4°C. Las figuras 24c y 25c muestran que a los 55 días, a 4°C, se siguen liberando los tres azúcares, mientras que a 20°C, rafinosa ya no aparece en el sobrenadante y sacarosa se ha reducido mucho.

De los densitogramas obtenidos, se calcularon las alturas de pico por germen (Tabla IV), de manera de poder comparar en

forma relativa el aumento o disminución de cada pico inicial con los obtenidos luego de un cierto período de almacenamiento (55 o 182 días).

Tabla IV: Altura de picos correspondientes a hidratos de carbono liberados de germen de trigo almacenado bajo distintas condiciones.

Almacenamiento a 20°C

HIDRATO DE CARBONO	Aire c.h. 14%		N ₂ c.h. 14%		Aire c.h. 19%		N ₂ c.h. 19%	
	t ₀	182 días	t ₀	182 días	t ₀	55 días	t ₀	182 días
Rafinosa	14,4	9,1	14,4	7,1	15,8	1,5	15,8	4,3
Sacarosa	17,4	10,3	17,4	5,5	19,7	2,5	19,7	2,5
Gluc + Fru	5,6	9,0	5,6	10,3	7,8	7,3	7,8	7,3

Almacenamiento a 4°C

HIDRATO DE CARBONO	Aire c.h. 14%		N ₂ c.h. 14%		Aire c.h. 19%		N ₂ c.h. 19%	
	t ₀	182 días	t ₀	182 días	t ₀	55 días	t ₀	182 días
Rafinosa	14,4	11,3	14,4	8,3	15,8	12,6	15,8	9,8
Sacarosa	17,4	11,6	17,4	6,8	19,7	11,6	19,7	3,6
Gluc + Fru	5,6	5,8	5,6	9,0	7,8	15,2	7,8	10,4

De este análisis surge que en general, el contenido de azúcares no reductores (sacarosa y refinosa) disminuye mientras que el de azúcares reductores (glucosa + fructosa) aumenta en distintas proporciones o permanece casi invariable en algunos casos.

Si tomamos en forma individual los resultados obtenidos para granos de contenido de humedad 14% podemos observar que cuando el almacenamiento se realiza en atmósfera de nitrógeno a 4°C o a 20°C la cantidad de sacarosa en el sobrenadante disminuye en el tiempo más que cuando el almacenamiento se realiza en aire. El porcentaje promedio de disminución de sacarosa a los 182 días de almacenamiento en aire fue del 37%, mientras que en nitrógeno fue del 64,7% para el mismo período. Todas estas muestras de contenido de humedad 14% mantuvieron elevada su capacidad germinativa y no presentaron contaminación apreciable a simple vista en el silo. Debido a estos resultados, no podríamos atribuir la disminución de sacarosa al consumo por parte de los hongos. Sin embargo, es factible pensar que dado que en anaerobiosis la energía obtenida del metabolismo de hidratos de carbono es mucho menor que la obtenida durante la respiración aeróbica, la propia semilla estaría desdoblando sacarosa para rendir mayor cantidad de hidratos de carbono sencillos y obtener así la energía necesaria para mantener su estado de latencia. La hidrólisis de sacarosa se debería principalmente a la acción de la invertasa, enzima presente en germen de trigo (Proskuryakov y Radionova, 1960) y a la actividad de enzimas fúngicas provenientes de la escasa contaminación hallada.

Si evaluamos ahora el comportamiento de granos almacenados con alto contenido de humedad (Tabla IV) podemos apreciar que sacarosa disminuye en el sobrenadante obtenido de granos mantenidos en nitrógeno por 182 días a 4°C y a 20°C, en un

porcentaje mayor al 80% de lo liberado inicialmente. El almacenamiento en aire a 20°C mostró que para tiempos mucho menores (55 días) los gérmenes de granos de contenido de humedad 19% liberaban también menor cantidad de sacarosa que al tiempo inicial. La disminución registrada en este caso fue el 87,3% del valor original, en tanto que a 4°C la disminución registrada para el mismo período de almacenamiento representó sólo el 41,1% del valor inicial.

Otra diferencia hallada a los 55 días para las muestras en aire a 4°C y a 20°C fue que a 4°C, glucosa más fructosa aumentaron muchísimo en el sobrenadante (94,8%), mientras que a 20°C disminuyeron el 6,5% del valor obtenido al tiempo inicial. Esta diferencia no se puede atribuir al tipo de contaminantes ya que en ambos casos creció *Penicillium* invadiendo el 50% de los granos a 20°C y el 49% a 4°C. La única diferencia que podría explicar esta situación es que la velocidad de desarrollo fúngico es mucho mayor a 20 que a 4°C y por ende el consumo de glucosa y fructosa podría ser mayor en estos casos, dando por resultado disminución de estos azúcares en el sobrenadante.

Las únicas muestras en las que glucosa más fructosa no aumentaron, sino que disminuyeron en el sobrenadante, fueron aquellas de contenido de humedad 19% mantenidas a 20°C tanto en aire como en nitrógeno. Dichas muestras presentaron contaminación con *Penicillium* y con *Fusarium* respectivamente, habiéndose iniciado la invasión entre la primera y la segunda semana de almacenamiento (Fig. 14b y 16a). En ambos casos, la disminución de hidratos de carbono liberados sería atribuible tanto al consumo

interno de la semilla como al consumo debido a hongos.

Los azúcares no reductores de estas mismas muestras también disminuyeron en el sobrenadante, lo cual indicaría que fueron hidrolizados y consumidos ya que el "pool" de azúcares reductores liberados no aumentó.

También se realizó el análisis cuantitativo de rafinosa y sacarosa en el ensayo de liberación.

De acuerdo a los datos de bibliografía citados y tomando como peso promedio del germen delipidado el valor 0,62 mg, la cantidad aproximada de azúcares por germen de trigo control, no sometido a ningún tratamiento, sería la siguiente:

mg azúcares totales/germen \approx 0,113 mg

mg rafinosa / germen \approx 0,047 mg

mg sacarosa / germen \approx 0,066 mg

La Figura 26 muestra la variación del contenido de sacarosa y rafinosa en el ensayo a 4 y 20°C. Como era de esperar, en todos los casos la cantidad de azúcares liberados fue inferior a la existente en el interior del germen sin almacenar.

En general, para contenidos de humedad altos, la cantidad de azúcares liberados disminuye con el tiempo, siendo esto más notable a 20°C que a 4°C.

Ya en 1960, Dubois y col. observaron que el contenido de azúcares totales en germen era menor cuanto mayor era el contenido de humedad del mismo. Ellos atribuyeron esta variación bien a la traslocación o movilización de hidratos de carbono o bien a un incremento de la respiración.

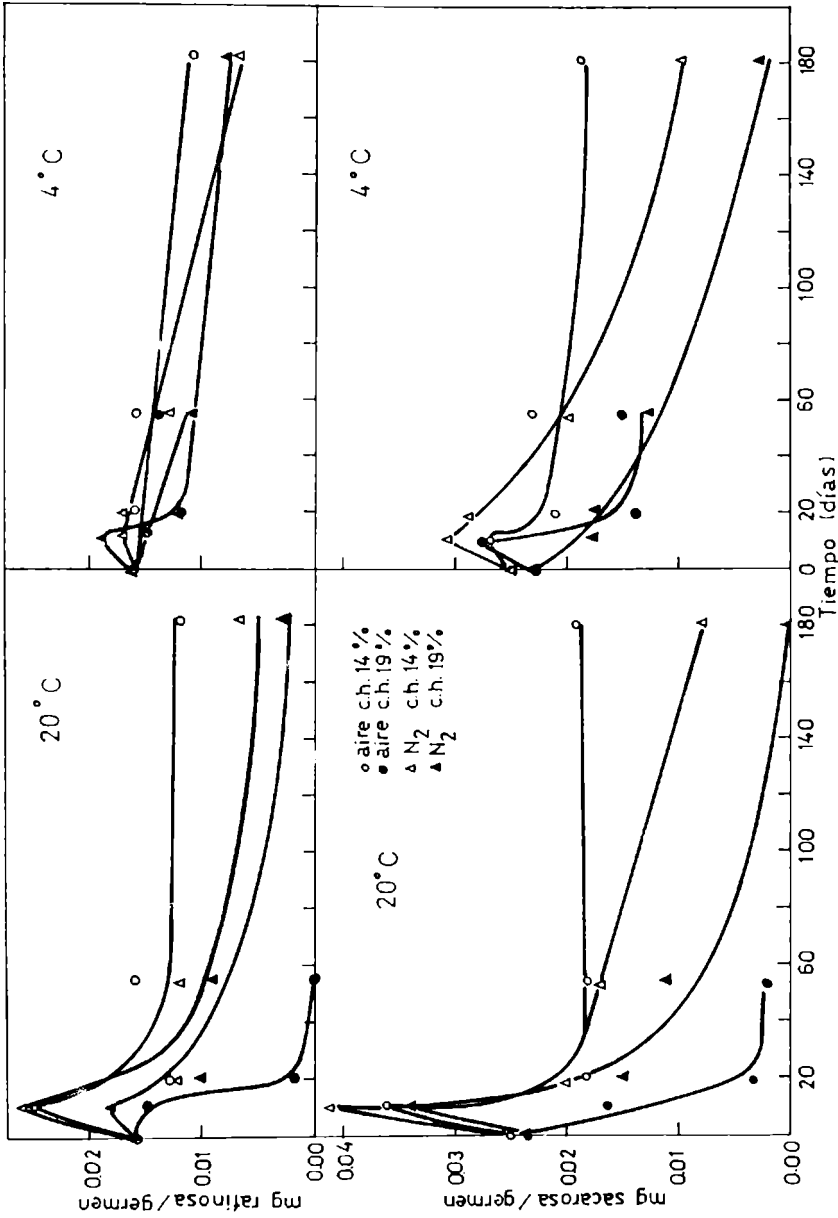


Figura 26: Medida de la concentración de sacarosa y rafinosa liberadas de germen de trigo en medio glicerol 0.5 M.

En nuestro ensayo, dichas muestras presentaron abundante contaminación fúngica, registrándose un aumento considerable de la actividad respiratoria del grano. En base a esto es posible considerar que además de la movilización de hidratos de carbono (debida al alto contenido de humedad del grano) existiría consumo de azúcares por parte de los hongos.

Si ahora estudiamos en forma particular la evolución del contenido de sacarosa y rafinosa en el sobrenadante obtenido de la muestra almacenada en aire a 20°C con contenido de humedad del 14%, vemos que la concentración es máxima a los 11 días de almacenamiento pero luego se estabiliza en un valor constante.

Si consideramos sólo la porción constante de dicha curva podríamos evaluar las siguientes posibilidades respecto a la permeabilidad de las membranas:

- 1) No hubo modificación de la permeabilidad de membranas a lo largo del tiempo de almacenamiento.
- 2) Aumenta la permeabilidad pero la concentración de hidratos de carbono en el sobrenadante no aumenta porque la consumen los hongos contaminantes.
- 3) Aumenta la permeabilidad pero la concentración de hidratos de carbono en el sobrenadante no aumenta porque la respiración de la semilla aumenta.
- 4) Aumenta la concentración interna de sacarosa y rafinosa pero las membranas son menos permeables.
- 5) Aumenta la concentración interna de azúcares no reductores, la permeabilidad no se modifica, pero la concentración de

los mismos en el sobrenadante disminuye por consumo a nivel de contaminantes.

- 6) Aumenta la concentración interna de azúcares no reductores, la permeabilidad no se modifica, pero la concentración de estos azúcares en el sobrenadante disminuye por aumento de la actividad respiratoria de la semilla.

De lo anterior se desprende que las propuestas 2 y 5, en este caso particular, no son válidas pues la contaminación fue nula. Las opciones 3 y 6 son falsas pues la actividad respiratoria del grano fue menor luego de un período de almacenamiento que al tiempo inicial. La cuarta posibilidad es altamente improbable por lo que asumimos que la permeabilidad de membranas no se modificaría por procesos inherentes a la semilla o por envejecimiento de la misma. Además, el hecho de que la concentración de sacarosa y rafinosa en el sobrenadante no se modificara a lo largo del tiempo, indicaría que los niveles intracelulares de estos azúcares se mantendrían durante el período de almacenamiento. Queda entonces la propuesta 1 como la más aceptable.

Tomando como control el caso recién analizado podemos compararlo con los resultados obtenidos para germen de trigo de contenido de humedad 19% almacenado en aire a 20°C. La Figura 26 muestra la evolución de sacarosa y rafinosa en el sobrenadante de dicha muestra. Se puede observar que no existe una porción constante en la curva tal como sucedía para contenido de humedad del 14%. En este caso, la disminución de di y trisacáridos fue continua en el sobrenadante a lo largo del almacenamiento;

la viabilidad del grano disminuyó; *Penicillium* contaminó el silo y la respiración aumentó. De esta manera, si las membranas se hubieran hecho más permeables no podríamos saberlo pues el consumo de glúcidos por parte de los hongos haría que el total de azúcares libres disminuyera.

No es entonces posible determinar el estado de membranas valiéndonos exclusivamente de los azúcares liberados ya que el consumo a nivel fúngico actuaría en forma opuesta a dicho proceso.

3.3.2. Liberación de aminoácidos

El análisis de aminoácidos liberados a partir de germen de trigo sometido a distintas condiciones de almacenamiento se realizó por cromatografía en placa delgada (TLC). Se obtuvieron once picos principales que se identificaron en base a patrones analizados por la misma técnica. La Figura 27 muestra el densitograma obtenido de germen de trigo de contenido de humedad 19% al iniciar el almacenamiento. En general, los diagramas se mantuvieron sin cambios para las distintas muestras tomadas a lo largo del almacenamiento, variando en algunos casos las proporciones de los picos en el tiempo. Algunos investigadores han reportado transformaciones cualitativas durante el deterioro incipiente del grano a pesar de que la cantidad total de aminoácidos libres se modificaría recién en estados de deterioro muy avanzados (De Vay, 1952; Linko y Milner, 1959).

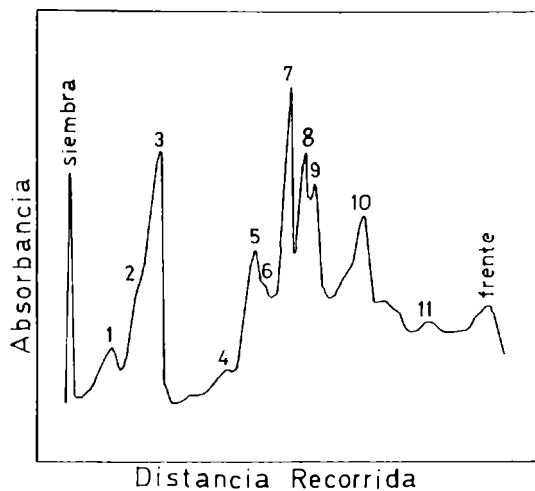


Figura 27: Cromatograma de aminoácidos liberados en medio glicerol 0.5 M a partir de germen de trigo de c.h. 19%.

1) Cys; 2) Arg + Lys (?); 3) (?); 4) Asp + Asn; 5) Gln; 6) Ser; 7) Pro + Glu (?); 8) Ala; 9) Thr; 10) Val; 11) Ileu, Leu + Tyr(?)

(?): Indica que no hay certeza acerca de la identidad de dicho pico.

La Tabla V muestra la altura de pico por germen calculada a partir de los densitogramas correspondientes. Comparando las alturas al iniciar el almacenamiento con aquellas obtenidas luego de 182 días en el silo, se puede observar que algunos picos disminuyeron o permanecieron invariables. El único pico que disminuyó en todas las muestras al cabo de seis meses de almacenamiento fue el correspondiente al ácido glutámico más prolina. Como es sabido, el ácido glutámico es el aminoácido más frecuentemente utilizado en el metabolismo celular dado que ingresa directamente en las vías de síntesis de otros aminoácidos. Presumiblemente su utilización estaría mediada por la activación de la enzima ácido glutámico decarboxilasa con el aumento de humedad.

Si observamos los resultados obtenidos para germen de trigo húmedo (contenido de humedad 19%) que se almacenó tanto a 20°C como a 4°C en aire, podemos destacar que el pico correspondiente al ácido aspártico más asparagina aumentó en casi dos meses de almacenamiento 3 y 5,5 veces respectivamente. Dado que estas muestras presentaron alto grado de contaminación es posible pensar que la presencia de enzimas proteolíticas, tanto en granos como en los microorganismos asociados, sea responsable de la hidrólisis proteica a polipéptidos y finalmente a aminoácidos. Esta actividad proteolítica intensa conduciría a una desorganización del sistema de membranas por lo que aquella porción de aminoácidos libres que no fueron metabolizados por los hongos, se estarían liberando al medio. De ahí que a tiempos cortos (55 días) hallemos mayor cantidad de aminoácidos

Tabla V: Altura de picos correspondientes a aminoácidos liberados de germen de trigo almacenado bajo distintas condiciones

Picos	TEMPERATURA = 20°C						TEMPERATURA = 4°C								
	aire, c.h. 14%		N ₂ , c.h. 14%		aire, c.h. 19%		aire, c.h. 14%		N ₂ , c.h. 14%		aire, c.h. 19%				
	t ₀	182 d	t ₀	182 d	t ₀	55 d	t ₀	182 d	t ₀	182 d	t ₀	55 d	t ₀	182 d	
Cys	2,4	1,6	2,4	1,3	2,0	3,1	2,0	1,7	2,4	1,3	2,4	1,7	2,0	2,5	2,0
Arg + Lys	6,3	5,0	6,3	5,1	5,4	10,6	5,4	5,2	6,3	3,4	6,3	5,5	5,4	5,2	5,4
??	9,8	7,7	9,8	7,8	8,8	9,7	8,8	10,2	9,8	7,3	9,8	8,7	8,8	9,1	8,8
Asp + Asn	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2	3,5	1,2	1,2	1,3	1,1	1,3	1,6	1,2	6,6	1,2
Gln	5,2	4,6	5,2	3,1	4,9	5,4	4,9	2,4	5,2	3,7	5,2	3,4	4,9	-	4,9
Ser	4,3	3,9	4,3	3,0	4,5	6,9	4,5	-	4,3	2,6	4,3	3,0	4,5	4,1	4,5
Pro + Glu	10,8	6,0	10,8	4,7	8,6	10,6	8,6	3,6	10,8	4,0	10,8	5,6	8,6	7,0	8,6
Ala	9,5	6,0	9,5	4,8	8,3	3,6	8,3	5,0	8,5	4,1	8,5	4,6	9,3	7,8	8,3
Thr	5,9	6,0	5,9	4,5	6,6	6,0	6,6	3,6	5,9	4,5	5,9	3,4	6,6	4,6	6,6
Val	3,3	3,6	3,3	3,8	4,1	4,7	4,1	3,2	3,3	2,8	3,3	3,3	4,1	5,0	4,1

en el sobrenadante, o por lo menos igual cantidad de ellos, lo que indica que la porción consumida por los microorganismos se restituiría a partir de la hidrólisis proteica.

A 4°C, los picos restantes (excluyendo valina que también aumentó) permanecieron prácticamente iguales o disminuyeron mientras que a 20°C todos aumentaron, a excepción de treonina y valina que no se modificaron. Esta variación en la extensión de la proteólisis a 4 y a 20°C no se puede atribuir al tipo o nivel de contaminantes puesto que ambas muestras presentaron el mismo porcentaje de granos infectados con el género *Penicillium*, luego de 55 días de almacenamiento. La diferencia en el comportamiento se debe probablemente al efecto que ejerce la temperatura. A 4°C, la velocidad de los procesos enzimáticos responsables de la hidrólisis proteica sería menor que a 20°C por lo que se requerirían tiempos mayores para alcanzar un nivel de proteólisis semejante al registrado a 20°C luego de dos meses de almacenamiento.

Esta hipótesis se apoya también en los resultados obtenidos del análisis electroforético de proteínas de germen. Las figuras 22c y 23c muestran la desaparición de especies proteicas en especial de alto peso molecular, en germen de trigo almacenado en aire a 4°C o 20°C con contenido de humedad del 19%. Esta modificación del diagrama electroforético es mayor a 20°C que a 4°C lo cual corrobora lo dicho anteriormente.

Finalmente, la Figura 21 muestra para tiempos más cortos (24 días) el mismo resultado en el gel de poliacrilamida para trigo húmedo (contenido de humedad 21%) almacenado en aire a

20°C.

Analizaremos ahora los resultados obtenidos en este ensayo para la muestra de germen de trigo almacenado a 20°C con contenido de humedad del 19% pero en atmósfera de nitrógeno. Luego de 182 días de almacenamiento algunos picos disminuyeron y otros permanecieron invariables. A diferencia de la muestra almacenada en aire, no se registró actividad proteolítica. Esto a su vez se corroboró con los resultados obtenidos del análisis electroforético de proteínas de germen de trigo almacenado en las mismas condiciones.

En la Figura 23d se puede observar que a los 182 días de almacenamiento, el número y calidad de las especies proteicas presentes se mantuvieron prácticamente sin cambios. No obstante, debemos tener en cuenta que si bien ambas muestras a 20°C con contenidos de humedad del 19% almacenadas en aire durante 55 días y en nitrógeno durante 182 días presentaron infección fúngica en más del 50% de sus granos, sólo aquella almacenada en aire sufrió proteólisis intensa aún para tiempos más cortos que la muestra en nitrógeno donde no se observó actividad proteolítica. Si bien ambas muestras estaban igualmente infectadas, del silo en aire se aisló *Penicillium* y del silo en nitrógeno se aisló *Fusarium*. Esta diferencia en la identidad del contaminante pudo ser la responsable del comportamiento diferencial a nivel proteico que se observó en el ensayo.

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO FUNGICO EN MEDIOS
DE CULTIVO ARTIFICIALES

Otro punto importante para analizar fue el comportamiento de cepas fúngicas aisladas de trigo.

Así como se estudió la evolución de la flora fúngica capaz de desarrollar en granos almacenados bajo distintas condiciones, también se estudió la cinética de crecimiento de estas mismas cepas en medios de cultivo preparados artificialmente.

Las curvas de crecimiento y tiempos de latencia se obtuvieron para distintas temperaturas de incubación, distintas atmósferas y distintos contenidos de agua del sustrato. El análisis se realizó en todos los casos para cada una de las cepas en forma aislada, no pudiéndose entonces detectar la influencia de un microorganismo sobre otro.

De todas maneras, los resultados aquí obtenidos se compararon con los resultados in vivo, hallándose buena correlación entre ambos.

1. INFLUENCIA DE LA ATMOSFERA Y LA TEMPERATURA SOBRE EL DESARROLLO FUNGICO

El comportamiento de la flora fúngica en el interior del silo se comparó con estudios realizados in vitro. Las cepas aisladas a partir de las semillas se identificaron microscópicamente por observación de microcultivos realizados en agar papa tal como se describió en la sección 6.3. de Materiales y Métodos. Las mismas fueron luego inoculadas puntualmente en placas de agar extracto de malta de actividad acuosa variable. El crecimiento se evaluó midiendo dos diámetros perpendiculares de cada colonia sobre el reverso de cada placa (Brancato y Golding, 1953; Pirt, 1967). Se trabajó por triplicado. Esta medición lineal presenta la ventaja de ser simple y no destructiva pudiéndose así realizar varias mediciones en un mismo cultivo.

1.1. Influencia del nitrógeno

El objetivo de este estudio fue poder determinar en qué medida las variaciones de temperatura y atmósfera influían sobre el desarrollo fúngico. Para ello, placas de agar extracto de malta con actividad acuosa del 0.999 se inocularon puntualmente con las siguientes cepas: *Alternaria* spp., *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus* Link y *Penicillium cyclopium*. La incubación se realizó a 4°C y a 20°C en nitrógeno y en aire. Las placas incubadas en nitrógeno se colocaron semiabiertas en una jarra de anaerobiosis Oxoid, a la que se le modificó la

atmósfera interior hasta valores de oxígeno menores al 0,06% y nitrógeno de 99,94% (Ver Materiales y Métodos).

Las curvas de crecimiento se obtuvieron graficando el diámetro de la colonia en función del tiempo de incubación (Fig. 28). La pendiente de la porción lineal de esta curva permitió la evaluación de la constante de velocidad de crecimiento (K_m) y por extrapolación de dicha porción al valor del diámetro inicial, se obtuvo el tiempo de latencia (Lag). En nitrógeno a 4°C, ninguna de las cuatro cepas fue capaz de crecer. Por el contrario, en aire a 20°C el desarrollo fue abundante, pero al disminuir la temperatura de incubación, el crecimiento de *Alternaria* spp., *Fusarium graminearum* y *Penicillium cyclopium* se retardó notablemente (en promedio seis veces) y se inhibió completamente para *Aspergillus flavus* Link.

En nitrógeno a 20°C, *Alternaria* spp. y *Penicillium cyclopium* no lograron desarrollar, en tanto que *Fusarium graminearum* y *Aspergillus flavus* Link decrecieron cuatro y diez veces su velocidad de crecimiento en relación al aire, respectivamente (Tabla 6). El período de latencia, Lag, en aire aumentó entre dos y seis veces (dependiendo del género) cuando la temperatura de incubación disminuyó de 20 a 4°C. A su vez, *Fusarium graminearum* triplicó su Lag respecto al de aire, al incubarse en nitrógeno a 20°C. Debido a esto podemos estimar que el desarrollo de este hongo se afecta más por un descenso de la temperatura que por una semianaerobiosis. En base a esta observación se trató de determinar si el crecimiento de este hongo en aire tenía las mismas características que en nitrógeno. Para ello

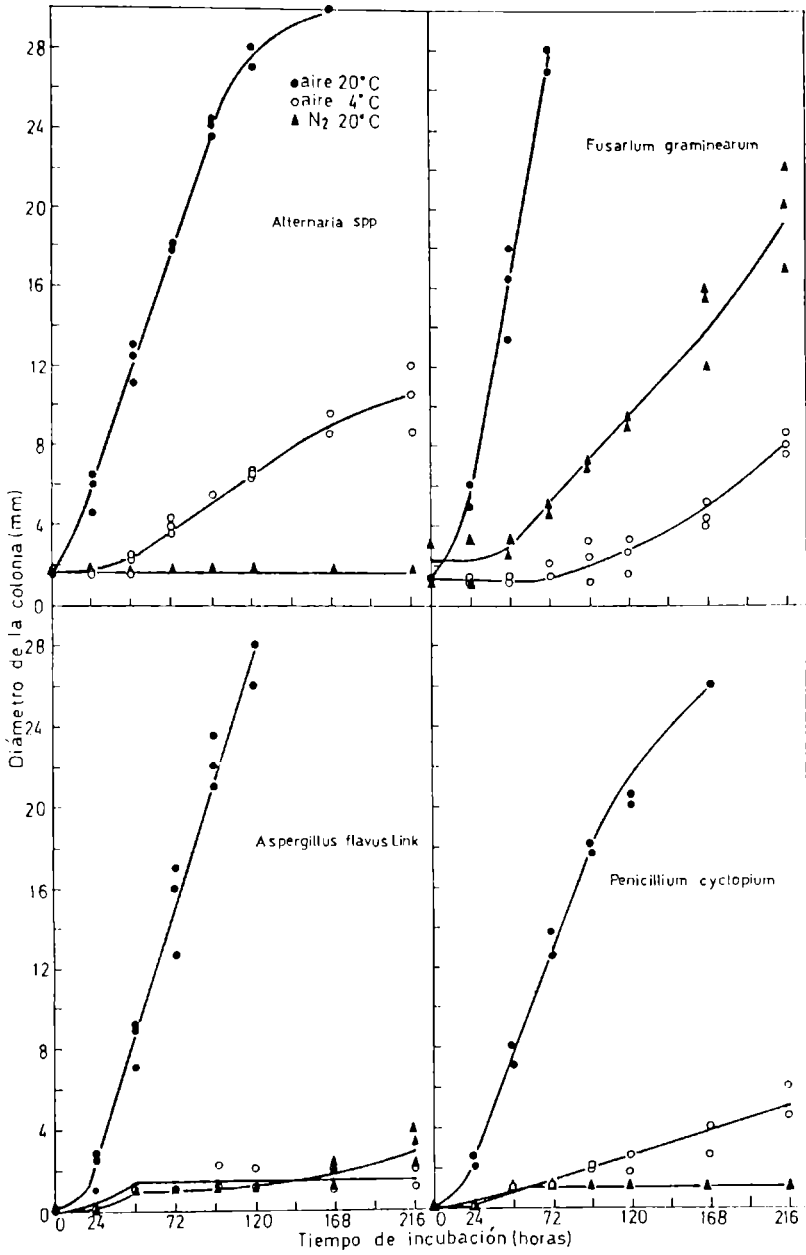


Figura 28: Variación del diámetro de colonia en función del tiempo de incubación.

Tabla VI: Constante de velocidad de crecimiento en aire y en nitrógeno a 4 y 20°C

Cepa fúngica	K_m (mm/hr)		
	Aire, 20°C	Aire, 4°C	N ₂ , 20°C
<i>Alternaria</i> spp	0,230	0,042	No crece
<i>Fusarium graminearum</i>	0,436	0,050	0,103
<i>Aspergillus flavus</i> Link	0,270	No crece	0,028
<i>Penicillium cyclopium</i>	0,187	0,039	No crece

se realizaron microcultivos en agar extracto de malta y agar papa glucosa, y se incubaron en nitrógeno a 20°C. Luego de una semana se observó crecimiento de micelio y pigmentación característica, pero no se detectó formación de esporos. Bottomley y col. (1950) hallaron muy afectada la esporulación en condiciones casi anaeróbicas (concentración de oxígeno del 0,1%) de hongos aislados de maíz a pesar de no inhibirse su desarrollo.

1.2. Influencia del dióxido de carbono

En general se acepta que los hongos son aeróbicos y que la disminución de la concentración de oxígeno o el aumento de la concentración de dióxido de carbono limita su actividad (Bothast, 1978).

Peterson y col. (1956) almacenaron trigo húmedo y observaron el efecto de las distintas concentraciones de oxígeno y dióxido de carbono sobre el desarrollo fúngico, la respiración y la viabilidad del grano. Ellos hallaron que el desarrollo de los hongos de almacenamiento se reduce o disminuye con concentraciones decrecientes de oxígeno (hasta un valor del 0,2%). Por debajo de un nivel mínimo, cesa el desarrollo, lo cual no implica que el hongo haya muerto. El cociente respiratorio elevado indicó la presencia de un metabolismo anaeróbico. Las mezclas de gases (dióxido de carbono y oxígeno) que contenían oxígeno en la concentración normalmente presente en aire (21%) tuvieron poca influencia en el desarrollo fúngico hasta que la concentración de dióxido de carbono alcanzó el rango 13,8-18,6%.

En estas condiciones tanto la respiración como el desarrollo fúngico se inhibieron casi completamente. No obstante, se necesitaron concentraciones de dióxido de carbono mucho mayores para reducir la viabilidad.

Con el fin de estudiar la respuesta de distintas cepas a la acción del dióxido de carbono no dentro de la masa de granos, sino individualmente en medios de cultivo, se inocularon puntualmente placas de agar Sabouraud maltosa con esporas de *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. Las placas se incubaron en atmósfera rica en dióxido de carbono. Se utilizaron jarras de anaerobiosis Oxoid y se les inyectó dióxido de carbono de tubo ($\text{CO}_2 = 94,5\%$; $\text{O}_2 = 1,13\%$ y $\text{N}_2 = 4,3\%$) durante 1 hora 20 minutos. Luego la jarra se cerró dejando una leve sobrepresión. El conjunto se incubó a temperatura ambiente ($20-27^\circ\text{C}$).

Luego de una semana, no se registró crecimiento alguno para ninguna de las tres cepas estudiadas. Las mismas placas fueron luego incubadas en aire donde sí se observó desarrollo de colonias. Este efecto reversible de inhibición del crecimiento fúngico coincide con lo observado por Peterson y col. (1956) dentro del silo.

Si ahora comparamos el comportamiento fúngico in vitro en atmósferas muy ricas en dióxido de carbono con el comportamiento en atmósferas muy ricas en nitrógeno, vemos que son diferentes independientemente del contenido residual de oxígeno que posean. De esta manera pudimos comprobar que en atmósfera de dióxido de carbono con 1,13% de oxígeno no se registró

desarrollo fúngico luego de siete días de incubación, mientras que en atmósfera de nitrógeno conteniendo 0,06% de oxígeno *Fusarium graminearum* y *Aspergillus flavus* Link fueron capaces de desarrollar aunque a velocidades cuatro y diez veces menores que en aire respectivamente.

Respecto al tratamiento en dióxido de carbono cabe destacar dos posibilidades: una sería que el dióxido de carbono inhibiera o deprimiera completamente el desarrollo fúngico y la otra, que el tiempo de latencia (Lag) se hubiera prolongado tanto que siete días no fueran suficientes para detectar desarrollo alguno.

2. EFECTOS DEL CAMBIO DE ATMOSFERA DURANTE EL DESARROLLO FUNGICO

Se trató de determinar en qué medida la incubación consecutiva de la misma cepa en distintas atmósferas tanto a 4 como a 20°C, afectaba al desarrollo fúngico.

Las cuatro cepas aisladas se inocularon puntualmente en agar extracto de malta ($a_w = 0,999$). La Tabla 7 muestra las constantes de velocidad de crecimiento para los distintos tratamientos. Comparando los datos de las tablas 6 y 7 es posible observar que tratamientos cortos (hasta tres días) en atmósfera de nitrógeno previos a la incubación en aire, tanto a 4°C como a 20°C, no afectan prácticamente los valores de la constante de velocidad de crecimiento (K_m). Esto indicaría que la inhibición total o parcial del desarrollo micelial en nitrógeno

Tabla VII: Constante de velocidad de crecimiento en tratamientos combinados de atmósfera y temperatura

Cepa fúngica	K_m (mm/hr)	
	Aire, 20°C poste-rior a 3 días N ₂ 20°C	Aire, 4°C, poste-rior a 3 días N ₂ 4°C
<i>Alternaria</i> spp.	0,229	0,043
<i>Fusarium</i> graminearum	0,443	0,045
<i>Aspergillus</i> flavus Link	0,251	No crece
<i>Penicillium</i> cyclopium	0,204	0,043
		N ₂ , 20°C poste-rior a 1 día aire 20°C
		0,003
		0,154
		0,053
		No crece

sólo ocurre durante el período en el cual se realiza el tratamiento, pero no ejercería influencia alguna sobre el desarrollo fúngico posterior si se varían las condiciones del entorno. Serafini y col. (1980) hallaron el mismo resultado trabajando con trigo infectado con *Aspergillus flavus*, *Penicillium cyclopium*, *Aspergillus chevalieri* y *Candida krusei*, el cual se almacenó en nitrógeno. Ellos concluyeron que el efecto inhibitorio del desarrollo dado por la anoxia, se limitaba estrictamente al período de aplicación del nitrógeno.

Cuando se cultivaron los hongos un día en aire a 20°C y luego se transfirieron a nitrógeno a la misma temperatura, se pudo detectar una pequeña alteración en el comportamiento de *Alternaria* spp. Esta cepa, incapaz de crecer en anaerobiosis (Tabla 6), logró continuar su desarrollo aunque muy lentamente en nitrógeno ($K_m = 0,003$ mm/hr) si éste se había iniciado en aire. Las constantes de velocidad de crecimiento en nitrógeno a 20°C para *Fusarium graminearum* y *Aspergillus flavus* Link aumentaron una vez y media y dos veces respectivamente, cuando las cepas se incubaron primero en aire a 20°C, durante 24 horas y recién después se transfirieron a nitrógeno a la misma temperatura (comparar tablas 6 y 7).

Contrariamente, *Penicillium cyclopium* fue incapaz de crecer en atmósfera de nitrógeno a 20°C a pesar de incubarse previamente en aire a 20°C durante un día.

En base a los resultados podemos estimar que una atmósfera que permita el desarrollo fúngico puede no ser apropiada para iniciar dicho desarrollo y aquellas cepas capaces de tolerar

la anoxia pueden aumentar su velocidad de crecimiento en anaerobiosis si el desarrollo se inicia en condiciones aeróbicas. Por el contrario, los trabajos de Serafini y col. (1980) mostraron que el efecto del nitrógeno sobre diferentes estadios de la curva de crecimiento en aire de *Aspergillus flavus*, producía la inhibición del desarrollo fúngico en siete días de aplicación del gas si se tomaba el desarrollo en fase logarítmica y en 14 días si se tomaba en la fase de adaptación de la cepa a su entorno (sustrato, temperatura, humedad).

En relación al tiempo de latencia, se observó que ninguna de las cepas estudiadas modificó su período al variar la atmósfera del entorno, siempre que el primer tratamiento, aire o nitrógeno, fuera corto (hasta cuatro días). Contrariamente, las cepas de almacenamiento *Aspergillus* y *Penicillium* incubadas a 4°C en nitrógeno por 10 días y transferidas luego a aire, aumentaron su tiempo de latencia. En el caso de *Aspergillus flavus* Link, aumentó de 15 a 48 hs y para *Penicillium cyclopium* de 17 a 43 hs. La constante de velocidad de crecimiento de ambas cepas también se modificó, duplicándose y triplicándose para *Aspergillus flavus* Link y *Penicillium cyclopium* respectivamente.

Serafini y col. (1980) hallaron iguales resultados sólo que al hacer el tratamiento en nitrógeno a 32°C, debieron aguardar 60 días para observar una disminución del crecimiento fúngico. La flora de campo mantuvo el mismo período de latencia y la misma constante de velocidad de crecimiento que en aire a 20°C, ejerciendo así ningún efecto el tratamiento previo en nitrógeno a 4°C.

3. INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD ACUOSA SOBRE EL DESARROLLO FUNGICO

La actividad acuosa del medio es la determinante fundamental del calor producido por los microorganismos presentes. El valor mínimo hallado para crecimiento fúngico es 0,6 mientras que para bacterias se requieren valores superiores a 0,93. A mayor actividad acuosa del cereal, mayor es el crecimiento de los microorganismos contaminantes. De esta manera, la temperatura se eleva rápidamente ya que el grano es incapaz de liberar dicho calor más rápido de lo que lo produce. La actividad acuosa inicial, es la determinante de la temperatura máxima a alcanzar y las diferentes combinaciones de actividad acuosa y temperatura pico producen asociaciones características de diversos microorganismos (Lacey y col., 1980).

Otros factores también importantes que influyen sobre el desarrollo fúngico son el pH del medio y la composición de la atmósfera (Magan y col., 1984).

Teniendo en cuenta los conceptos anteriores, se estudió el comportamiento de las cepas aisladas de trigo en medios de cultivo con distinta actividad acuosa, incubados a 20°C en atmósfera de aire o nitrógeno. Teniendo en cuenta la relación entre humedad relativa de equilibrio y el contenido de humedad del grano (Gough y Bateman, 1977) los valores de actividad acuosa seleccionados fueron 0,999; 0,907; 0,835; 0,805 y 0,777. Para este rango de actividad acuosa, corresponden valores de contenido de humedad del grano desde 14,5% hasta valores superiores al 28%.

En las condiciones de la experiencia, ninguna de las cuatro cepas fue capaz de desarrollar en medios con actividad acuosa del 0,777; 0,805 y 0,835 incubados tanto en aire como en nitrógeno. Para los valores 0,999 y 0,907, las cuatro cepas desarrollaron al incubarse en aire a 20-28°C.

La Fig. 29 muestra la evolución de la constante de velocidad de crecimiento (K_m) para cada cepa en función de la actividad acuosa del medio. Es posible observar que *Aspergillus flavus* Link y *Penicillium cyclopium* desarrollan a mayor velocidad que *Fusarium graminearum* y *Alternaria* spp para actividad acuosa del 0,907. Esto está de acuerdo con el hecho de que los dos primeros son géneros que desarrollan durante el almacenamiento y requieren por lo tanto menor contenido de humedad.

En todos los casos, la disminución de la actividad acuosa del medio aumentó el período de latencia. Este comportamiento se mostró independiente de la temperatura ya que las placas de actividad acuosa 0,907 fueron incubadas a mayor temperatura que las de actividad acuosa 0,999 (28°C y 21°C respectivamente).

En base a los resultados descriptos en la sección 1 de este mismo capítulo, se estudió el comportamiento sólo de *Fusarium graminearum* en atmósfera de nitrógeno a 21°C, en medios con actividad acuosa del 0,925, 0,950, 0,975 y 0,999. Se obtuvo desarrollo para los valores 0,975 y 0,999 y el período de latencia aumentó de 42 a 47 hs cuando la actividad acuosa disminuyó de 0,999 a 0,975.

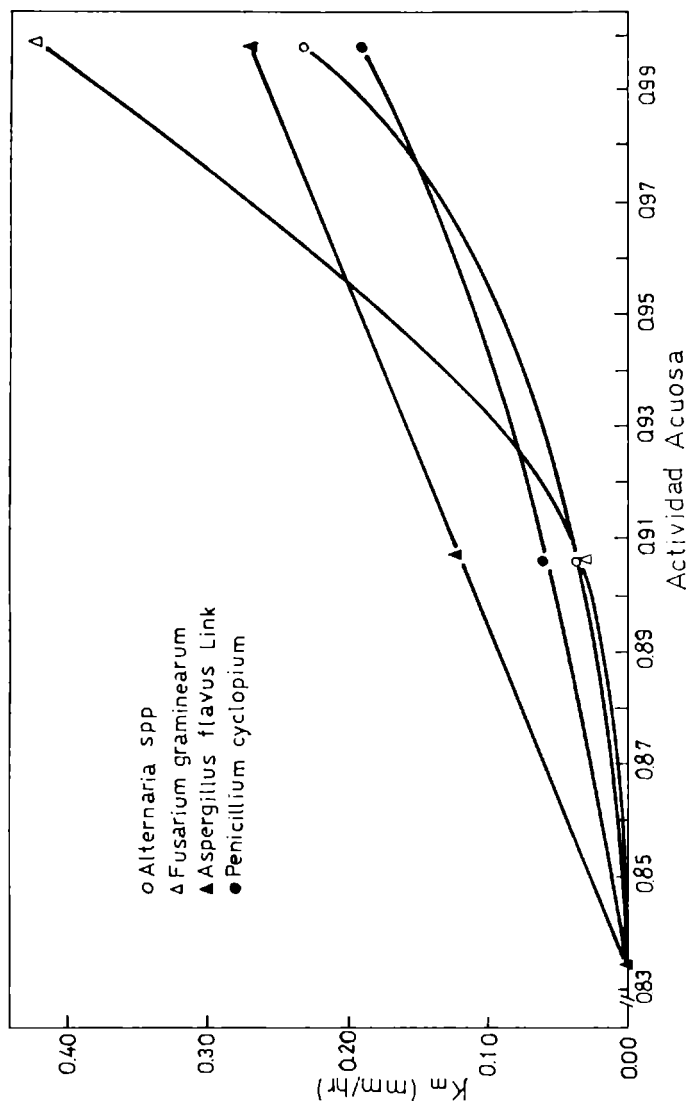


Figura 29: Variación de la constante K_m en función de la acuidad acuosa del medio. (o) Alternaria spp; (Δ) Fusarium graminearum; (▲) Aspergillus flavus Link; (●) Penicillium cyclopium.

CORRELACION DE RESULTADOS "IN VIVO" E "IN VITRO"

Luego de haber estudiado individualmente diferentes parámetros para evaluar la calidad de trigo almacenado bajo distintas condiciones, podemos ahora discutir en forma conjunta los resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados tanto in vivo como in vitro. De esta manera podremos finalmente seleccionar las mejores condiciones de acopio de trigo de acuerdo al contenido de humedad del mismo.

Si observamos la Figura 6 podemos destacar ciertos aspectos importantes en relación a la temperatura y atmósfera de acopio y a la interrelación de ambas variables. Cuando la temperatura del silo mantenido en aire o en nitrógeno pasó de 20 a 4°C, el tiempo necesario para alcanzar valores de germinabilidad semejantes en semillas de contenido de humedad hasta del 19%, se cuadruplicó. Esto significa que el descenso de temperatura protege de alguna manera la viabilidad del grano independientemente de la atmósfera reinante.

Veamos ahora los resultados obtenidos cuando el silo a 20°C modificó su atmósfera pasando de aire a nitrógeno. Aquí también la viabilidad se prolongó, verificándose tiempos cuatro veces mayores en nitrógeno que en aire. Cuando la temperatura del silo en aire fue de 4°C en vez de 20°C y la atmósfera se modificó a nitrógeno, el tiempo necesario para alcanzar valores semejantes de germinación sólo se duplicó. De estos resultados podemos concluir que cuando la temperatura del grano es elevada, el cambio de atmósfera de aire a nitrógeno ejerce un efecto protector sobre la capacidad germinativa cualquiera sea el contenido de humedad de la semilla. Si por el contrario,

el grano se enfría hasta 4°C, el efecto protector de la anaerobiosis en relación al aire disminuye a la mitad de lo observado a 20°C dado que las bajas temperaturas por sí logran inhibir aún en aire procesos conducentes a la pérdida de germinabilidad.

Los resultados antes expuestos se corroboraron al comparar el silo mantenido en nitrógeno a 4°C con aquel mantenido en aire a 4°C. En éste se verificó una disminución de viabilidad a la mitad del valor obtenido en nitrógeno para granos con contenido de humedad en el rango del 14 al 19%.

Nos resta discutir qué sucede cuando se modifican simultáneamente la atmósfera y la temperatura. Al comparar la capacidad germinativa de granos mantenidos en nitrógeno a 20°C con aquella de granos mantenidos en aire a 4°C pudimos observar que ésta se duplicó cuando el contenido de humedad fue hasta del 19%. La interpretación de estos resultados se basa en dos efectos que actúan en forma opuesta. En primer lugar y como dijimos anteriormente, al pasar de 20°C a 4°C la viabilidad aumenta cuatro veces, mientras que el cambio de atmósfera de nitrógeno a aire, disminuye la viabilidad al medio. La resultante entonces de modificar la temperatura y atmósfera del grano en el sentido en que lo hicimos, debería prolongar la viabilidad del grano al doble al pasar de nitrógeno a 20°C a aire a 4°C. Esto coincide con el resultado obtenido experimentalmente.

Si ahora consideramos las pruebas de germinación y contaminación hallaremos que a medida que el tiempo de almacenamiento aumenta, la caída de la capacidad germinativa y el aumento de granos contaminados son función del contenido de humedad

del cereal y de la temperatura y atmósfera del silo. Dentro del silo mantenido en aire a 20°C se encontró que cuando el contenido de humedad del grano era mayor al 16%, el género fúngico que desarrollaba abundantemente era *Penicillium*. Debemos tener presente que en el interior del silo coexisten diferentes géneros fúngicos los cuales compiten por los nutrientes. En trigo húmedo almacenado en aire a 20°C, *Penicillium* creció y logró inhibir al resto de las cepas acompañantes. Los ensayos in vitro realizados en medios con actividad acuosa superior al 0,835, mostraron desarrollo de todas las cepas aisladas al incubarse individualmente en placas mantenidas a 20°C con libre acceso de aire. En la Figura 29 se puede observar que para el rango de actividad acuosa del 0,835 al 0,907, equivalente a contenidos de humedad del grano del orden del 17 al 28% aproximadamente (ecuación (2)), la constante de velocidad de crecimiento de *Penicillium cyclopium* es mayor a la constante de *Alternaria* spp y de *Fusarium graminearum*. De esta manera la conducta de los contaminantes observada dentro del silo correlaciona bien con lo observado in vitro. Además, los resultados confirman el hecho de que por ser *Penicillium* un hongo de almacenamiento requiere menor contenido de agua libre para crecer. Cuando la actividad acuosa del medio in vitro fue cercana a 1 (Fig. 29) los hongos de campo, *Alternaria* spp y *Fusarium graminearum*, desarrollaron a mayor velocidad que *Penicillium cyclopium*.

Cuando la temperatura del silo disminuyó a 4°C, el género predominante en trigo húmedo también fue *penicillium*. En

este caso no se pudo corroborar este resultado con lo sucedido in vitro puesto que no se ensayó el desarrollo fúngico a 4°C en medios con diferente actividad acuosa. Podemos sí asumir que las causas por las cuales *Penicillium* logró crecer en el silo e inhibir a los otros contaminantes son semejantes a las explicadas para granos almacenados a 20°C.

Lo que debemos considerar además es que los ensayos in vitro se estudiaron a lo largo de 10 días, mientras que los ensayos y observaciones dentro del silo se extendieron hasta 6 meses. De esta manera, el tiempo debe incluirse como un factor importante en el desarrollo de las distintas cepas.

En los granos almacenados en nitrógeno a 20°C, el hongo mayoritario fue *Fusarium* para cualquier rango de humedad. In vitro, *Alternaria* y *Penicillium* no pudieron crecer en estas condiciones mientras que *Fusarium* y *Aspergillus* desarrollaron a velocidades cuatro y diez veces menores que lo registrado en aire a la misma temperatura. *Aspergillus* dentro del silo, contaminó menos del 10% de los granos de contenido de humedad del 19% al cabo de seis meses, y no se observó micelio a simple vista. La velocidad de desarrollo de *Fusarium* en el silo con nitrógeno no se pudo comparar con aquella en el silo mantenido en aire dado que como dijimos anteriormente, *Penicillium* inhibió el desarrollo de los otros contaminantes. Tanto in vivo, como in vitro, la cepa que resultó más tolerante a la anaerobiosis fue *Fusarium*. A su vez, la capacidad germinativa de granos almacenados en nitrógeno, no se afectó tanto por la falta de oxígeno como por el contenido de humedad de la semilla.

Para granos de contenido de humedad mayor o igual al 16%, la capacidad germinativa comienza a descender luego de los primeros diez días de almacenamiento a 20°C, siendo el descenso más notable para granos mantenidos en aire que para aquellos mantenidos en nitrógeno. En nitrógeno a 4°C no se registró in vitro crecimiento fúngico. Dentro del silo y bajo las mismas condiciones el nivel de contaminantes se mantuvo aproximadamente constante en el tiempo pero no hubo desarrollo observable a simple vista sobre granos almacenados durante seis meses aún con contenidos de humedad muy elevados (19%). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos in vitro. La capacidad germinativa en estos casos se mantuvo en niveles óptimos.

Los resultados hasta ahora analizados indican que el desarrollo fúngico sobre granos almacenados ejerce un efecto negativo sobre la germinación. Esta observación puede estudiarse mediante un tratamiento matemático que considere las distintas variables durante el almacenamiento.

Fraser y Muir (1981) utilizando datos del tiempo de almacenamiento requerido para que la germinación decaiga o para que aparezca contaminación fúngica visible, obtuvieron un modelo de deterioro de trigo por regresión múltiple. Ellos definieron el tiempo permitido para un almacenamiento sin riesgo de trigo con contenido de humedad del 12 al 19% como

$$\log \theta = 6,234 - 0,2118 M_w - 0,0527 T \quad (7)$$

y para trigo de contenido de humedad 19-24% como

$$\log \theta = 4,129 - 0,0997 M_w - 0,0567 T \quad (8)$$

donde θ : días de almacenamiento permitido

M_w : contenido de humedad (porcentaje en base húmeda)

T : temperatura del grano en °C

De todos los ensayos de almacenamiento realizados en el laboratorio, sólo registramos el tiempo en que la infección fúngica era visible a simple vista, para granos de contenido de humedad del 19%. De esta manera, el tiempo límite de almacenamiento en aire a 4°C y 20°C para trigo de contenido de humedad del 19% calculado en base a este modelo, sería de 100-102 días y 13-14 días respectivamente (el rango surge de utilizar las ecuaciones (7) y (8) en el cálculo ya que el contenido de humedad del 19% se halla comprometido en ambas).

Experimentalmente se observó que a 20°C los contaminantes aparecían a los once días de almacenamiento y a 4°C a los 123 días. El dato a 20°C correlacionaría bien con lo predicho por el modelo mientras que a 4°C la aparición de contaminación visible se demoró 20 días más de lo calculado.

En nitrógeno a 20°C, la observación macroscópica de micelio sobre granos de contenido de humedad del 19% se demoró cinco veces más que en aire, apreciándose granos contaminados a los 55 días de iniciado el almacenamiento.

En nitrógeno pero a 4°C, no se llegó a detectar desarrollo fúngico sobre los granos pero se pudo apreciar olor rancio a los 182 días de almacenamiento con un nivel de granos contaminados con *Fusarium* del orden del 33%.

Otro aspecto importante a tener en cuenta para que la semilla pueda germinar es que se mantenga la integridad y

funcionalidad del germen. El enmohecimiento de los granos en el silo se inicia, especialmente en el caso de *Penicillium* y *Aspergillus*, en el extremo del grano en el que se aloja el embrión, puesto que constituye un sustrato rico y posee una actividad acuosa adecuada para el desarrollo fúngico. Comparando los resultados obtenidos en el análisis proteico del germen y aquellos obtenidos en los ensayos de germinación y contaminación fue posible destacar lo siguiente: luego de almacenar trigo en nitrógeno por cuatro meses a 20 y a 4°C con contenidos de humedad del 22%, la capacidad germinativa descendió al 10% en el primer caso y al 78% en el segundo; se pudo además establecer por electroforesis en geles de poliacrilamida (Fig. 19) que una banda proteica ubicada en la zona de peso molecular 67.000 desaparecía luego del almacenamiento y aumentaba la concentración de especies proteicas ubicadas en la zona de peso molecular 20.100. Estos resultados implicarían la hidrólisis de proteínas de peso molecular elevado o la separación de cadenas de proteínas oligoméricas. La hidrólisis proteica puede atribuirse a la acción fúngica, ya que las muestras a 20°C presentaron alta contaminación con *Fusarium* (64%), mientras que a 4°C los contaminantes fueron *Alternaria* (36%) y *Fusarium* (20%).

Si describimos ahora lo sucedido en trigo almacenado en aire a 20°C con contenido de humedad del 19%, veremos que la capacidad germinativa descendió al 41% en 20 días con un 50% de granos infectados con *Penicillium*, mientras que para aquellos en iguales condiciones pero almacenados a 4°C, la capacidad germinativa cayó al 13% luego de seis meses de almacenamiento

presentando el 92% del lote contaminación con *Penicillium*. Los diagramas electroforéticos de la Figura 23c indican que el contenido proteico del germen de trigo almacenado a 20°C se alteró para los tiempos antes mencionados. La principal modificación registrada en el patrón fue la desaparición de proteínas de peso molecular elevado y la aparición de un continuo de bandas en la zona de peso molecular menor a 14.400. A 4°C se observó lo mismo pero para tiempos mucho mayores. Al describir en la sección 3.3.2. los aminoácidos liberados de germen de trigo colocado en medio glicerol 0,5 M, se destacó el hecho de que en las muestras almacenadas con alto contenido de humedad en aire a 4°C o a 20°C, el contenido de aminoácidos en el sobrenadante aumentaba o permanecía igual. Paralelamente se detectó aumento del nivel de contaminantes lo cual coincide con la proteólisis observada por las técnicas de electroforesis descriptas. La evaluación de los hidratos de carbono liberados en el mismo ensayo mostró también que para el caso de trigo húmedo almacenado tanto en aire como en nitrógeno, la cantidad de azúcares no reductores (rafinosa y sacarosa) disminuyeron en el tiempo. Esta disminución fue mayor a 20°C que a 4°C, y en aire más que en nitrógeno lo cual indica condiciones que favorecen el desarrollo de contaminantes. En este caso, la disminución de azúcares no reductores pudo deberse, al igual que la hidrólisis proteica, a hidrólisis fúngica. Debemos además sumar el consumo debido a hongos y aquel propio de la semilla que necesita energía para mantener su estado de latencia.

CONCLUSIONES

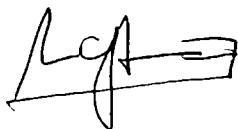
En función de todos los ensayos realizados y del análisis exhaustivo de los resultados obtenidos, estamos ahora en condiciones de estimar la tecnología más adecuada a utilizar para minimizar el daño de trigo durante la práctica del almacenamiento.

Las conclusiones a las que arribamos son:

- Cuando el cereal se recibe con contenido de humedad del orden del 14% o menor, las técnicas habituales de almacenamiento en aire a temperatura ambiente resultan adecuadas.
- Cuando el cereal se recibe con contenido de humedad mayor o igual al 16% y no se dispone de una secadora en forma inmediata, es factible evitar la contaminación disminuyendo la temperatura del grano hasta 4°C y realizar un almacenamiento en aire. De esta manera, la germinación podrá mantenerse elevada por un tiempo cercano a los 2 meses y el patrón proteico de germen no se alterará con seguridad durante el primer mes de acopio. Los niveles de contaminación permanecerán bajos también dentro de los primeros 30 días de almacenamiento.
- Si en vez de enfriar el trigo húmedo se dispone de la infraestructura necesaria para almacenar el grano en atmósfera de nitrógeno, la viabilidad aumentará cuatro veces en relación al almacenamiento en aire y el patrón proteico de germen se mantendrá por un tiempo prolongado (6 meses).

- La modificación de la atmósfera es entonces más importante cuando el grano se mantiene a 20°C que cuando está a 4°C ya que a 20°C el pasar de aire a nitrógeno implica un aumento de viabilidad de cuatro veces mientras que a 4°C sólo aumenta al doble de su valor en aire.
- Finalmente, la combinación de nitrógeno y frío es la condición que más favorece el mantenimiento de trigos especialmente con contenidos de humedad muy elevados, al menos por períodos cortos que suelen mediar hasta disponer de las maquinarias adecuadas para el secado artificial.

Cabe aclarar que el tratamiento en frío como en nitrógeno no son efectivos sólo durante el tiempo en que se los aplica. Si por cualquier causa éstos se interrumpen, el cereal evolucionará de acuerdo a las nuevas condiciones reinantes sin influir la historia previa del mismo.



MARIA CRISTINA ARON



B I B L I O G R A F I A

- Abramson, D.; Sinha, R.N. y Mills, J.T. (1980) Mycotoxin and odor formation in moist cereal grain during granary storage. *Cereal Chem.* 57: 346-351.
- Abramson, D.; Sinha, R.N. y Mills, J.T. (1982) Mycotoxin formation in moist wheat under controlled temperatures. *Mycopathologia* 79: 87-92.
- Anderson, J.D.; Baker, J.E. y Worthington, E.K. (1970) Ultrastructural changes of embryos in wheat infected with storage fungi. *Plant Physiology*, Washington 46: 857-859.
- AOAC (1980) Total Solids (Moisture, indirect method). Air oven method (3) Official final action. En "Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists", pag. 211.
- Bailey, J.E. (1982) Whole grain storage. En "Storage of cereal grains and their products". Cap. 3, pag. 53. Editor: C.M. Christensen. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota.
- Bakker-Arkema, F.W.; Brook, R.C. y Lerew, L.E. (1978) Cereal grain drying. En "Advances of cereal science and technology". Vol. II, pag. 5. Editor: Y. Pomeranz. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota.
- Bolsa de Cereales de Buenos Aires. Número Estadístico 1986. Cereales: productos y subproductos derivados. Cap. I, pag. 64.
- Bothast, R.J. (1978) Fungal deterioration and related phenomena in cereals, legumes and oilseeds. En: "Postharvest biology and biotechnology". Cap. 8, pag. 210. Editor: H.O. Hultin y M. Milner. Food & Nutrition Press, Inc., Westport, Connecticut.
- Bottomley, R.A.; Christensen, C.M. y Geddes, W.F. (1950) Grain

- storage studies IX. The influence of various temperatures, humidities and oxygen concentrations on mold growth and biochemical changes in stored yellow corn. *Cereal Chem.* 27: 271-296.
- Brancato, F.P. y Golding, N.S. (1953) The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. *Mycologia* 45: 848-863.
 - Bulla Jr., L.A.; Kramer, K.J. y Speirs, R.D. (1978) Insects and microorganisms in stored grain and their control. En: "Advances in cereal science and technology", Vol. II, pag. 102. Editor: Y. Pomeranz. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota.
 - Christensen, C.M. (1957) Deterioration of stored grains by fungi. *Botanical Review* 23: 108-134.
 - Christensen, C.M. y Sauer, D.B. (1982) Microflora. En: *Storage of cereal grains and their products*", pag. 219. Editor: C.M. Christensen. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota.
 - Daftary, R.D.; Pomeranz, Y. y Sauer, D.B. (1970) Changes in wheat flour damaged by mold during storage. *J. Agr. Food Chem.* 18(4): 613-616.
 - De Vay, J.E. (1952) A note on the effect of mold growth and increased moisture content on the free amino acids in hard red spring wheat. *Cereal Chem.* 29: 309-311.
 - Dubois, M.; Geddes, W.F. y Smith, F. (1960) The carbohydrates of the gramineae. *Cereal Chem.* 37: 557.
 - Elder, W.B. (1980) Grain refrigeration systems incorporating modular cooling units. *Trans. Aust. Refrig. Air Condit. and Heating* July, pag. 8.

- Foster, G.H. (1982) Drying cereal grains. En "Storage of cereal grains and their products". Editor: C.M. Christensen. pag. 112, American Association of Cereal Chemist, Inc., St. Paul, Minnesota.
- Fraser, B.M. y Muir, W.F. (1981) Airflow requirements predicted for drying grain with ambient and solar-heated air in Canada. Transactions of the ASAE 24: 208-210.
- Giner, S.A. y Calvelo, A. (1987) Modelling of wheat drying in fluidized beds. Journal of Food Science 52: (en prensa).
- Glass, R.H.; Ponte Jr, J.R.; Christensen, C.M. y Geddes, W.F. (1959) Grain storage studies XXVIII. The influence of temperature and moisture level on the behavior of wheat stored in air or nitrogen. Cereal Chem. 36: 341-350.
- González, H.H.L.; Pollio, M.L. y Resnik, S.L. (1986) Determinación de los sistemas de sorción de agua en variedades de trigo cosechadas en el país. En: "Libros del Primer Congreso Nacional de Trigo" Cap. III, pag. 1.
- Gough, M.C. y Bateman, G.A. (1977) Moisture humidity equilibria of tropical stored procedure. Trop. Stored Prod. Inf. 33: 25.
- Greenspan, L. (1977) Humidity fixed points of binary saturated solutions. J. of Research of the National Bureau of Standards. A. Physics and Chemistry. 81A: 89.
- Grewe, E. y Le Clerc, J.A. (1943) Commercial wheat germ, its composition. Cereal Chem. 20: 423.
- Hackel, E. (1890) The true grassia. Henry Holt: New York (traducido de Die Natürlichen Pflanzenfamilien. F. Lamson-Schribner y E.A. Southworth).

- Hall, D.W. (1971a) Zonas tropicales y subtropicales. En: "Manipulación y almacenamiento de granos alimenticios en las zonas tropicales y subtropicales", pag. 7. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO.
- Hall, D.W. (1971b) Factores que afectan el valor nutritivo y al deterioro de los cereales alimenticios. En: "Manipulación y almacenamiento de granos alimenticios en las zonas tropicales y subtropicales", pag. 47. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO.
- Hall, D.W. (1971c) Métodos de almacenamiento. En: "Manipulación y almacenamiento de granos alimenticios en las zonas tropicales y subtropicales", pag. 179. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO.
- Hall, D.W. (1971d) Pérdidas en los productos alimenticios almacenados. En: "Manipulación y almacenamiento de granos alimenticios en las zonas tropicales y subtropicales", pag. 15. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO.
- Harman, G.E. y Granett, A.L. (1972) Deterioration of stored pea seed: changes in germination, membrane permeability and ultrastructure resulting from infection by *Aspergillus ruber* and from aging. *Physiological Plant Pathology* 2: 271-278.
- Hazen, E.L. (1960) Contaminants. En: "Laboratory identification of pathogenic fungi simplified", pag. 115. Editor: Ch.C. Thomas. Springfield, Illinois, USA.
- Hinton, J.J.C.; Peers, F.G. y Shaw, B. (1953) The B-vitamins in wheat: the unique aleurone layer. *Nature*, London 172: 993.

- Hummel, B.C.W.; Cuendet, L.S.; Christensen, C.M. y Goddes, W. F. (1954) Grain storage studies. XIII. Comparative changes in respiration, viability and chemical composition of mold-free and mold-contaminated wheat upon storage. Cereal Chem. 31: 143-150.
- Hunter, A.J. y Taylor, P.A. (1980) Refrigerated aeration for the preservation of bulk grain. J. Stored Prod. Res. 16: 123-131.
- Hyde, M.B.; Baker, A.A.; Ross, A.C. y López, C.O. (1974) Los silos subterráneos herméticos de la Argentina. En: "El almacenamiento hermético de los cereales", Cap. V, pag. 57. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO.
- Hyde, M.B. y Burrell, N.J. (1982) Controlled atmosphere storage. En: "Storage of cereal grains and their products", Cap. 13, pag. 443. Editor: C.M. Christensen. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota.
- Kasarda, D.D.; Bernardin, J.E. y Nimmo, Ch.C. (1976) Wheat proteins. En: "Advances in cereal science and technology" Cap. 4, pag. 158. Editor: Y. Pomeranz. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota.
- Kent, N.L. (1984a) Cereals of the world: grain structure. En: "Technology of cereals", pag. 16, Tercera edición, Pergamon Press.
- Kent, N.L. (1984b) Chemical composition of cereals. En: "Technology of cereals", pag. 27, Tercera edición, Pergamon Press.

- Kent, N.L. (1984c) Wheats of the world. En: "Technology of cereals", pag. 49, Tercera edición, Pergamon Press.
- Lacey, J.; Hill, S.T. y Edwards, M.A. (1980) Microorganisms in stored grains: their enumeration and significance. Tropical Stored Prod. Inf. 39: 19.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680.
- Laemmli, U.K. y Favre, M. (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. J. Mol. Biol. 80: 575.
- Linko, P. y Milner, M. (1959) Free amino and keto acids of wheat grains and embryos in relation to water content and germination. Cereal Chem. 36: 280-294.
- Lombardi, M.; Quaglia, G.; Catani, P.; Cavaioli, R. y Caproni, E. (1980) Changes in the rheological characteristics and baking quality of wheat at different moisture contents stored under nitrogen. En: "Controlled atmosphere storage of grains", pag. 335. Editor: J. Shejbal. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- Lombardi, M.; Quaglia, G.B. y Shejbal, J. (1976) Effetto della conservazione di frumento tenero in azoto sulle caratteristiche tecnologiche. Tecnica Molitoria 27: 97-103.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.L. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265.
- Lupano, C.E. (1986) Deterioro bioquímico durante el secado de trigo. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.

- Lupano, C.E. y Añón, M.C. (1986) Denaturation of wheat germ proteins during drying. *Cereal Chem.* 63: 259.
- Mac Masters, M.M.; Hinton, J.J. y Bradbury, D. (1978) Microscopic structure and composition of the wheat kernel. En: "Wheat. Chemistry and technology", pag. 51. Editor: Y. Pomeranz. American Association of Cereal Chemists, Inc., St. Paul, Minnesota.
- Magan, N.; Cayley, G.R. y Lacey, J. (1984) Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in culture and on wheat grain. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(5): 1113-1117.
- Maggon, K.K.; Gupta, S.K. y Venkatasubramanian, T.A. (1977) Biosynthesis of Aflatoxins. *Bacteriological Reviews* 41: 822-855.
- Milner, M. y Geddes, W.F. (1945) Grain storage studies. II. The effect of aeration, temperature, and time on the respiration of soybeans containing excessive moisture. *Cereal Chem.* 22: 484-501.
- Milner, M.; Christensen, C.M. y Geddes, W.F. (1947) Grain storage studies. VI. Wheat respiration in relation to moisture content, mold growth, chemical deterioration and heating. *Cereal Chem.* 24: 182-199.
- Miró, D. (1986) Las limitantes de infraestructura. *Bolsa de Cereales de Buenos Aires. Número Estadístico 1986*, pag. 6.
- Multon, J.A. (1982a) Interactions entre l'eau et les constituants des grains et graines et produits dérivés. En: "Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés".

- Vol. 1, pag. 115. Editor: J.L. Multon. Technique et Documentation (Lavoisier). Paris Cedex.
- Multon, J.L. (1982b) Les mécanismes d'alteration des grains et graines dans l'éco-système post-récolt, les pertes qui en résultent et les stratégies de défense des stocks. En "Conservation et stockage des grains et graines et produit dérivés", Vol. 1, pag. 1. Editor: J.L. Multon. Technique et Documentation (Lavoisier). Paris Cedex.
 - Northolt, M.D. (1979) The effect of water activity and temperature in the production of some micotoxins. Proefschrift ter verkrijging van de graad van doctor in de landbouwwetenschappen. 7 December 1979. Landbouwhogeschool te Wageningen.
 - Osborne, T.B. (1907) The proteins of the wheat kernel. Carnegie Inst. Wash., Publ. N° 84.
 - Peterson, A.; Schlegel, V.; Hummel, B.; Cuendet, L.S.; Goddes, W.F. y Christensen, C.M. (1956) Grain storage Studies. XXII. Influence of oxygen and carbon dioxide concentrations on mold growth and grain deterioration. Cereal Chem. 33: 53.
 - Pirt, S.J. (1967) A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi. J. Gen. Microbiol. 17(2): 181-197.
 - Pomeranz, Y. (1982) Biochemical, functional and nutritive changes during storage. En: "Storage of cereal grains and their products" Cap. 6, pag. 145. Editor: C.M. Christensen. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota.

- Pomeranz, Y.; Carvajal, M.J.; Hosoney, R.C. y Ward, A.B. (1970) Wheat germ in breadmaking I. Composition of germ lipids and germ protein fractions. *Cereal Chem.* 47: 373.
- Proskuryakov, N.I. y Radionova, I.V. (1960) Enzymatic activity of the water soluble proteins of the wheat germ. *Biokhim. Zerna, Sbornik* 5: 108 (Chem. Abstr. 54: 22866i; 1960).
- Quaglia, G.; Cavaioli, R.; Catani, P.; Shejbal, J. y Lombardi, M. (1980) Preservation of chemical parameters in cereal grains stored in nitrogen. En: "Controlled atmosphere storage of grains", pag. 319. Editor: J. Shejbal. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- Sankaran, R. y Mohan, M.S. (1984) Selection of suitable media for enumeration of fungi from cereal products. *151 Bulletin*, Vol 36(7): 248-253.
- Serafini, M.; Fabbri, A.A.; Shejbal, J.; Fanelli, C.; Di Maggio, D. y Rambelli, A. (1980) Influence of nitrogen on the growth of some storage fungi on moist wheat. En: "Controlled atmosphere storage of grains", pag. 157. Editor: J. Shejbal. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam.
- Shejbal, J. (1978) Preservation of cereal grains and oil seeds in nitrogen. *Med. Fac. Landbouww Rijksuniv. Gent* 43/2: 493.
- Shejbal, J. (1979) Storage of cereal grains in nitrogen Atmosphere. *Cereal Foods World*. Vol. 24(5): 192.
- Shejbal, J. y Di Maggio, D. (1976) Preservation of wheat and barley in nitrogen. *Med. Fac. Landbouww Rijksuniv. Gent*, 41/2, 595.

- Shejbal, J.; Di Maggio, D.; Guaglia, G.B.; Rambelli, A. y Snamprogetti, S.p.A. (1974) Effects of nitrogen atmosphere on the quality of stored grains and the development of moulds. Comptes Rendus des Quatrième Journées de Phytologie et de Phytopharmacie Circum-Méditerranéennes, Montpellier 1974, pag. 265.
- Shejbal, J.; Tonolo, A. y Careri, G. (1973) Conservation of cereals under N₂. Mededel. Fak. Landbouww, Gent. 38: 1133.
- Shellenberger, J.A. (1978) Production and utilization of wheat. En: "Wheat, chemistry and technology". Pag. 2. Editor: Y. Pomeranz. American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota.
- Shurpalekar, S.R. y Haridas Rao, P. (1977) Wheat germ. En: "Advances in food research" pag. 188. Editor: C.O. Chichester, E.M. Mrak y G.F. Stewart. Academic Press, EEUU.
- Simmonds, D.H. (1978) Structure, composition and biochemistry of cereal grains. En: "Cereals'78: Better nutrition for the world's millions", pag. 106. Editor: Y. Pomeranz. USA, American Association of Cereal Chemists. Canada, Canadian International Grains Institute, International Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota.
- Sinha, R.N. (1958) Heating and deterioration of bulk grain stored in farms of Manitoba. Proc. Ent. Soc. Manitoba 14: 52-59.
- Sinha, R.N. y Wallace, H.A.H. (1965) Ecology of a fungus-induced hot spot in stored grain. Can. J. Plant Sci. 45: 48.

- Spencer, H.M. (1926) Laboratory methods for maintaining constant humidity. En: "International Critical Tables", Vol. I, pag. 67.
- Steponkus, P.L. (1981) Responses to extreme temperatures. Cellular and subcellular bases. En: "Encyclopedia of plant physiology", New Series, Vol. 12A "Physiological Plant Ecology I. Responses to the physical environment", pag. 371. Editores: O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond y H. Ziegler. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
- Thorpe, G.R. y Elder, W.B. (1980) The use of mechanical refrigeration to improve the storage of pesticide treated grain. Int. J. of Refrigeration 3(2): 99.
- Umbreit, W.W.; R.H. Burris y J.F. Stauffer (1959) The Warburg constant volume respirometer. En "Manometric techniques" Pag. 1. Editores: W.W. Umbreit, R.H. Burris y J.F. Stauffer. Burgess Publishing Co., Minneapolis, USA.
- Wallace, H.A.H. y Sinha, R.N. (1962) Fungi associated with hot spots in farm stored grain. Can. J. of Plant Sci. 42: 130-141.
- Williams, J.O.; Adesuyi, S.A. y Shejbal, J. (1980) Susceptibility of the life stages of *Sitophilus zeamais* and *Trogoderma granarium* larvae to nitrogen atmosphere in minisilos. En: "Controlled atmosphere storage of grains", pag. 93. Editor: J. Shejbal. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam.

FE DE ERRATAS

Pag. 6: Aclaración punto 4.1. (renglones 22 al 25)

Las regiones citadas son anteriores a la Ley de Granos de 1935. A partir de entonces, las zonas comerciales vigentes son Rosario, Santa Fe, Buenos Aires, Bahía Blanca y Entre Ríos.

Pag. 7: Renglón 9: Dice 3.684.200; debiera decir: 5.684.200

Renglón 20: Dice 82-83; debiera decir: 83

Pag. 25: Tabla II : Dice NO_3NH_4 4°C 7%

Debiera decir NO_3NH_4 4°C -

Pag. 30: Renglón 5. Se debe agregar al texto:

"Los valores iniciales de germinación obtenidos fueron:

Cosecha 82-83: 96%

Cosecha 83-84: 98%

Cosecha 85-86: 89%"

Pag. 69: Figura 16: Falta aclarar símbolos:

● 14%; △ 16%; ○ 19%; ▲ 22%

Pag. 89: Figura 22: Dice 20°C, debiera decir 4°C

Pag. 90: Figura 23: Dice 4°C, debiera decir 20°C

Pag. 126: Renglón 15: Dice 28%, debiera decir 22%