



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**DETERMINACIÓN DE HONGOS EN GRANO DE  
CEBADA MALTERA (*HORDEUM VULGARE* L.)  
Y PRESENCIA NATURAL DE MICOTOXINAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO AGRÍCOLA**

**PRESENTA:**

***MAYOLO MUÑOZ MARTÍNEZ***

**ASESOR: M. en C. MARÍA CRISTINA JULIA PÉREZ REYES**

**CO-ASEROR: M. en C. JOSEFINA MORENO LARA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIAS

### A mis padres

Sr. Mayolo Muñoz Pérez y Sra. Juana Martínez Martínez, por su amor, tiempo, comprensión, paciencia, por sus consejos, por sus llamadas de atención por su calidad única, para mí, como personas, por su apoyo y por su ejemplo de vida.

### A mis hermanos

Rodolfo, Juvenal y Rubén, de quienes sigo aprendiendo y me han apoyado en mi formación académica y personal.

### A mis sobrinos

Gabriel y Montserrat Muñoz Vázquez, Rodolfo y Oscar Muñoz Arellano, con mucho cariño y el deseo de que puedan ir realizando cada uno de los buenos deseos de sus padres.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad única, de darme formación académica y personal.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que a través de la carrera de Ingeniería Agrícola he alcanzado una de las principales metas que en mi vida me propuse.

A la Maestra en Ciencias María Cristina Julia Pérez Reyes, por su tiempo, sus conocimientos y la oportunidad de trabajar en este proyecto.

A la Maestra en Ciencias Josefina Moreno Lara, por su apoyo y consejos durante el desarrollo práctico y teórico de este trabajo.

A la Maestra en Ciencias Gabriela Sánchez Hernández, por su apoyo en la parte referente a las pruebas de calidad biológica del grano de cebada y por sus comentarios que mejoraron la estructura del trabajo.

Al Doctor Ernesto Moreno Martínez, por las facilidades brindadas para desarrollar este trabajo en las instalaciones de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas.

A la Doctora Genoveva García Aguirre y a la C. a Doctora Rebeca Martínez Flores, por las facilidades y apoyo otorgados en las instalaciones del laboratorio de micotoxinas del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Honorable Jurado, que ha tenido a bien dedicar tiempo y atención para corregir y aportar ideas que resultaron muy útiles en la finalización de este trabajo.

A la compañía Impulsora Agrícola, quien a través de el Ingeniero Francisco Dávila Betancourt, facilitaron las muestras con que se realizó este proyecto.

A Laura Ancheita Trujillo, por su amistad y apoyo en lo referente a las cuestiones administrativas para llevar este trabajo a buen termino.

A los compañeros de la generación XXIII de Ingeniería Agrícola por la oportunidad de aprender de ellos y junto con ellos, nombrar a solo algunos por cuestiones de espacio seria injusto, a todos ustedes les agradezco su amistad.

A Genaro López Estrada, quien me ha brindado no solo su amistad, sino la oportunidad de ir aprendiendo en campo lo que por cuestiones de tiempo y espacio no fue posible lograr en las aulas.

A todas las personas que he conocido en diversos estados de la Republica, que en mi etapa como estudiante, y, en mí hasta ahora breve etapa profesional, me brindaron su confianza y amistad pero sobre todo un lugar en su hogar y en su mesa, les estoy agradecido.

**DIOS, GRACIAS POR TODO**

<b>CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
Índice del contenido	i
Índice de cuadros	iv
Índice de figuras	v
RESUMEN	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GENERAL	3
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	3
III. HIPÓTESIS	3
IV. ANTECEDENTES	4
4.1. Características del cultivo de cebada	4
4.2. Morfología	5
4.3. Producción nacional e internacional	6
4.4. Importancia económica y social	6
4.5. Utilización	7
4.6. Malteado	10
4.7. Pruebas de calidad biológica en grano de cebada maltera ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)	11
4.7.1. Prueba de contenido de humedad	11
4.7.2. Prueba de vigor	11
4.7.3. Prueba de germinación	12
4.7.4. Prueba de peso seco	12
4.8. Principales hongos que invaden el cultivo de cebada	13
4.9. Micotoxinas producidas por hongos que invaden a la cebada durante su desarrollo en campo y su almacenamiento	17
4.10. Métodos de control	25
4.10.1 Procedimientos físicos	27
4.10.2 Procedimientos químicos	28

4.10.3	Procedimientos bioquímicos	30
4.10.4	Procedimientos biológicos	30
4.10.5	Gushing de la cerveza	31
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1.	Procedencia del grano de cebada maltera	33
5.2.	Análisis del contenido de humedad	34
5.3.	Análisis de la prueba de vigor	34
5.4.	Análisis de germinación estándar	35
5.5.	Análisis de la prueba de peso seco	36
5.6.	Determinación de micobiota	36
5.7.	Determinación de micotoxinas	37
5.7.1.	Método múltiple para la extracción de Zearalenona, Aflatoxinas y Ocratoxinas, Eppley, (1968)	38
5.7.2.	Determinación de Alternarios	42
5.7.3.	Método de cromatografía de inmunoafinidad de anticuerpos monoclonales	44
5.7.3.1	Determinación de aflatoxinas totales	44
5.7.3.3	Determinación de deoxinivalenol	45
VI.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
7.1.	Análisis de la prueba de contenido de humedad	47
7.2.	Análisis de la prueba de vigor	49
7.3.	Análisis de la prueba de germinación	51
7.4.	Análisis de la prueba de peso seco	53
7.5.	Determinación de micobiota en medio de cultivo PDA y MSA	55
7.5.1.	Determinación de micobiota en medio de cultivo PDA	55
7.5.2.	Determinación de micobiota en medio de cultivo MSA	56
7.5.3.	Caracterización de los géneros de hongos aislados de cebada maltera	59
7.6	Determinación de especies del género <i>Fusarium</i>	70

7.6.1	Determinación de especies del género <i>Fusarium</i> aisladas del medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA)	70
7.6.2.	Determinación de especies del género <i>Fusarium</i> aisladas del medio de cultivo malta sal agar (MSA)	71
7.6.3.	Determinación del género <i>Alternaria</i> en grano de cebada maltera	79
7.7.	Determinación de micotoxinas en grano de cebada maltera	81
VIII.	CONCLUSIONES	84
IX.	RECOMENDACIONES	86
X.	BIBLIOGRAFÍA CITADA	88

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Pág.
Cuadro 1.	Hongos patógenos del cultivo de cebada	14
Cuadro 2.	Micotoxinas reportadas en grano de cebada	19
Cuadro 3.	Concentración de hidrofobinas para causar el efecto de gushing en la cerveza	32
Cuadro 4.	Características de procedencia del grano de cebada	33
Cuadro 5.	Tiempo de almacenamiento del grano de cebada en relación con su contenido de humedad y la temperatura de almacén	52
Cuadro 6.	Micobiota presente en granos de cebada maltera en medio de cultivo PDA	56
Cuadro 7.	Micobiota presente en granos de cebada maltera en medio de cultivo MSA	57
Cuadro 8.	Características de los géneros de hongos aislados de granos de cebada maltera ( <i>Hordeum vulgare</i> L.)	60
Cuadro 9.	Especies de <i>Fusarium</i> presentes en granos de cebada maltera en medio de cultivo PDA	70
Cuadro 10.	Especies de <i>Fusarium</i> presentes en granos de cebada maltera en medio de cultivo MSA	73
Cuadro 11.	Características de la macromorfología y micromorfología de las especies de <i>Fusarium</i> identificadas en cebada maltera	74
Cuadro 12.	Macromorfología y micromorfología de <i>Alternaria</i>	79
Cuadro 13.	Análisis del contenido de micotoxinas en grano de cebada maltera	83

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Determinación del contenido de humedad en grano de cebada maltera	48
Figura 2.	Determinación del vigor expresado en longitud media de plúmula	50
Figura 3.	Determinación de la germinación del grano de cebada	51
Figura 4.	Determinación del peso seco de grano de cebada maltera	54

## RESUMEN

En este trabajo se evaluaron dos variedades de grano de cebada maltera correspondientes a tres ciclos agrícolas diferentes con la finalidad de determinar la calidad biológica del grano con respecto a la presencia de hongos y micotoxinas, esto debido a la importancia que este cultivo tiene en la industria cervecera.

Los resultados obtenidos en las pruebas de calidad biológica, indican que las muestras analizadas cumplen con los estándares establecidos en la Norma Mexicana, NMX-FF-043-SCFI-2003.

Con respecto a la presencia de micobiota en grano de cebada, se encontró que el género *Alternaria* fue el que predominó en cuanto al número de aislamientos realizados, especialmente en grano procedente de los ciclos agrícolas 2003 y 2003/2004; siguiéndole en orden de importancia los géneros *Epicoccum*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, causantes de diversas enfermedades en campo y almacén.

En cuanto a la presencia natural de micotoxinas, se determinó el deoxinivalenol (DON) en todas las muestras analizadas en concentraciones por arriba de los límites permitidos para el consumo humano ( $1,700 - 56,900 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Sin embargo, en las muestras correspondientes al ciclo agrícola 2002/2003, no hubo presencia del género *Fusarium*, implicado en la síntesis de esta toxina.

Para el caso de las aflatoxinas, únicamente se encontraron en concentraciones de  $1 - 4 \mu\text{g kg}^{-1}$  en tres muestras analizadas, mientras que las micotoxinas ocratoxina A, zearalenona, alternariol, monometil-éter de alternariol y ácido tenuazóico no se encontró presencia de éstas.

La presencia de hongos puede reducir el rendimiento y la calidad del grano, así mismo, algunos de estos hongos son capaces de sintetizar toxinas como las aflatoxinas y el deoxinivalenol (DON), lo cual es un factor de riesgo para la salud humana y animal.

## I. INTRODUCCIÓN

Los hongos aparecen frecuentemente como contaminantes en productos alimenticios, constituyendo quizá el agente de deterioro más común de todo tipo de alimentos. Así mismo, son capaces de crecer en una gran variedad de cultivos, invadiendo raíz, tallo, hojas, flores y frutos, ocasionando pérdidas económicas e incluso la producción de micotoxinas (Betina, 1984).

Sin embargo, la presencia de hongos en los alimentos y productos agrícolas no indica necesariamente una contaminación con micotoxinas, pero sí es un factor de riesgo importante para que éstas se produzcan. De igual forma la ausencia aparente de crecimiento fúngico no garantiza la ausencia de las toxinas (Northolt y Van Egmond, 1982).

Los productos agrícolas más susceptibles a la contaminación por hongos productores de micotoxinas son los cereales, como la cebada que es un cereal de grano pequeño, empleado principalmente como materia prima en la elaboración de cerveza y forraje. Durante su desarrollo en campo, hasta su conversión en malta o bien hasta su consumo como alimento para humanos y animales, los granos de cebada se encuentran expuestos a la contaminación por una gran diversidad de microorganismos, que les causan deterioro reduciendo su calidad. El grado de contaminación depende de las condiciones climáticas a nivel de campo y de las condiciones de almacenamiento y procesamiento postcosecha (Ocampo *et al*, 2005).

La contaminación de la cebada por hongos, además de causar la pérdida de la calidad del producto, conlleva a importantes pérdidas económicas y a un riesgo sanitario para los consumidores ya sean humanos o animales, debido al potencial de algunas especies de

hongos para producir micotoxinas como las aflatoxinas, las cuales son consideradas como un carcinógeno humano involucrado en el cáncer hepático primario. O bien los tricotecenos asociados a desórdenes digestivos, hemorragias, afecciones de la médula ósea y neuropatías (Carrillo, 2003).

El cultivo de la cebada (*Hordeum vulgare* L.), por la particularidad que tiene de ser destinado a diversos usos y de ser una opción para regiones con limitaciones para el desarrollo de cultivos como hortalizas o frutales, es considerado dentro de los principales cultivos en México y en varios países del mundo.

Por tales características se han realizado gran variedad de trabajos con la finalidad de dar a conocer los elementos que intervienen y/o conjuntan el aspecto fitosanitario de este cultivo.

Particularmente en este trabajo se analizaron algunos parámetros utilizados para determinar la calidad biológica del grano de cebada tales como: el porcentaje de germinación, el vigor, el contenido de humedad y el peso seco, pero además se analizó la presencia de micobiota asociada al cultivo y la posibilidad de que ésta fuera generadora de metabolitos secundarios de carácter tóxico para el hombre y los animales, llamados micotoxinas. Lo anterior se realizó con dos variedades comercialmente utilizadas para la obtención de malta, la cual es destinada a la elaboración de cerveza: la variedad Esperanza, que es sembrada en áreas de riego y la variedad Esmeralda, que es sembrada en áreas de temporal.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la presencia de hongos asociados en granos de cebada maltera y determinar micotoxinas en dichos granos utilizados en la industria cervecera de México.

### **2.2. OBJETIVOS PARTICULARES**

2.2.1. Determinar la calidad física y biológica del grano de cebada maltera

2.2.2. Conocer la micobiota presente en muestras de grano de cebada maltera procedente de Valles Altos y del Bajío.

2.2.3. Identificar a nivel de género y / o especie los hongos aislados en las muestras analizadas.

2.2.4. Determinar la presencia y concentración de micotoxinas.

## **III. HIPÓTESIS**

El grano de cebada procedente de la zona de Valles Altos en México presentará una mayor presencia de hongos y micotoxinas en comparación con el grano del Bajío, por encontrarse más expuesto a efectos severos de factores del medio ambiente y de manejo antes y después de la cosecha.

## IV. ANTECEDENTES

### 4.1. Características del cultivo de cebada

La cebada es un cultivo de estación corta y de maduración temprana, tolerante a una amplia gama de condiciones adversas, incluyendo el frío, la sequía y los suelos salinos. Prospera en un rango ambiental mucho más amplio que cualquier otro cereal, en climas desde subárticos hasta subtropicales. Dada la amplia distribución geográfica de la cebada y su adaptabilidad única, existen miles de formas de este grano. La cebada cultivada pertenece a la especie *Hordeum vulgare* L., a la tribu triticeae de la familia de las gramíneas. Se considera que *H. vulgare* consta de tres subespecies: *Hordeum vulgare hexastichum* cebada de seis hileras, *Hordeum vulgare distichum* cebada de dos hileras y *Hordeum vulgare irregulare* cebada irregular. Estas subespecies se distinguen por el número de espiguillas que producen granos en cada uno de los nudos de la espiga; en los tipos de dos hileras sólo una de las tres espiguillas es fecundada, en tanto que en las variedades de seis hileras las tres espiguillas producen granos (Stubbs *et al.*, 1986). Además, la cebada a menudo se caracteriza por el tipo maltero o por el tipo forrajero, refiriéndose a la intención de su uso. Se le describe como cubierta o desnuda, dependiendo de la presencia o no de cobertura externa en los granos. Finalmente, existen cientos de variedades distintivas de cebada, combinando diversas características físicas y agronómicas, cada una con un nombre particular.

Es una gramínea anual adaptada a un amplio rango de condiciones ambientales en las zonas templadas y frías. La temperatura adecuada para su desarrollo varía entre los 15 °C y 31 °C. Requiere poca humedad, entre los 400 y los 1300 mm de precipitación.

## **4.2. Morfología**

La raíz principal penetra hasta una profundidad de 12 a 15 cm, desarrollando raíces secundarias.

El tallo es erecto y cilíndrico, tiene de cinco a ocho nudos y entrenudos, su crecimiento se realiza en la base de cada entrenudo, siendo en el último de éstos en donde se localiza la espiga. Además de un tallo principal, desarrolla tallos secundarios, o vástagos, la capacidad de la planta para producir vástagos en respuesta a las condiciones ambientales es una de las razones por las cuales la cebada es tan adaptable.

La hoja es lanceolada, con una longitud de 22 a 30 cm y un ancho de 1.0 a 1.5 cm. Las hojas emergen en cada nudo en posición opuesta una a otra. La parte inferior de cada hoja forma una estructura tubular llamada vaina, la cual rodea y cubre por completo al tallo, ocultándolo.

La flor es perfecta ya que contiene ambos órganos reproductores en la misma estructura, con lo cual se asegura la autopolinización ya que ambos se encuentran encerrados y protegidos.

La espiga es cilíndrica, está conformada por espiguillas, cada una integrada por el grano y dos glumas con barba de longitud variable, las cuales son alternas y están adheridas en forma de zigzag al eje llamado raquis.

El grano está compuesto por la cascarilla, la raquilla y el fruto. El fruto lo conforma el pericarpio y la semilla, la cual está formada por una capa de aleurona y por el embrión. Los granos a menudo terminan en apéndices semejantes a cerdas denominadas aristas.

### **4.3. Producción nacional e internacional**

En México la cebada maltera (*Hordeum vulgare* L.), es sembrada en aproximadamente 370,000 hectáreas, agrupadas en tierras de temporal y tierras de riego, con una producción aproximada de 770,000 toneladas (SAGARPA, 2004). La principal área productora de cebada maltera se encuentra ubicada en el Altiplano Central, la cual abarca la región conocida como Valles Altos (2000 a 2850 msnm), y que corresponde a las planicies de Pachuca, Tizayuca y Tulancingo en el estado de Hidalgo, las planicies de Otumba en el Estado de México, los llanos de Apan en el Estado de Hidalgo, los Valles de Tepeyahualco y Apizaco en el Estado de Tlaxcala, además de la llanura Oriental y Cuyoaco en el Estado de Puebla (Muñoz-Rodríguez, 2001). Le sigue en orden de importancia el Bajío, (región que abarca la parte suroeste de Guanajuato y partes limitadas de Jalisco, Michoacán y Querétaro), Sonora y Baja California, destacando por su volumen de producción el Estado de Guanajuato; de manera general los rendimientos en estos lugares oscilan entre las 2.1 y las 4.0 toneladas por hectárea (SAGARPA, 2004).

Actualmente la cebada es el cuarto cereal de importancia en el mundo, después del trigo, el arroz y el maíz (Gutiérrez-García, 2000; López *et al.*, 2005). Los principales países productores de cebada son Australia, la Unión Europea, Canadá, Estados Unidos, la ex Unión Soviética, Kazajstán y Turquía (ASERCA, 1995).

### **4.4. Importancia económica y social**

La cebada es considerada como un producto estratégico y materia prima indispensable para la elaboración de cerveza. En la cadena agroalimentaria de la cebada maltera participan alrededor de 55,000 productores de cebada, dos grupos fabricantes de cerveza: Grupo Modelo que abarca alrededor del 56.4 % del mercado y FEMSA quien abarca el 43.6 % del mercado consumidor de cerveza en México.

La industria cuenta a la fecha con 17 plantas productoras de malta y cerveza en 11 estados del país. México está ubicado actualmente como el séptimo productor de cerveza a nivel mundial.

La tasa de crecimiento promedio que la industria cervecera mostró en el periodo comprendido entre 1991 a 2003 fue del 12% anual. Este sector aportó en el año 2004 el 1.6 % del Producto Interno Bruto Nacional y el 3.8% de la recaudación fiscal total en México. La cadena productiva de esta industria genera unos 88,000 empleos directos y unos 800,000 empleos indirectos. Siendo el consumo per cápita anual de alrededor de 50 litros (SAGARPA, 2005; INEGI, 2005).

### **Utilización**

La versatilidad de la cebada la convierte en un grano apropiado para una gran variedad de usos, entre los principales destacan el forraje para ganado, el malteado y la alimentación humana. Se estima que dos terceras partes de la producción mundial de cebada se utiliza como forraje y grano en la alimentación de ganado vacuno, porcino y aviar y la tercera parte restante es utilizada para consumo humano principalmente en la elaboración de malta (USDA, 2004). La cebada es una alternativa nutrimental, además de ser un cultivo que ahorra costos con respecto del maíz y otros granos, para alimentar a diversos animales, incluidos el ganado vacuno lechero y cárnico, porcino, ovino y avícola. Si bien, es comparable al maíz como fuente de energía, la cebada es significativamente más alta en proteínas, aminoácidos y fibras útiles. Los niveles proteicos de la cebada generalmente varían entre 13.5 y 14.5 %, comparados con una variación de 9.3 a 9.8 % para el maíz.

Antes de alimentar al ganado con cebada, generalmente se muele el grano para mejorar su digestibilidad. Puede ser enrollada, machacada, suavizada, hecha copos o convertida en gránulos. Los subproductos de la cebada derivados de los procesos de malteado y destilación también pueden ser usados para incrementar las raciones de forraje.

En su forma malteada, la cebada es crucial para determinar la composición, sabor y carácter de la cerveza. La cebada maltera es también un ingrediente clave en la elaboración del whisky y otras bebidas destiladas, así como en numerosos productos alimenticios. Dado que diferentes variedades de cebada reaccionan de manera distinta en el proceso de malteado, las compañías malteras, tienen criterios estrictos para el grano que usan. Por ende, los agricultores y administradores de granos toman extremas precauciones para la producción, el envío, el almacenaje y la comercialización de la cebada con el fin de mantener su calidad y preservar la integridad de las variedades que están destinadas al malteado. Las variedades de cebada maltera que no cumplen con los estándares de malteado pueden seguir teniendo excelente calidad para usarse como forraje animal.

Debido a su amplia disponibilidad y a sus numerosas ventajas nutrimentales, la cebada es un alimento importante en las dietas humanas de muchas partes del mundo. No sólo la cebada tiene un alto contenido de fibra, antioxidantes benéficos y vitaminas del complejo B, sino que tiene bajo contenido de grasas y no tiene colesterol. Además de las cebadas tradicionales de dos y seis hileras, se han desarrollado variedades desnudas para aplicaciones alimenticias. Dado que la cebada desnuda requiere poca limpieza después de ser cosechada, puede usarse el grano entero, incluyendo el salvado y el germen ricos en nutrimentos. Los productos alimenticios hechos a base de cebada desnuda son considerados alimentos de grano integral.

La cebada es consumida por los humanos de las siguientes formas:

**a)** Cebada perlada, también denominada bloqueada, “pot” o “scotch”, es la forma más popular de cebada alimenticia. Las cáscaras externas no comestibles son removidas y los granos posteriormente son pulidos o perlados. Puede ser cocida y servida como guarnición o agregada a sopas, guisos, ensaladas, estofados y otros platillos.

**b)** Harina de cebada, que tiene un contenido de gluten más bajo que la harina de trigo, puede ser usada para agregar fibra a productos de panadería o como espesante para sopas, guisos y salsas.

**c)** Semolina de cebada, hecha a base de granos de cebada que han sido cortados en pequeños trozos, es usada para elaboración de alimentos comerciales como por ejemplo en cereales procesados, como aglutinante en embutidos o como suavizante o extensor en carnes molidas con bajo contenido de grasas.

**d)** Malta de cebada, además de ser usada en la producción de cerveza, también puede aprovecharse en extractos y jarabes para agregar sabor, color y como edulcorante en alimentos comercialmente preparados tales como cereales, productos de panadería, confituras y bebidas.

Las investigaciones más recientes se han centrado en los beneficios potenciales de la cebada para la salud humana. Los resultados iniciales indican que la presencia de  $\beta$ -glutano, una forma de fibra asimilable, disminuye el colesterol en la sangre, ayuda a regular la respuesta de glucosa de la sangre y puede fortalecer el sistema inmunológico. Así mismo, se están estudiando los efectos de la cebada sobre la reducción de los factores de riesgo de la diabetes al mejorar la salud intestinal y promover el mantenimiento de la pérdida de peso.

## 4.6 Malteado

El malteado produce las enzimas requeridas para la destilación y otros procesos, y hace a los almidones presentes en la cebada cruda más accesibles a dichas enzimas. Los pasos clave en el proceso de malteado de acuerdo con la International Malting Co. U.S, son los siguientes:

- a) Remojado, el grano es remojado en tanques de agua para aumentar el contenido de humedad del mismo hasta un nivel uniforme, generalmente alrededor del 45%.
- b) Germinación, el grano remojado es esparcido y mantenido a temperatura constante para permitir que el embrión (o germen) de los granos brote de manera controlada, activando las enzimas que comienzan a convertir el almidón en azúcar.
- c) Secado, el grano germinado, a menudo llamado malta verde, es calentado con el fin de secarlo, detener la germinación e impartir color y sabor.

Durante la destilación, la cebada maltera es machacada o molida y luego calentada con agua en un proceso llamado molturación, esto permite que las enzimas producidas durante el malteado conviertan el almidón del grano en azúcares solubles, también denominadas extracto de malta. A continuación, el líquido dulce, llamado mosto, es separado del residuo del grano. El mosto, es luego hervido para purificarlo y agregar el lúpulo para impartir sabor adicional. Finalmente, se introduce levadura al mosto para comenzar la fermentación, durante la cual los azúcares son convertidos a alcohol y dióxido de carbono (USDA, 2004).

Para optimizar el rendimiento de la cebada en los procesos de malteado y destilación, las malterías buscan granos que germinen fácilmente y que tengan granos gordos y de tamaño uniforme. Los niveles proteicos también son clave, ya que están directamente relacionados con los niveles de almidón y enzimas. Un contenido proteico más alto corresponde a niveles enzimáticos más altos, pero a niveles de almidón más bajos. Por lo

tanto, la cebada con niveles proteicos óptimos equilibra la cantidad de almidones y enzimas para maximizar el rendimiento del extracto de malta y destilación.

#### **4.7. Pruebas de calidad biológica en grano de cebada maltera (*Hordeum vulgare* L)**

##### **4.7.1. Prueba de Contenido de Humedad**

Se le llama contenido de humedad, a la cantidad de agua que contiene la semilla o grano, se expresa en porcentaje, con base en el peso húmedo o seco de la muestra. En la comercialización de granos y semillas normalmente se usa el calculado con base en el peso húmedo, y en investigación frecuentemente se usa el contenido con base en el peso seco (Moreno, 1996).

En México se establece, según la Norma Mexicana NMX-FF-O43-SCFI-2003, un contenido de humedad entre el 11.5 y 13.5 %, para la comercialización de la cebada utilizada para la obtención de malta (SE, 2003). Mientras que en países como Estados Unidos el porcentaje de humedad establecido es de 12 con un máximo de 13 % (USDA, 2004).

##### **4.7.2 Prueba de Vigor**

El Comité de Prueba de Vigor de la ISTA (1997), definió al vigor como la suma total de aquellas propiedades que determinan el nivel de actividad y comportamiento de la semilla o lote de semillas durante su germinación y emergencia de la plántula. Esta definición engloba los procesos que han sido directamente relacionados con las diferencias en el vigor de las semillas:

- a) Procesos y reacciones bioquímicas durante la germinación.
- b) Velocidad y uniformidad de emergencia de la plántula en campo.

c) Capacidad de emergencia de la plántula bajo condiciones desfavorables del medio ambiente.

La evaluación del vigor de la semilla es útil para poder predecir el comportamiento de un lote, para comparar el potencial biológico entre lotes con características similares o en última instancia para la toma de decisiones acerca del tiempo de almacenaje al que puede ser sometido un determinado lote (Moreno, 1996).

#### **4.7.3. Prueba de Germinación**

El objetivo de esta prueba es obtener información respecto de la capacidad de la semilla y en este caso particular del grano de cebada, para producir plántulas normales. Esta prueba permite además, establecer comparaciones de la capacidad germinativa entre diferentes lotes de semillas de una misma especie. La realización de esta prueba en condiciones de laboratorio permite controlar la mayoría de las condiciones, con lo cual es posible obtener resultados uniformes y rápidos, además de que al estandarizar la prueba ésta es fácilmente reproducible (Moreno, 1996).

En México, según la Norma Mexicana NMX-FF-O43-SCFI-2003 (SE, 2003), la cebada con utilidad para la industria maltera se denomina cebada maltera Grado México, tiene que cumplir con un porcentaje mínimo de germinación de 85% (SE, 2003). Mientras que en países como Estados Unidos el porcentaje mínimo que se exige en la germinación del grano de cebada es mayor o igual a 95% (USDA, 2004).

#### **4.7.4 Prueba de Peso Seco**

El objetivo de esta prueba es obtener información respecto al posible rendimiento que se espera tenga una variedad o cultivar. Para el caso específico del grano de cebada maltera, aun cuando no se han reportado trabajos enfocados a la determinación del peso

seco, y considerando que en la realización de la prueba se emplearan plántulas, los resultados de esta prueba en correlación con los de las pruebas anteriores, pueden ser un indicativo, que permitan establecer las condiciones en que se encuentra un lote de grano previamente a su industrialización y en un determinado caso establecer si existen diferencias en cuanto al rendimiento esperado de malta seca, entre diferentes lotes de grano.

#### **4.8. Principales hongos que invaden al cultivo de la cebada**

El potencial de rendimiento de las distintas variedades de cebada se encuentra limitado por diversos factores de manejo agronómico entre los que destacan: la deficiente preparación del suelo, siembra fuera de la estación de crecimiento, inadecuada cantidad y calidad de semilla utilizada, deficiente fertilización en cuanto a dosis y aplicación (Muñoz-Rodríguez, 2001); así como factores bióticos dentro de los que destacan los ocasionados por malezas, insectos y enfermedades. Dentro de este último factor sobresalen las enfermedades causadas por hongos, ya que en el cultivo de cebada de manera específica, aquella que es destinada a la obtención de malta para la industria cervecera la presencia de hongos es de gran importancia, debido a que bajo ciertas circunstancias algunas especies y/o sus derivados pueden afectar la germinación del grano, además de afectar la producción de  $\alpha$ -amilasa y de igual modo alterar los subsecuentes procesos de fermentación por tener efectos adversos en la calidad de la levadura. Por otro lado la presencia de hongos en la malta representa riesgos para la salud humana debido a la posible presencia de micotoxinas y a los efectos que pueden resultar en la calidad de la cerveza, específicamente en lo relacionado a sus propiedades físicas y organolépticas (Rabie, 1997).

Hernández-Pérez, (1998) y Gutiérrez-García, (2000) reportaron un total de 10 géneros de hongos patógenos para el cultivo de la cebada en México (Cuadro 1). Cabe señalar que las especies pertenecientes a estos géneros y sus características intrínsecas dependen fundamentalmente del vegetal que invaden, el clima y la región geográfica en la cual se desarrollan (Carrillo, 2003).

**Cuadro 1. Hongos patógenos del cultivo de cebada**

<b>Género</b>	<b>Nombre común de la enfermedad causada</b>	<b>Parte afectada</b>
<i>Alternaria</i>	Mancha negra del grano Tizón de la hoja	Semilla Hoja, espiga y semilla
<i>Aspergillus</i>	Pudrición	Semilla
<i>Cladosporium</i>	Pudrición	Hojas, tallo, espiga y semilla
<i>Erysiphe</i>	Cenicilla	Hojas, tallo y espiga
<i>Fusarium</i>	Roña de la espiga Pudrición de la espiga	Tallo, espiga, semilla y raíz
<i>Helminthosporium</i>	Mancha oval Mancha reticulada Raya foliar Tizón de la hoja	Hoja, tallo, espiga, semilla y raíz
<i>Pythium</i>	Pudrición	Tallo, semilla y raíz
<i>Puccinia</i>	Roya	Hojas, tallo y espiga
<i>Sclerotium</i>	Pudrición	Hojas y tallo
<i>Ustilago</i>	Carbones	Espiga y semilla

Hernández-Pérez, 1998, Gutiérrez-García, 2000

Existen además otros trabajos realizados en el cultivo de cebada, principalmente en la región de los Valles Altos, con la finalidad de determinar la microbiota presente en el grano, de los más destacados se encuentran el realizado por Gutiérrez-García (2000),

quien encontró la presencia de los géneros *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Cephalosporium*, *Gonatobotrys*, *Phoma*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Para este autor los géneros *Helminthosporium* y *Fusarium* son los de mayor relevancia por su implicación en la reducción de la germinación y éste último por la producción de micotoxinas, destacando particularmente la presencia de ocho especies del género *Fusarium*.

Muñoz-Rodríguez (2001), en un trabajo con grano de cebada encontró los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Bipolaris*, *Rhizopus* y *Penicillium*, destacando la presencia de la especie *F. graminearum*.

Ramírez-Marchand (2003), reporta la presencia en grano de cebada, de los géneros *Fusarium*, *Bipolaris*, *Alternaria*, *Epicoccum*, *Trichothecium*, *Gonatobotrys*, *Penicillium*, *Phoma*, *Cladosporium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus* y *Acremoniella*. Además determinó la presencia de tricotecenos en muestras de cebada procedentes de los Valles Altos, oscilando sus valores de 0.03 a 7.10 mg kg<sup>-1</sup>, e identificando catorce especies del género *Fusarium*.

Romero-Bautista (2004), determinó en grano de cebada los géneros *Helminthosporium*, *Stemphyllium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cephalosporium* y *Rhizoctonia*. Destacando *Helminthosporium* y *Fusarium* como los principales hongos patógenos transmitidos por medio de semilla en el cultivo de la cebada en la región de los Valles Altos.

De la Rosa (2004), encontró la presencia de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Phoma*, *Stemphyllium* y *Ulocladium*.

Rabie (1997), determinó la presencia de hongos en el grano de cebada utilizando cinco medios de cultivo diferentes, encontrando un total de 31 géneros, señalando solo trece géneros (*Alternaria*, *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phoma* y *Rhizopus*), como los más

importantes debido a que estos fueron los que más predominaron. De manera sobresaliente hace mención dentro del género *Fusarium* a las especies *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. sambucinum*, *F. scirpi* y *F. subglutinans*.

Salas and Steffenson (1999), reportó a *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichoides* y *F. poae* como especies asociadas al cultivo de cebada, además de haber encontrado presencia en forma natural de deoxinivalenol en concentraciones que van de 0.1 a 21.8 mg kg<sup>-1</sup>. Realizando trabajos de inoculación de las cepas aisladas del cultivo de cebada encontró la síntesis de 15-acetylDON (1.4 a 7.0 mg kg<sup>-1</sup>), 3-acetylDON (0.06 mg kg<sup>-1</sup>), nivalenol (1.2 a 5.3 mg kg<sup>-1</sup>), scirpentriol (0.8 a 1.5 mg kg<sup>-1</sup>), 15-acetoxyscirpenol (0.5 a 1.9 mg kg<sup>-1</sup>), toxina T-2 (1.1 a 2.0 mg kg<sup>-1</sup>), toxina HT-2 (1.3 a 10.8 mg kg<sup>-1</sup>), tetraol T2 (1.9 a 9.7 mg kg<sup>-1</sup>) y neosolaniol (0.5 mg kg<sup>-1</sup>).

Moreno (2000), en un trabajo realizado para determinar deoxinivalenol en diversos granos, encontró bajas concentraciones que van de 0.04 a 1.6 mg kg<sup>-1</sup>; así mismo determinó la presencia de *Penicillium*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Aurobasidium* y *Alternaria*, como los principales géneros de hongos presentes en cebada.

Olsson *et al.* (2002), en un trabajo para determinar la presencia en grano de cebada de ocratoxina A y deoxinivalenol, reportó a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Eurotium* y *Fusarium*, asimismo reportó concentraciones de ocratoxina A que van de 3 a 934 µg kg<sup>-1</sup> y concentraciones de deoxinivalenol que van de 5 a 857 µg kg<sup>-1</sup>.

Kosiak y Torp (2004), trabajando en la determinación de *Alternaria* y *Fusarium* en diversos granos, encontró que para cebada, las especies que mayor presencia tuvieron fueron: *A. infectoria*, *A. tenuissima* y *A. arborescens*, mientras que para el género *Fusarium* reportó a las especies *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. culmorum* y *F. tricinctum*.

Tutelyan (2004), trabajando con diversos cereales en Rusia de 1989 al 2001, encontró que después de analizar 719 muestras de cebada estas presentaron concentraciones de deoxinivalenol que van de 0.05 a 0.91 mg kg<sup>-1</sup>, sin embargo no puntualiza que géneros y/o especies se encuentran involucrados en la síntesis de esta micotoxina.

Legzdina and Buerstmayr (2004), al trabajar con cuatro genotipos de cebada, CIMMYT 39, 75, 106 y Cebada Petunia originarios de México, reportó la presencia de diversos tricotecenos, sin especificar que géneros o especies están implicados en la síntesis de estas micotoxinas, sus concentraciones respectivas fueron para CIMMYT 39, 737 µg kg<sup>-1</sup> de deoxinivalenol, 349 µg kg<sup>-1</sup> de 3-Ac-DON, 994 µg kg<sup>-1</sup> de 15-Ac-DON y 269 µg kg<sup>-1</sup> de nivalenol; para CIMMYT 75 reportó 8,092 µg kg<sup>-1</sup> de deoxinivalenol, 0 µg kg<sup>-1</sup> de 3-Ac-DON, 257 µg kg<sup>-1</sup> de 15-Ac-DON y 208 µg kg<sup>-1</sup> de nivalenol; para CIMMYT 106 reportó 7,121 µg kg<sup>-1</sup> de deoxinivalenol, 80 µg kg<sup>-1</sup> de 3-Ac-DON, 370 µg kg<sup>-1</sup> de 15-Ac-DON y 219 µg kg<sup>-1</sup> de nivalenol; por último para cebada Petunia reportó 32,746 µg kg<sup>-1</sup> de deoxinivalenol, 321 µg kg<sup>-1</sup> de 3-Ac-DON, 1,202 µg kg<sup>-1</sup> de 15-Ac-DON y 158 µg kg<sup>-1</sup> de nivalenol.

Estos trabajos, entre muchos otros más, son los que se encuentran vinculados a la presencia de hongos en grano de cebada y su relación con la presencia de determinadas micotoxinas.

#### **4.9. Micotoxinas producidas por hongos que invaden a la cebada durante su desarrollo en el campo y su almacenamiento.**

Algunos de los hongos que invaden al cultivo de cebada además de causar deterioro del grano pueden producir micotoxinas, tanto, durante el desarrollo del grano en el campo, como durante su permanencia en almacén. En el campo se observa que una micotoxina particular se produce en mayor cantidad sobre un producto agrícola y no sobre otro. Así

los tricotecenos están asociados a cereales de zonas templadas, mientras que las aflatoxinas se encuentran con más frecuencia en oleaginosas y cereales de zonas cálidas (Carrillo, 2003).

Existen diversos conceptos a nivel mundial a cerca del término micotoxina, dentro de los más destacados están los sugeridos por la FAO (1997), organismo que considera a las micotoxinas como sustancias nocivas para la salud, generadas por el crecimiento de hongos que contaminan los alimentos durante su cultivo, recolección, depósito y distribución. Esta contaminación es muy frecuente en los países con clima húmedo y cálido (Ferris *et al.*, 2001). Por otra parte, las micotoxinas son consideradas metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos capaces de crecer en gran variedad de sustratos y bajo las más diversas condiciones ambientales, contaminando con frecuencia los alimentos, en especial los de origen vegetal (Arango-Mejía, 2003).

De acuerdo con Robledo *et al.* (2001), las micotoxinas son un grupo muy amplio de metabolitos secundarios de origen fúngico caracterizados por presentar una elevada toxicidad tanto para el hombre como para los animales; toxicidad que puede variar desde el desarrollo de actividades carcinogénicas, teratógenas o mutágenas, hasta la producción de desórdenes de tipo hormonal o inmunosupresor, dependiendo de la micotoxina implicada. Estos metabolitos secundarios difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas y son formados a partir de unos pocos intermediarios del metabolismo primario, bajo condiciones que no son las óptimas para el desarrollo de los hongos implicados y de condiciones de estrés (Carrillo, 2003).

Durante la biosíntesis de estos metabolitos, la cantidad producida depende no sólo de los parámetros nutrimentales y ambientales, sino también de la historia de desarrollo del hongo. La formación de las micotoxinas refleja que el hongo ha alcanzado cierto grado de diferenciación bioquímica, fisiológica y morfológica. Las micotoxinas son específicas,

cuanto más compleja es la ruta biosintética de estos metabolitos secundarios, más restringido es el número de especies de hongos productores (Carrillo 2003).

Hasta el momento se han identificado más de 200 tipos de micotoxinas. Sin embargo, las que pueden encontrarse con mayor frecuencia como contaminantes naturales en los alimentos para animales o humanos son las siguientes: aflatoxinas (B1, B2, G1, G2, M1, M2), ocratoxinas, zearalenona, tricotecenos (deoxinivalenol, T-2, nivalenol), citrinina, patulina y fumonisinas B1 y B2 (Almueda y Lizaso, 2001).

Para cebada se reportan las siguientes toxinas (Cuadro 2), conjuntamente con los géneros que con mayor frecuencia se asocian a su síntesis.

### **Cuadro 2. Micotoxinas reportadas en grano de cebada**

<b>Micotoxina</b>	<b>Género</b>
Aflatoxinas	<i>Aspergillus</i>
Deoxinivalenol, Zearalenona	<i>Fusarium</i>
Ocratoxina A, Citrinina	<i>Penicillium</i>
Alternarioles	<i>Alternaria</i>

De acuerdo Sanchis *et al.* (1993), Torres, (1993), Abramson *et al.* (1999), Carrillo, (2003), Rousseau, (2004).

**Aflatoxinas:** son las micotoxinas más estudiadas hasta ahora y son producidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y por *Aspergillus nomius* y se les ha clasificado como B1, B2, G1, G2 (según la fluorescencia bajo la luz ultravioleta) y la M1, la cual es un metabolito presente en la leche y la orina de bovinos por la ingestión de alimento contaminado con estas toxinas. Las aflatoxinas son sintetizadas con rangos de temperatura que van de los 12 a los 40 °C; se sintetizan en un rango de pH de 3.5 a 8.0, siendo el pH óptimo de 6.0 y en una actividad de agua que va de 0.82 a 0.99

(Sweeney y Dobson, 1998). Las aflatoxinas se han encontrado en productos como el cacahuate, semilla de algodón, semilla de girasol, coco, aceite de oliva, maíz, sorgo, arroz, trigo, cebada, avena, pistache, nuez de Brasil, almendras, nuez moscada e higos (Arango, 2003). Las aflatoxinas son compuestos con efectos tóxicos inmediatos, además de inmunosupresores, mutagénicos, teratogénicos y carcinógenos (Peraica *et al.*, 2000). En animales de granja, las aflatoxinas producen una disminución del crecimiento, de la eficiencia alimentaria, deprimen la respuesta inmunológica y eventualmente pueden llegar a causar la muerte (Gallego, 2005).

Son moléculas altamente termoresistentes y no se destruyen con los tratamientos clásicos de esterilización de alimentos. Sin embargo, son eliminadas o biotransformadas en el proceso de refinado de productos oleaginosos en la producción de aceites.

La Unión Europea cuenta con una legislación para estas micotoxinas en productos alimenticios para consumo humano y actualmente los niveles máximos admisibles varían entre 2 a 8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para aflatoxina B<sub>1</sub> y de 4 a 15  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para aflatoxinas totales, dependiendo del alimento que se trate y de si son utilizados para consumo humano directo o como ingrediente de algún producto alimenticio. En países como Australia, Canadá, Colombia, Hungría, India, Japón, México, Cuba, Tailandia y Estados Unidos, también existen niveles máximos de tolerancia que oscilan entre los 5 y los 30  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para aflatoxina B<sub>1</sub> y para aflatoxinas totales. Se destaca a la India con el nivel de tolerancia más alto con 30  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxina B<sub>1</sub> en general para todos los alimentos, además de México y Estados Unidos con el nivel de tolerancia más alto para aflatoxinas totales 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en todos los alimentos (Gimeno, 2003).

Las aflatoxinas se han reportado en cebada maltera y en malta en rangos de 0.1 a 0.5  $\mu\text{g gk}^{-1}$  y de 0.05  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en cerveza (Mélotte, 2005).

**Ocratoxinas:** son micotoxinas producidas al menos por siete especies de *Aspergillus* y seis especies de *Penicillium*, destacando principalmente *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium viridicatum* (Gallego, 2005). Los factores que determinan la síntesis de la ocratoxina en el género *Aspergillus*, son la temperatura en un rango de los 12 a los 37 °C, siendo la óptima de síntesis 31 °C, el pH en un intervalo de 3.0 a 10.0, aunque se ha reportado que es posible la síntesis de esta toxina hasta un rango mínimo de pH de 2.2 (Sweeney y Dobson, 1998). Así mismo, se reporta que la actividad de agua óptima para la síntesis de esta toxina es de 0.95 a 0.99, aunque en algunas especies como *Aspergillus ochraceus* la actividad de agua mínima para la síntesis de esta toxina se ha encontrado que puede ser de 0.77. Por otro lado cuando en la síntesis de esta toxina están implicadas especies del género *Penicillium*, éstas requieren temperaturas que van de los 0 a los 31 °C, siendo la temperatura óptima para la síntesis de 20 °C, en un rango muy amplio de pH que va de 2.1 a 10.0 y con una actividad de agua de 0.86 (Sweeney y Dobson, 1998). La contaminación con ocratoxina se da principalmente en los cereales y en algunas legumbres pero también puede presentarse en el café, cacao, nueces y uvas pasas, en los últimos años se ha encontrado contaminación de jugo de uva y de vino, con ocratoxinas, de igual modo se han tenido reportes acerca de que la cerveza puede contener importantes residuos de ocratoxina A. La ocratoxina A es un potente factor nefrotóxico, carcinógeno y también es teratógeno e inmunotóxico (FAO, 1997).

La Unión Europea cuenta con una legislación para ocratoxina A y establece límites de 5 y 3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para cereales en grano sin transformar y para productos derivados de cereales, respectivamente, en estos últimos se incluyen los productos transformados a base de cereales y los cereales en grano para consumo humano. En otros países los límites son muy variados y se encuentran en rangos comprendidos entre los 5 y los 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Gimeno y Ligia, 2003). Abramson *et al.* (1999), reporta haber encontrado 24  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de

ocratoxina A en cebada almacenada durante veinte semanas con un contenido de humedad del 19%.

En concordancia con lo anterior, Mélotte (2005), menciona que la regulación para ocratoxina A en la Unión Europea es de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  para cereales y de  $3 \mu\text{g kg}^{-1}$  para la malta, y que a pesar de no existir una regulación para la cerveza, en ensayos realizados con dos técnicas para detección de micotoxinas se observó que en la prueba de cromatografía de capa fina se obtuvieron rangos de  $0.1$  a  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$  en cebada y en malta, mientras que mediante la prueba de ELISA se han reportado  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  en cebada y en malta y en cerveza se encontraron rangos de  $0.05$  a  $0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

**Deoxinivalenol:** es una toxina que pertenece al grupo de los tricotecenos. Es producida por diversos géneros entre los que se encuentran *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Stachybotrys*, *Verticimonosporium* y *Fusarium*, dentro de este último género aproximadamente 24 especies la producen, siendo las principales *Fusarium equiseti*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium sporotrichioides*. La síntesis de la toxina se da en un amplio rango de factores medioambientales y características del sustrato en el cual se desarrolle la especie implicada (Sweeney y Dobson 1998). Se puede encontrar como contaminante natural en los cereales y productos de cereales (Gimeno y Ligia, 2003). Se ha demostrado que el Deoxinivalenol (DON), tiene propiedades antibióticas, citotóxicas e inmunosupresoras, produce intensos efectos tóxicos en animales de granja que se traducen en inflamaciones epidérmicas, desórdenes digestivos, hemorragias, afecciones de la médula ósea y neuropatías, inhiben la síntesis de proteínas y dañan las membranas celulares de los glóbulos rojos (Carrillo, 2003). En el hombre como consecuencia del consumo de trigo contaminado o de cerveza contaminada con DON se ha encontrado que es causante de la denominada aleuquia tóxica alimentaria, la cual se caracteriza por una

marcada leucopenia (Gallego, 2005). La Unión Europea, al igual que el resto de los países, no cuentan con una legislación aplicable al DON (Gimeno y Ligia, 2003). Por otra parte, Mélotte (2005), hace mención de ensayos realizados en cebada y malta, donde se encontraron de 5 a 30  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de DON respectivamente y de 5 a 25  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de la misma toxina en cerveza.

**Zearalenona:** es un compuesto con una estructura estrechamente relacionada a metabolitos estrogénicos, producida muchas veces junto con los tricotecenos, por varias especies de *Fusarium*, tales como *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. heterosporum* y *F. equiseti*, las cuales se encuentran frecuentemente colonizando diversos granos. Es débilmente fitotóxica y produce hiperestrogenismo y problemas reproductivos en el ganado (Carrillo, 2003). En el ser humano, la zearalenona y sus productos son estrogénicos y anabólicos (Arango, 2003). Para esta toxina no se reporta la existencia de legislaciones que establezcan los límites permitidos. Sin embargo, Mélotte (2005), reporta en ensayos realizados en laboratorio la presencia de zearalenona en concentraciones de 1 a 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en cebada y en malta y concentraciones en cerveza que van de 1 a 5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Los síntomas que se presentan en el ganado con más frecuencia por el consumo de esta toxina son: infertilidad, edema vulvar, prolapso vaginal e hipertrofia mamaria en hembras; en machos se observa atrofia testicular y agrandamiento de la glándula mamaria.

**Alternarioles:** son micotoxinas producidas por diversas especies del género *Alternaria*, se pueden encontrar en sorgo, semillas de girasol, cebada, avena, trigo, olivo, tomates, mandarinas, pimientos, arroz y maíz, principalmente. Algunos de los metabolitos secundarios estudiados e identificados de *Alternaria* son el alternariol, el monometiléter de alternariol, el ácido tenuazóico, el altenueno y la altertoxina I, siendo los tres primeros las principales toxinas de *Alternaria*, por que se ha encontrado que varias especies producen

estos metabolitos en cantidades relativamente altas (Shade y King, 1984). Los alternarioses se asocian con la inhibición de la síntesis de proteínas, además de ser citotóxicas, carcinógenas y mostrar efectos fitotóxicos y teratógenos, incluyendo efectos sinérgicos. Para la síntesis de alternariol y monometil éter de alternariol la temperatura óptima es de 25 °C con una actividad de agua de 0.98, mientras que la síntesis de ácido tenuazóico se realiza a 20 °C y una actividad de agua muy próxima a 1.0, siendo los niveles de pH para ambos casos en rangos muy amplios (Da Motta and Soares, 2000; Carrillo, 2003). Sobre este tipo de toxinas no se han encontrado reportes que establezcan una legislación sobre el contenido de alternarioses en los alimentos.

**Citrinina:** es una toxina producida por especies de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. La síntesis de esta toxina se da en rangos de temperatura desde los 15 a los 37 °C, siendo la temperatura óptima de 30 °C, con un rango de pH de 2.0 a 10.0, con relación a la actividad del agua óptima para la síntesis de la toxina no existen datos precisos. Esta toxina puede provocar muerte por degeneración renal en animales monogástricos, en aves de corral puede causar diarrea acuosa; en el ser humano aún no se conocen con exactitud cuales pueden ser sus efectos (Sweeney y Dobson, 1998). La citrinina puede encontrarse en arroz, cebada, extractos de tomate, mermeladas, jugos de peras y manzanas (Carrillo, 2003). Al igual que con otras toxinas, no se reporta la existencia de una legislación que establezca las concentraciones que pueden encontrarse en los alimentos. Abramson *et al.* (1999), reportó la presencia de esta micotoxina en grano de cebada almacenada durante veinte semanas con un contenido de humedad de 19%, la concentración encontrada fue de 38  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Ahora bien, la presencia de cualquiera de los géneros o especies capaces de sintetizar micotoxinas no significa que necesariamente ésta se encuentre contaminando un sustrato o alimento, así como el hecho de que dicho sustrato se encuentre libre de hongos no

garantiza que la micotoxina no se encuentre ya contaminando el sustrato o alimento, tal y como lo establece Moreno *et al.* (2000), quien en su trabajo encontró presencia de deoxinivalenol, pero reporta no haber encontrado presencia de *Fusarium* o cualquier otro hongo asociado a la síntesis de esta micotoxina.

En México únicamente se cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA-1-2002, la cual hace mención de la metodología que se debe utilizar para la determinación de aflatoxinas, así mismo se establece el límite máximo permitido de 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de aflatoxinas totales en granos y cereales para consumo humano, mientras que en granos para consumo animal se aceptan concentraciones de 21 a 300  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

#### **4.10. Métodos de control**

Debido al daño potencial que las micotoxinas representan en la salud humana y animal, desde el descubrimiento de las aflatoxinas en la década de los sesentas, muchos países han establecido reglamentos para su control, centrados básicamente en las aflatoxinas. No obstante, otras micotoxinas como las fumonisinas, la ocratoxina A y los tricotecenos están adquiriendo mayor importancia para el sector agroalimentario. Ante esta perspectiva se han desarrollado una serie de métodos convencionales para controlar el problema de la contaminación en los alimentos, para lo cual la FAO (1997) ha establecido las condiciones que deben de cumplir los procesos de descontaminación de micotoxinas las cuales son:

- Destruir, inactivar o eliminar las micotoxinas.
- No producir residuos tóxicos.
- Preservar el valor nutrimental y aceptabilidad del producto.
- No alterar las propiedades organolépticas del producto.
- Destruir el micelio y las esporas de los hongos.

- Ser cuidadoso con la ecología durante el proceso de descontaminación.

Teniendo en cuenta que la contaminación de los alimentos con micotoxinas es inevitable, según Ilender (1998) y Park *et al.* (1998), se han tratado de poner en práctica algunas estrategias para minimizar los efectos adversos de estos compuestos en la salud humana y animal, dentro de las que destacan:

- a) La realización de análisis rutinarios de los insumos alimentarios, empleando metodologías rápidas y sensibles para la detección oportuna de la contaminación con algún tipo de micotoxina específica, siendo hasta ahora uno de los métodos más utilizados el uso de columnas de anticuerpos monoclonales de inmunoafinidad que se ligan a un determinado tipo de toxina.
- b) El almacenamiento de los alimentos o de sus insumos con límites de contenido de humedad del 12 al 14%.
- c) Utilizar instalaciones limpias y secas, tratando de reducir el tiempo de almacenamiento de los alimentos.
- d) El control de plagas que puedan interactuar como vectores de hongos.
- e) El uso de inhibidores del desarrollo de hongos.

Según Gimeno y Ligia (2003), se han realizado estudios con métodos físicos, químicos y biológicos que sirven para la prevención, descontaminación, inactivación o detoxificación de micotoxinas, algunos de ellos se han realizado a nivel de planta piloto o en laboratorio. Sin embargo, algunos de ellos han resultado imprácticos debido a su alto costo, falta de efectividad o bien porque aún pudiendo ser económicos y efectivos algunos de ellos dejan residuos en el alimento o materia prima tratada, los cuales pueden ser perjudiciales para la salud humana o animal. Por otra parte estos métodos deben integrarse en un sistema diseñado para el tratamiento de grandes cantidades de alimento o materia prima y su aplicación debe ser capaz de conseguir la inactivación y/o detoxificación de

concentraciones elevadas de micotoxina, lo cual en muchas ocasiones resulta caro y difícil. Además que estos métodos deben considerar que la micotoxina puede encontrarse unida a estructuras proteicas o algún otro constituyente del alimento o materia prima, por otra parte se debe considerar que la micotoxina no se encuentra uniformemente distribuida en el material al cual se ha de someter cualquiera de los métodos existentes. Sin embargo, Ilender (1998) y Park *et al.* (1998), mencionan que hasta ahora no se cuenta con sustancias que actúen como antimicotoxinas, para terapias específicas y aún menos con metodologías adecuadas que permitan el manejo práctico a nivel industrial de las diferentes micotoxinas que pueden presentarse en los alimentos o en los insumos utilizados para la elaboración de los mismos. Lo que se ha hecho hasta ahora es utilizar una serie de procedimientos encaminados a reducir o eliminar los riesgos relacionados con la pérdida de la calidad de los alimentos y su efecto económico, los procedimientos más comúnmente utilizados son:

#### **4.10.1. Procedimientos físicos**

a) Los métodos de selección de granos de cereales y posterior separación mecánica de la cáscara y el polvo del resto del cereal, resultan adecuados para la detoxificación debido a que habitualmente la mayor concentración de micotoxinas se presenta en el pericarpio de los granos y en el polvo de cereal, este método es aplicable en alimentos para animales y para humanos.

b) La conservación de las materias primas con un control adecuado de humedad no mayor a 12%, actividad de agua inferior a 0.70, temperatura de 20 a 22 °C, tratamiento de estas materias primas en los silos mediante corrientes de aire frío y seco y la limpieza y desinfección de los circuitos de fabricación, ayudan a evitar el crecimiento de especies de hongos toxígenos y la posible producción de micotoxinas.

c) Inactivación por calor. Los tratamientos térmicos pueden dar resultados positivos, sin embargo las micotoxinas son en general bastante resistentes a ciertas temperaturas, las aflatoxinas y la ocratoxina A resisten temperaturas de hasta 120 °C y 100 °C respectivamente, el DON es resistente a temperaturas de 150 °C. Lo cual indica que la efectividad de la detoxificación térmica está limitada al tiempo de permanencia a determinadas temperaturas y a la presión a que son realizados los tratamientos a esas temperaturas, ya que tiempos relativamente largos de exposición a altas temperaturas pueden dar detoxificaciones efectivas, pero a su vez causan deterioro del alimento o materia prima y serían inadecuados para su consumo o transformación. Hasta ahora mediante procesos como la ebullición, el horneado y el uso de autoclave sólo se han obtenido pequeños cambios en la estructura de las micotoxinas y se ha llegado a la conclusión que para la inactivación de estos compuestos se requieren temperaturas altas con tiempos de exposición relativamente largos.

d) Irradiación ultravioleta. Se ha demostrado que las aflatoxinas pueden ser destruidas en cierta magnitud por efecto de la irradiación ultravioleta y por luz solar intensa, en donde los tiempos de exposición van de dos a tres minutos. Se ha encontrado además que el uso de radiación ionizante puede también destruir algunas toxinas, sin embargo para tal efecto se requieren altas dosis de irradiación, las cuales pueden deteriorar la calidad del producto tratado.

#### **4.10.2. Procedimientos químicos**

a) Inactivación. En este método destaca el uso de hidróxido de calcio y monometilamina aplicados contra las aflatoxinas, con los que se pueden conseguir, en algunos sustratos tratados, la reducción de hasta un 98%, por la transformación de éstas en metabolitos no tóxicos, con este tratamiento no se disminuye la digestibilidad de las proteínas de manera

significativa, además de que no se ha observado alteración de las propiedades organolépticas del sustrato tratado. Sin embargo el uso del amoníaco se ha cuestionado debido a que esta sustancia causa una reducción del aminoácido cisteína del 15% al 30%, además de que, en casos como el maíz, el amoníaco produce decoloración del grano tratado y se ha detectado la presencia de residuos de amoníaco así como de olores desagradables.

**b) Uso de fungistáticos.** El uso de fungistáticos como inhibidores del metabolismo, crecimiento y proliferación de los hongos es utilizado ya desde algunos años y se aplica a los alimentos para animales y humanos. Un fungistático o mezcla de ellos actúa inhibiendo la síntesis de enzimas a nivel de célula fúngica y por tanto del metabolismo del hongo, evitando de este modo su crecimiento y proliferación. Consecuentemente el riesgo de contaminación con micotoxinas se verá reducido o anulado. Sin embargo, si las micotoxinas ya se encuentran contaminando el sustrato, el fungistático no actuará sobre éstas. Los fungistáticos más comunes utilizados en la alimentación animal son el ácido propiónico y sus sales cálcica y sódica, el propionato de amonio, ácido sórbico y su sal potásica, ácido fórmico y sus sales cálcica y sódica. En la alimentación humana son utilizadas las sales cálcica y sódica del ácido propiónico y muy comúnmente el ácido sórbico y su sal potásica en alimentos como los quesos, productos de trigo, frutos secos, margarinas, mermeladas, mayonesas, jaleas, vinos y jugos de frutas. Existen datos que señalan que el uso indebido de fungistáticos en concentraciones menores a las recomendadas pueden en algunos casos ocasionar que éstos sean metabolizados por algunas especies de hongos toxígenos favoreciendo la producción de micotoxinas (Smith *et al.*, 1994).

**c) Extracción y arrastre con solventes orgánicos.** Esta metodología busca los mínimos efectos sobre el contenido de proteína y calidad nutrimental del sustrato en tratamiento,

entre los solventes utilizados se encuentra el etanol, la acetona, el isopropanol, los sistemas de solventes hexano-etanol, hexano-metanol y hexano-acetona. También es posible la utilización de soluciones de bicarbonato de sodio y de cloruro de calcio.

#### **4.10.3. Procedimientos bioquímicos**

a) Adsorción. Se realiza mediante la incorporación de aditivos que no destruyen la micotoxina sino que actúan evitando la absorción de la toxina en el intestino y su posterior distribución a través del torrente sanguíneo. Esto conduce a la quelación de moléculas vía fuerza electrostática o por formación de enlaces covalentes entre la micotoxina y el aditivo, de una manera irreversible y sin efecto en la salud del organismo que lo consume y son eliminados a través de las heces fecales. En base a las investigaciones realizadas en los últimos años, se ha observado que los absorbentes químicos se unen preferentemente a las aflatoxinas; no se ha aclarado la causa pero probablemente se deba a la singular relación entre la molécula de la aflatoxina y la estructura molecular del absorbente químico. Se considera que tal vez esta relación no se encuentra presente en algunas otras micotoxinas debido a su diferente estructura molecular. Entre los aditivos más utilizados se encuentran materiales naturales y sintéticos, tales como el carbón activado, la polivinilpirrolidona, los aluminosilicatos, los magnesiosilicatos y ciertas grasas animales y vegetales (Semple *et al.*, 1987; Park *et al.*, 1998).

#### **4.10.4. Procedimientos biológicos**

Dentro de los métodos biológicos se han efectuado estudios y pruebas para el uso de microorganismos que degraden en determinadas condiciones ciertas micotoxinas. A nivel de laboratorio se han tenido resultados favorables en la degradación de micotoxinas tales como aflatoxinas, patulina, ocratoxina A, zearalenona, toxina T-2 y rubratoxina A, sin

embargo la aplicación práctica de estos sistemas está aún en proceso de estudio y desarrollo, entre los microorganismos utilizados destacan *Sacharomyces cereviseae*, *Flavobacterium auranticum*, *Neurospora sitophila* y microorganismos del rumen (Smith *et al.*, 1994).

#### **4.10.5. Gushing de la cerveza**

El gushing se define como el fenómeno producido inmediatamente después de abrir el envase de cerveza y que se caracteriza por la formación de un gran número de burbujas en todo el líquido, causando una ascensión rápida de la espuma y el derramamiento de la misma. El gushing puede ser de dos tipos: el gushing primario el cual es inducido por metabolitos fúngicos, llamados “factores de gushing”, los cuales están presentes en la malta o en el cereal que se utiliza como materia prima para la elaboración de la cerveza y el gushing secundario el cual puede presentarse si en los envases utilizados para la cerveza existen impurezas como: iones metálicos, cristales de oxalato de calcio, residuos de agentes limpiadores o excesos de gas (Gjerntsen *et al.*, 1963; Gjerntsen, 1967; Munar and Sebree, 1997; Hippeli and Elstner, 2001; Sarlin *et al.*, 2005b).

Como resultado de casi cincuenta años de investigación acerca del gushing, se ha llegado a determinar que el gushing primario puede ser causado por el desarrollo de hongos en campo, de hongos de almacén o durante el proceso de malteado. Cuando se encuentran involucrados hongos de campo se ha comprobado que los géneros involucrados son *Fusarium*, *Alternaria*, *Stemphyllium* y *Cladosporium*. Por otra parte si los involucrados son hongos de almacén se menciona a *Aspergillus*, *Penicillium* y *Rhizopus*, como los que más comúnmente sintetizan los metabolitos secundarios capaces de inducir el gushing (Munar and Sebree, 1997; Hippeli and Elstner, 2001; Young, 2001; Sarlin *et al.*, 2005a; Sarlin *et al.*, 2005b).

En la década de los años 70's, se realizó el aislamiento y caracterización de una sustancia que induce el gushing, la cual se obtuvo de una cepa de *Nigrospora sp.*, en un medio de cultivo líquido, y se demostró que el factor de gushing debido a *Nigrospora sp.*, es una hidrofobina, soluble al agua, estable al calor, de superficie activa y resistente a la digestión por proteasas (Kitabatake and Amaha 1977, Kitabatake, 1978).

Las hidrofobinas como tales, fueron descubiertas en la década de los años 90, se trata de pequeñas proteínas fúngicas con peso molecular de entre 7 y 20 kDa, estas cuentan con una superficie activa, con una interfase hidrofóbica e hidrofílica. Las hidrofobinas se encuentran en la pared celular del micelio y de las esporas, principalmente (Hippeli and Elstner, 2001; Sarlin *et al.*, 2005<sup>a</sup>). Sarlin *et al.*, (2005b), reporta que las concentraciones de hidrofobinas necesarias para causar el efecto de gushing en la cerveza son extremadamente mínimas (cuadro 3) y sintetiza dicha información de acuerdo al género implicado de la manera siguiente:

**Cuadro 3. Concentración de hidrofobinas para causar el efecto de gushing en la cerveza**

<b>Género implicado</b>	<b>Concentración de hidrofobinas necesaria para causar Gushing (ppm)</b>
<i>Nigrospora sp.</i>	0.05
<i>Stemphyllium sp.</i>	4
<i>Fusarium sp.</i>	0.4
<i>Penicillium sp.</i>	0.3

De acuerdo Sarlin (2005b).

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Procedencia del grano de cebada maltera

En este trabajo se analizaron un total de trece muestras de grano de cebada maltera (*Hordeum vulgare* L.), las cuales fueron proporcionadas por la Compañía Impulsora Agrícola S.A. de C.V (Cuadro 4).; agrupándose de la manera siguiente:

**Cuadro 4. Características de procedencia del grano de cebada**

Muestra	Variedad	Ciclo	Ciclo	Riego	Origen
M <sub>1</sub>	Esperanza	O-I	2002/2003	Riego	Jaral del Progreso, Guanajuato
M <sub>2</sub>	Esperanza	O-I	2002/2003	Riego	Valle de Santiago, Guanajuato
M <sub>3</sub>	Esperanza	O-I	2002/2003	Riego	Abasolo, Guanajuato
M <sub>4</sub>	Esmeralda	P-V	2003	Temporal	Apan, Hidalgo
M <sub>5</sub>	Esmeralda	P-V	2003	Temporal	Calpulalpan, Tlaxcala
M <sub>6</sub>	Esmeralda	P-V	2003	Temporal	Pachuca, Hidalgo
M <sub>7</sub>	Esmeralda	P-V	2003	Temporal	Cuyoaco, Puebla
M <sub>8</sub>	Esmeralda	P-V	2003	Temporal	Cuyoaco, Puebla
M <sub>9</sub>	Esperanza	O-I	2003/2004	Riego	Jaral del Progreso, Guanajuato
M <sub>10</sub>	Esperanza	O-I	2003/2004	Riego	Valle de Santiago, Guanajuato
M <sub>11</sub>	Esperanza	O-I	2003/2004	Riego	Villagrán, Guanajuato
M <sub>12</sub>	Esperanza	O-I	2003/2004	Riego	Cortazar, Guanajuato
M <sub>13</sub>	Esperanza	O-I	2003/2004	Riego	Salvatierra, Guanajuato

Fuente: Impulsora Agrícola, S.A de C.V, 2004

O-I: Otoño-Invierno

P-V: Primavera-Verano

A las cuales se les realizaron las pruebas de contenido de humedad, germinación, vigor, peso seco, micobiota y micotoxinas presentes.

## **5.2. Análisis del contenido de humedad**

El contenido de humedad del grano se realizó por el método de secado en estufa, el cual consiste en pesar la materia seca y por diferencia de peso se calcula el contenido de humedad expresado en porcentaje, donde se elimina el agua del grano mediante el calor aplicado a la muestra (Moreno, 1996). Se pesaron por duplicado cajas de aluminio de 5 cm de diámetro y de 3 cm de altura a las cuales se les agregaron de 4 a 10 g de la muestra del grano en el fondo de la caja, posteriormente se volvieron a pesar las cajas y se registró el peso con tres cifras. Una vez determinado el peso, se destaparon las cajas y se metieron en la estufa de aire forzado modelo Blue M, a una temperatura de 130°C, por 20 horas, concluido el tiempo de secado las muestras fueron retiradas de la estufa y colocadas en un desecador durante 30 min para que se enfriaran y evitar que ganaran humedad. Al estar las muestras frías se procedió a pesarlas para posteriormente calcular el contenido de humedad por diferencia de peso. El cual fue expresado con base en el peso húmedo del promedio de tres repeticiones para cada una de las muestras analizadas, mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ CH} = A/B \times 100$$

en donde: % CH = Porcentaje del contenido de humedad

A = Pérdida de peso en gramos

B = Peso original de la muestra

## **5.3. Análisis de la prueba de vigor**

La prueba de vigor se realizó con 400 granos de cebada y se procedió de la siguiente manera, se colocaron 50 granos sobre toallas de papel tipo Anchor dobles, marcadas previamente en la parte media superior de la hoja con cinco líneas paralelas a una distancia entre ellas de 2 cm. En la línea central se pegaron los granos de cebada y

posteriormente se cubrieron con otra toalla húmeda de la misma forma. Las toallas se enrollaron y se humedecieron posteriormente, se introdujeron dentro de una bolsa de plástico perforada en sus esquinas, incubándose a una temperatura de 20 °C; se realizó la lectura a los 7 días, donde se evaluaron y contaron las plúmulas de plántulas normales, las plántulas anormales se eliminaron. Se procedió a obtener la longitud media de las plúmulas, alcanzada por las plántulas normales presentes en cada una de las muestras, mediante la siguiente fórmula:

$$L = \frac{(nx_1 + nx_2 + \dots + nx_n)}{25}$$

en donde: L = longitud media de la plúmula

n = número de plúmulas entre cada par de paralelas

x = la distancia media desde la línea central

#### **5.4. Análisis de germinación estándar**

La prueba de germinación se realizó con 400 granos de cebada y se procedió de la siguiente manera, se colocaron 50 granos sobre toallas de papel tipo Anchor dobles, se pegaron en una cinta masking tape los granos de cebada y posteriormente se cubrieron con otra toalla húmeda de la misma forma. Las toallas se enrollaron y se humedecieron posteriormente, se introdujeron dentro de una bolsa de plástico perforada en sus esquinas, incubándose a una temperatura de 20 °C; a los 4 y 7 días se realizaron lecturas del número de semillas germinadas, duras y muertas. El resultado se expresó en porcentaje de germinación.

### **5.5. Análisis de la prueba de peso seco**

La prueba de peso seco se determinó utilizando las plántulas obtenidas en la prueba de vigor, y consistió en separar la plúmula y la radícula de la cascarilla y cotiledón para posteriormente introducirlas en bolsas de papel estraza previamente perforadas para después proceder al secado de las plántulas en una estufa a una temperatura de 80°C por un periodo de 24 horas, posteriormente se obtuvo el peso seco de las muestras por diferencia de peso.

### **5.6. Determinación de micobiota**

Para la identificación de los hongos presentes en el grano de cebada a nivel de género se utilizó la técnica de siembra en placa de agar, se prepararon dos medios de cultivo el de papa-dextrosa-agar (PDA), para el aislamiento de hongos de campo, y medio de cultivo malta-sal-agar (MSA), para el aislamiento de hongos de almacén. Se hicieron 3 repeticiones por muestra con 100 granos cada una. Los granos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 3% durante un minuto, procediendo enseguida al secado del grano en toallas de papel previamente esterilizadas, a continuación se repartieron veinte granos por caja de Petri, las cajas fueron incubadas a una temperatura de 25°C en oscuridad por un periodo de 7 días, después de los cuales se aislaron e identificaron los hongos presentes en el grano de cebada a nivel de género. Los aislamientos obtenidos del género *Fusarium* se resembraron en medio de cultivo de papa-dextrosa-agar (PDA) y papa-sacarosa-agar (PSA) y se incubaron a 25°C durante 7 días, bajo ciclos de 12 horas de luz cercana a la ultravioleta (combinación de luz blanca fluorescente fría y luz negra fluorescente) y 12 horas de oscuridad, y se identificaron a nivel de especie siguiendo las claves de Booth (1971) y Nelson *et al.* (1983), basadas en criterios morfológicos. En el caso del género *Alternaria* se identificó a nivel de grupo de

acuerdo con Simmons y Roberts (1993) y Simmons (1999). Los grupos aislados de *Alternaria* se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo papa-zanahoria-agar (PZA) y se incubaron a 25°C durante 7 días en ciclos de 8 h de luz blanca fluorescente fría por 16 h de oscuridad. Con los datos obtenidos se procedió a calcular por cada ciclo de cultivo, la frecuencia de aislamiento y la densidad relativa de los géneros presentes, mediante el uso de las fórmulas empleadas por González *et al.* (1997).

Fórmula para frecuencia de aislamiento

$$\alpha = (\beta/\gamma) \times 100$$

en donde:  $\alpha$  = Frecuencia de aislamiento expresada en porcentaje

$\beta$  = Número de muestras con presencia de género

$\gamma$  = Número total de muestras

Fórmula para densidad relativa

$$\alpha = (\beta/\gamma) \times 100$$

en donde:  $\alpha$  = Densidad relativa expresada en porcentaje

$\beta$  = Número de aislamientos de un género o especie

$\gamma$  = Número total de hongos o géneros aislados

## 5.7. Determinación de micotoxinas

Las micotoxinas presentes de forma natural en los granos de las muestras de cebada fueron determinadas mediante las técnicas de Cromatografía de Capa Fina y Cromatografía de Inmunofinidad de Anticuerpos Monoclonales (VICAM, 1999). Realizando la prueba de Cromatografía de Capa Fina, en el Laboratorio de Micotoxinas del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, para la determinación de zearalenona, ocratoxina A y aflatoxinas mientras que la prueba de

Cromatografía de Inmunofluorescencia de Anticuerpos Monoclonales, para la determinación de deoxivalenol y de aflatoxinas, así como la prueba de Cromatografía de Capa Fina, para la determinación de alternarioses se realizaron en el Laboratorio de Micotoxinas de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas, del Centro de Asimilación Tecnológica, perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

#### **5.7.1. Método múltiple para la extracción de zearalenona, aflatoxinas y ocratoxinas, Eppley, (1968)**

##### **a) Procesamiento de las muestras**

Se procedió a la molienda de cada una de las muestras en un molino para granos Croydon Penna Modelo 4-E, cada muestra fue molida en cuatro ciclos, después cada muestra fue homogeneizada en una batidora Hobart modelo C-100 durante 15 min., posteriormente las muestras fueron guardadas en bolsas de papel estraza, con la finalidad de evitar riesgos de contaminación previo a la elaboración de las pruebas de extracción de las toxinas.

Para la determinación de micotoxinas por cromatografía de capa fina se utilizó el Método Múltiple para zearalenona, aflatoxinas y ocratoxinas, descrito por Eppley, (1968). Esta técnica ha sido parcialmente adoptada como primera acción oficial por la AOAC Internacional (1995) para determinar aflatoxinas (49.2.14), ocratoxinas y zearalenonas (49.8.01) en maíz, con una modificación que consiste en una partición líquido-líquido con hexano y acetonitrilo para eliminar lípidos y pigmentos del extracto, se realizó de la siguiente manera:

##### **b) Extracción**

Se sometieron 50 g de muestra previamente molida a un proceso de extracción con una mezcla realizada en un matraz Erlen-Meyer de 500 ml, con 25 ml de agua destilada, 25 g

de tierra de diatomeas (Hyflo Super-Cel), 250 ml de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), grado analítico. La mezcla se homogenizó en un agitador de acción de muñeca Burrel modelo 75 por 30 min, posteriormente la mezcla se pasó a través de un embudo con papel filtro aflautado S&S 588 para finalmente colectar 50 ml del filtrado.

### **c) Columna de cromatografía y concentración de toxinas**

La columna de cromatografía de gel de sílice se preparó utilizando un tubo de cromatografía de 22 x 300 mm; en cuyo extremo inferior se colocó a manera de filtro, fibra de vidrio, después se agregaron 5 g de sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), a continuación se agregó cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), aproximadamente hasta la mitad de la columna. Posteriormente se agregaron 15 g de sílica gel para columna de cromatografía E. Merck (Darmstadt) sílica gel 60, con tamaño de partícula 0.063 – 0.2 mm la cual fue previamente activada, se realizó la mezcla con una varilla de vidrio para dispersar y homogenizar la sílica gel. Después se agregaron 15 g de sulfato de sodio y finalmente 20 ml de cloroformo para el lavado de las paredes de la columna y tener tres capas en la columna –sulfato de sodio-sílica gel-sulfato de sodio- a través de las cuales se hizo pasar el filtrado de cada una de las muestras.

Después de pasar los primeros 50 ml colectados del extracto de la muestra a través de la columna de cromatografía se procedió a agregar 150 ml de hexano seguido de 150 ml de benceno, ambos solventes utilizados como medio de lavado del filtrado, fueron eluidos a máxima velocidad ( $10\text{-}20 \text{ ml min}^{-1}$ ) y luego desechados. La zearalenona fue eluída con 250 ml de solución de acetona/benceno (5/95 v/v) para obtener la primera fracción, esta fracción fue colectada en un matraz de bola y se evaporó a casi sequedad en un Rotavapor Brinkman Büchi 461 Water Both, evitando el calor excesivo ( $30^\circ\text{C}$ ) y concentrar la toxina. Se procedió a realizar un lavado de la columna con 150 ml de dietil-éter y se adicionó una solución de metanol-cloroformo (3/97 v/v), con la cual se obtuvo la

segunda fracción para la detección de la presencia de aflatoxinas, a esta fracción igualmente le fueron evaporados los solventes para concentrar la toxina. Por último se agregó a la columna una solución de ácido acético-benceno (1/9 v/v), para obtener la tercera fracción, la cual se utilizó para detectar la presencia de ocratoxina A, al igual que las fracciones anteriores, ésta fue sometida a evaporación de los solventes y concentración de la toxina.

Para la obtención de la zearalenona se procedió al lavado de cada matraz con 10 ml de cloroformo adicionado en tres fracciones, el lavado se realizó haciendo pasar el solvente, mediante agitación, por las paredes del matraz. Cada fracción se colectó en un vial previamente rotulado, a continuación se procedió a un segundo lavado con 5 ml de acetonitrilo repartido en dos fracciones, las cuales fueron depositadas en el mismo vial utilizado para el primer lavado.

Para la obtención de aflatoxinas y ocratoxina se realizó, el lavado de cada matraz, con 10 ml de cloroformo repartido en tres fracciones, las cuales fueron colectadas en su respectivo vial previamente rotulado, y se evaporaron los solventes de cada uno de los viales utilizados, en baño María en atmósfera de nitrógeno, esta última se utilizó con la finalidad de evitar que las toxinas presentes sufrieran un proceso de oxidación ocasionado por el calor aplicado durante la evaporación de los solventes. Los extractos concentrados se conservaron en congelación hasta su uso posterior.

#### **d) Cromatografía de capa fina**

Las fracciones de zearalenona fueron resuspendidas en 500 µl de solución benceno-acetona (95/5 v/v), las aflatoxinas en 500 µl de solución metanol-cloroformo (3/97 v/v), y las ocratoxinas en 500 µl de solución ácido acético-benceno (1/9 v/v), agitándose a alta velocidad, durante un minuto en un Vortex Super-Mixer.

Posteriormente se realizaron placas preliminares para aflatoxinas, zearalenona y ocratoxina A utilizando placas de gel sílice 60 (Merck, 20 x 20 cm y 0.25 mm de grosor, previamente activadas durante una hora a 105°C), a las que se les colocó sobre una línea imaginaria a una distancia de 2.5 cm del borde inferior de la placa, una alícuota de 10 µl de la solución de cada vial, más una alícuota de 10 µl de la misma solución a la cual se le adicionó una alícuota de 5 µl de un estándar de cada una de las toxinas (mezcla problema + patrón). En esta misma placa en su parte central se aplicaron alícuotas con tres diferentes concentraciones de estándar con una concentración conocida, con la finalidad de comparar mediante observación visual las diferencias entre los estándares y lo encontrado en las muestras problema analizadas.

Las placas se colocaron dentro de una cámara de desarrollo, no equilibrado y no saturado, utilizando un sistema de solventes específico para cada toxina, así, para zearalenona se preparó una solución ácido acético-benceno (5/45 v/v), para aflatoxina se preparó la solución acetona-benceno (5/45 v/v) y para ocratoxina se preparó la solución benceno-metanol-ácido acético (18/2/2 v/v/v). Las cámaras de desarrollo fueron colocadas dentro de una campana de extracción y tapadas para evitar la pérdida de los solventes por volatilización, así mismo la ventana de la campana fue cubierta durante el corrimiento de la placa para mantenerla en condiciones de oscuridad.

Las placas se desarrollaron dentro de las cámaras durante un espacio de tiempo de 30 a 40 minutos, luego de lo cual se sacaron y se dejaron secar a temperatura ambiente y oscuridad. Una vez que las placas se secaron se procedió a su observación, colocándolas dentro de una cabina de luz UV (Cromato-Vue modelo CC20 ultra-violet), con una longitud de onda larga (360 nm) y onda corta (260 nm), realizando la determinación de las micotoxinas por comparación visual de la fluorescencia entre las manchas problema y las manchas patrón.

### **5.7.2. Determinación de Alternarioles**

**a) Extracción:** se sometió 50 g de muestra previamente molida a un proceso de extracción, depositando la muestra en un vaso de licuadora y agregándole 75 ml de metanol, la extracción se realizó a alta velocidad durante un minuto. El extracto obtenido se hizo pasar a través de un embudo con papel filtro aflautado Whatman No. 1, del cual se colectaron los primeros 40 ml en una probeta de 100 ml.

**b) Dilución del extracto y concentración de toxinas:** a los 40 ml del extracto se les adicionó 80 ml de sulfato de amonio acuoso al 20%, la mezcla se homogenizó en un embudo de separación mediante agitación, por espacio de treinta segundos, liberando los gases generados a través de la válvula del embudo. Posteriormente se realizó la extracción de alternariol mediante dos ciclos de lavado con 5 ml de cloruro de metileno cada uno, obteniendo la separación de dos fases colectando la fase de la parte inferior del embudo en un vial, el líquido colectado fue evaporado a sequedad mediante baño María y bajo una atmósfera de nitrógeno. La fase acuosa sobrante (la cual se procedió a analizar con la finalidad de detectar monometil éter de alternariol y ácido tenuazóico) se colectó en un vaso de precipitados, para posteriormente acidificarla con 13.5 ml de ácido clorhídrico 1N (pH = 2), y se realizaron dos ciclos de lavado con cloruro de metileno de 25 ml cada lavado. A continuación se procedió a incorporar 30 ml de solución de bicarbonato de sodio al 5%, los extractos obtenidos se recibieron en un vaso de precipitados y se les ajustó el pH a un valor de 2 con 1 ml de ácido clorhídrico 1N, para posteriormente realizar dos ciclo de lavado de esta solución con 15 ml de cloruro de metileno cada lavado, por último se lavó la solución final con 25 ml de agua destilada. Una vez eliminada el agua, se procedió a evaporar a sequedad los extractos resultantes utilizando el Rotavapor modelo Heidolph y se guardaron a baja temperatura para su posterior utilización.

### **c) Cromatografía de capa fina:**

Las fracciones de alternariol, monometil éter de alternariol y ácido tenuazóico fueron resuspendidas en 500 µl de metanol y se agitaron a alta velocidad durante un minuto en un Vortex.

Posteriormente se realizaron las placas preliminares para alternariol, monometil éter de alternariol y ácido tenuazóico, utilizando placas de sílica gel 60 (Merck, 20 x 20 y 0.25 de grosor, previamente activadas durante una hora a 105 °C), a las cuales se les colocó sobre una línea imaginaria a una distancia de 2.5 cm del borde inferior de la placa, una alícuota de 60 µl de la solución de cada uno de los viales de las muestras, más una alícuota 5 µl de un estándar de concentración conocida, correspondiente a cada una de las toxinas analizadas (mezcla problema + el patrón). En la misma placa, pero en su parte central, se aplicaron alícuotas con tres diferentes concentraciones (3, 5 y 7 µl) de los estándares, con la finalidad de comparar, mediante observación visual, las diferencias entre los estándares y lo encontrado en las muestras analizadas.

Las placas se colocaron dentro de una cámara de desarrollo, no equilibrado y no saturado, utilizando para el caso de alternariol el sistema de solventes cloroformo-acetona (88/12 v/v), mientras que para monometil éter de alternariol y ácido tenuazóico se utilizó el sistema de solventes tolueno-etilacetato-ácido fórmico (60/30/10 v/v/v). Las cámaras de desarrollo fueron colocadas en el interior de una campana de extracción y fueron tapadas para evitar la pérdida de solventes por volatilización, así mismo la ventana de la campana fue cubierta durante el corrimiento de la placa, con la finalidad de mantener las mismas en condiciones de oscuridad.

Las placas se desarrollaron dentro de la cámara por espacio de 30 a 40 minutos, luego de lo cual se sacaron y dejaron secar a temperatura ambiente y oscuridad. Una vez que las placas se secaron se procedió a su observación, utilizando una lámpara de luz ultravioleta

con longitudes de onda larga (360 nm) y onda corta (260 nm), realizando la determinación de las micotoxinas por comparación visual de la fluorescencia, entre las manchas problema y las manchas patrón.

### **5.7.3. Método de cromatografía de inmunoafinidad de anticuerpos monoclonales**

Por medio de la técnica de columnas de inmunoafinidad de anticuerpos monoclonales se analizó la presencia de aflatoxinas y deoxinivalenol, ambas pruebas se realizaron por separado, de la siguiente manera.

#### **5.7.3.1. Determinación de aflatoxinas totales**

Para la determinación de aflatoxinas totales se procedió de acuerdo al método 991.31 de la AOAC (1995).

##### **a) Extracción**

Se utilizaron 50 g de muestra previamente molida en un proceso de extracción, depositando la muestra en un vaso de licuadora y adicionándole 5 g de cloruro de sodio (NaCl) y 100 ml de metanol al 80% (metanol/agua 80/20 v/v), se molió durante 1 minuto a alta velocidad. La mezcla obtenida se hizo pasar a través de un embudo con papel filtro aflautado Whatman No. 1, el filtrado resultante se colectó en una probeta de 100 ml.

##### **b) Dilución del extracto**

Se tomaron 10 ml del extracto filtrado y se adicionaron en un vaso de precipitados junto con 40 ml de agua destilada, se mezclaron ambos líquidos hasta homogenizarlos perfectamente. Posteriormente se pasaron 10 ml del filtrado diluido a través de la columna de afinidad Afla Test-P con anticuerpos monoclonales en una velocidad de 1-2 gotas por segundo. A continuación se pasaron 20 ml de agua destilada repartida en dos fracciones

iguales, a través de la columna a una velocidad de 2 gotas por segundo, con la finalidad de realizar lavados de la columna. Se eluyó en la columna de afinidad pasando 1 ml de metanol grado HPLC a través de la columna a una velocidad de 1-2 gotas por segundo, esta última fracción se colectó en un vial de vidrio, al cual se le agregó 1 ml del revelador AflaTest, el vial se colocó en un Vortex por aproximadamente 5 segundos con la finalidad de homogenizar la mezcla.

Por último se procedió a introducir el vial en el fluorómetro VICAM serie 4, el cual fue calibrado previamente con un vial estándar utilizado para la lectura de concentración de aflatoxinas. El vial con el filtrado se mantuvo en el fluorómetro durante un minuto, después de transcurrido este tiempo se tomó la lectura de la concentración de aflatoxinas la cual se reporta en  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Candlish *et al.*, 1991).

#### **5.7.3.2. Determinación de deoxinivalenol**

**a) Extracción:** se utilizaron 50 g de muestra previamente molida en un proceso de extracción, colocando la muestra en un vaso de licuadora y adicionando 5 g de cloruro de sodio (NaCl), además de 200 ml de agua destilada, mezclando durante un minuto a alta velocidad.

Posteriormente la mezcla resultante se vació en un embudo con papel filtro aflautado Whatman No. 1, del filtrado resultante se colectaron 10 ml y de este último se tomaron 6 ml, los cuales se pasaron a través de una columna DONtest™, posteriormente se realizaron dos lavados de la columna con agua destilada utilizando para cada uno 10 ml de agua a una velocidad de 1-2 gotas por segundo. Por último se eluyó la columna con 0.75 ml de metanol grado HPLC con una velocidad de 1-2 gotas por segundo, esta última fracción se colectó en un vial de vidrio.

A continuación se adicionaron 500 µl de metanol al vial, 500 µl de revelador A y 500 µl de revelador B, una vez realizada la mezcla en el vial, éste fue colocado en un Vortex por 5 segundos para homogenizarla y posteriormente introducirla en el fluorómetro VICAM serie 4, previamente calibrado con un vial estándar para la cuantificación de la concentración de deoxinivalenol. El vial con el filtrado se mantuvo en el fluorómetro durante un minuto, después de transcurrido este tiempo se tomó la lectura de la concentración de deoxinivalenol, la cual se reporta en  $\text{mg kg}^{-1}$ .

## **VI. Análisis estadístico**

La frecuencia de aislamientos de las colonias de hongos y la densidad relativa se calcularon de acuerdo con González *et al.* (1997).

Las medias obtenidas en las pruebas de calidad biológica del grano se sometieron a comparación estadística por el método de Tukey-Kramer con un  $\alpha = 0.05$ , en el paquete Instat Versión 3.0, de la Compañía Graph Pad.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a que los análisis de varianza para determinar la calidad biológica de las muestras de cebada presentaron diferencias significativas, fueron realizadas las comparaciones de medias utilizando la prueba de Tukey-Kramer ( $\alpha = 0.05$ ).

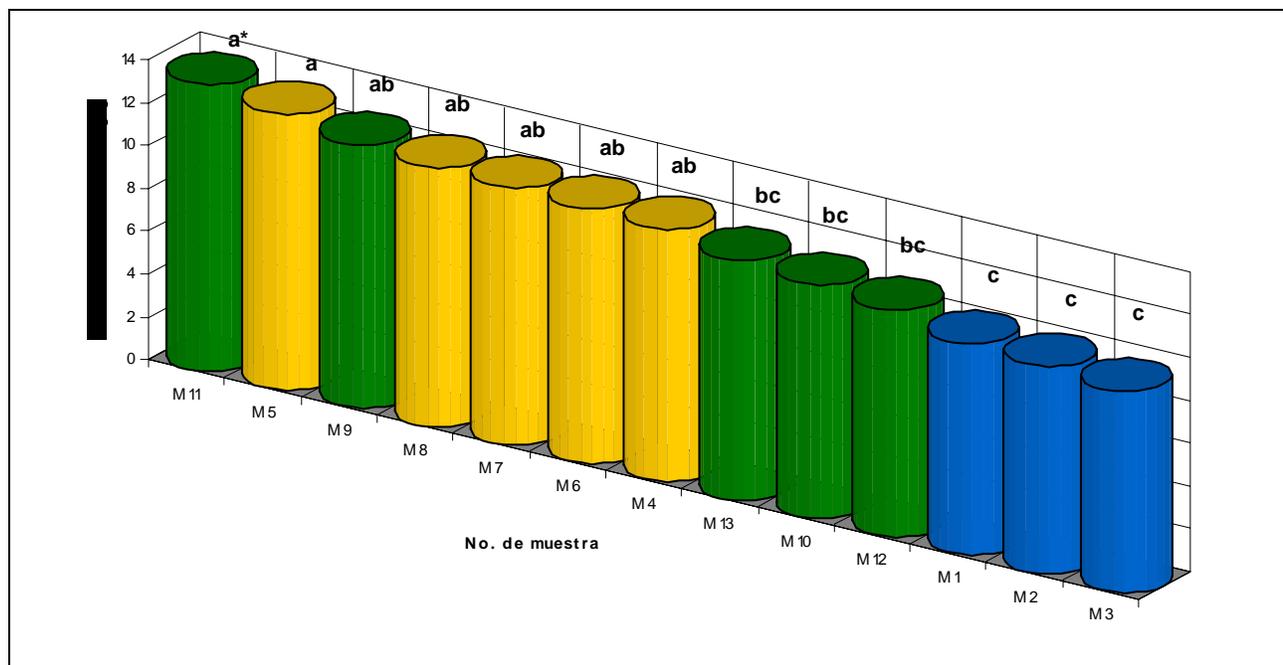
### 7.1. Análisis de la prueba del contenido de humedad de grano de cebada maltera

De acuerdo con lo señalado en la NMX-FF-O43-SCFI-2003, que establece el contenido de humedad en el grano de cebada maltera, cuyo estándar recomienda un mínimo de 11.5% y máximo de 13.5%, se observa en la Fig. 1 que las muestras  $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_3$  (9.9, 9.7, 9.4 %, respectivamente), ciclo 2002/2003, pertenecientes a la variedad Esperanza, son las únicas que se encuentran fuera de los límites permitidos; esto posiblemente se debió al tiempo (aproximadamente 18 meses) y condiciones de almacenamiento en las cuales se mantuvo el grano de cebada previo a la realización de la prueba. Estos contenidos de humedad inhibieron el desarrollo de hongos de campo, sin embargo, afectaron fisiológicamente al grano, reduciendo el vigor y la germinación, pudiendo afectar el proceso de malteado e industrialización de este grano. Es importante señalar que las muestras mencionadas anteriormente resultaron ser estadísticamente iguales a las muestras  $M_{13}$ ,  $M_{10}$  y  $M_{12}$ , además de que estas muestras corresponden a dos ciclos agrícolas diferentes.

En la prueba de contenido de humedad (Fig. 1) los resultados obtenidos indican que las muestras  $M_{11}$  (variedad Esperanza) y  $M_5$  (variedad Esmeralda) presentaron numéricamente el mayor porcentaje de contenido de humedad (13.4 y 12.9 %), sin embargo, no presentaron diferencia significativa con las muestras  $M_9$ ,  $M_8$ ,  $M_7$ ,  $M_6$  y  $M_4$ , caracterizándose estas muestras por pertenecer a dos ciclos agrícolas diferentes. Es importante señalar que el contenido de humedad puede variar dependiendo de las

condiciones de secado y de almacenamiento del grano. Por otro lado la muestra M<sub>11</sub>, presentó el máximo de contenido de humedad (13.4 %), acercándose al límite permitido por la NMX-FF-O43-SCFI-2003.

**Fig. 1 Determinación del contenido de humedad en grano de cebada maltera**



\*letras iguales no son significativamente diferentes Tukey-Kramer ( $\alpha = 0.05$ )

■ Ciclo agrícola 2002-2003    
 ■ Ciclo agrícola 2003    
 ■ Ciclo agrícola 2003-2004

Con respecto a los límites establecidos a nivel mundial se observó que de igual modo las muestras M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> (9.9, 9.7 y 9.4 %), se mantuvieron por debajo del límite permitido en Estados Unidos (12.0%). El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos permite un valor máximo de 13% siendo la muestra M<sub>11</sub> (13.4%) la única que rebasó el límite autorizado, basado en ello y de acuerdo a lo establecido por el Carlsberg Research Laboratory (Vaag, 2005), en la medida en que el contenido de humedad se incrementa

conjuntamente con la temperatura de almacenaje, el tiempo de almacenaje del grano de cebada tiende a disminuir y con ello, las características deseables del grano para su óptimo aprovechamiento en el malteado.

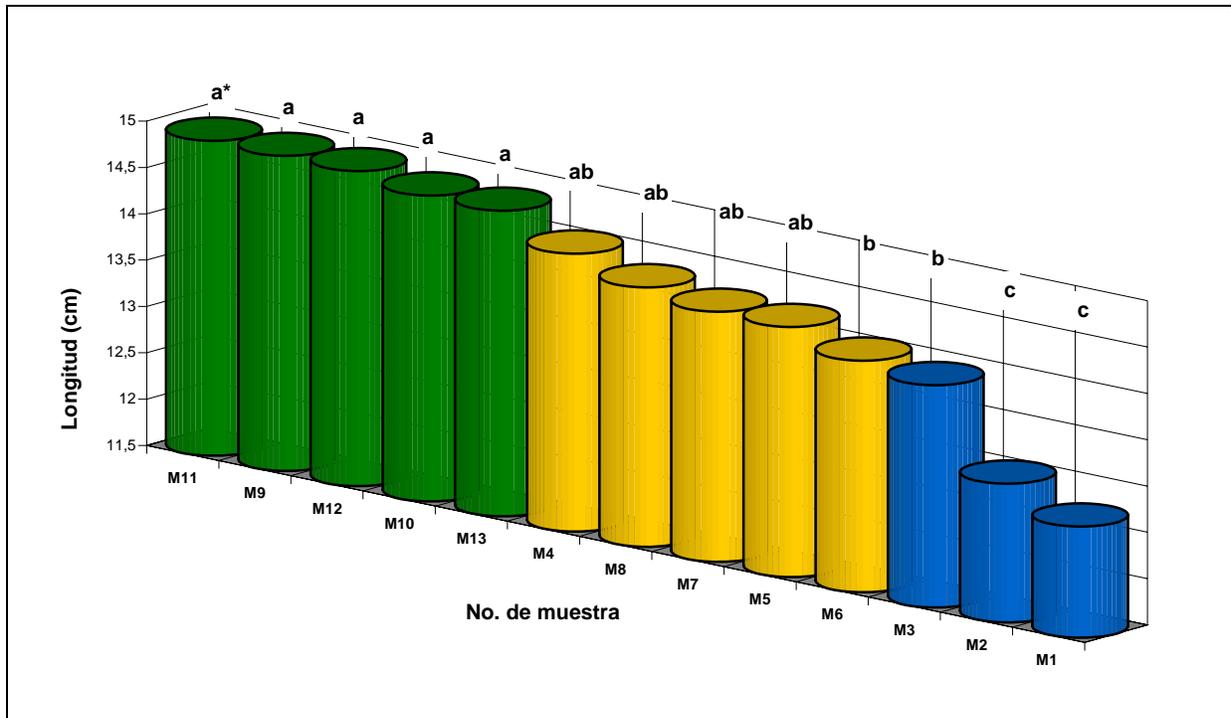
## **7.2. Análisis de la prueba de vigor de grano de cebada maltera**

En la prueba de determinación de vigor, el cual se expresó en longitud media de plúmula (Fig. 2), los resultados obtenidos indican que las muestras M<sub>9</sub>, M<sub>11</sub> y M<sub>12</sub> (ciclo agrícola 2003-2004), tuvieron la mayor longitud (14.9 cm.), sin embargo éstas no mostraron diferencia significativa con las muestras M<sub>10</sub>, M<sub>13</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>8</sub>, M<sub>7</sub> y M<sub>5</sub>, caracterizándose estas muestras por pertenecer a dos ciclos agrícolas diferentes. Las muestras M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> (ciclo agrícola 2002-2003) fueron las que presentaron valores más bajos en longitud de plúmula (12.7, 13.0 y 13.9 cm., respectivamente) y agrupan a muestras de un solo ciclo agrícola, así mismo éstas muestras resultaron ser las de menor porcentaje de contenido de humedad, demostrando que estos materiales mantenían un deterioro de sus características biológicas debido a que estuvieron almacenadas durante un mayor periodo de tiempo a diferencia del ciclo 2003-2004, los cuales muestran mayor vigor y menor tiempo de almacenamiento. Por otro lado, las muestras M<sub>6</sub> y M<sub>3</sub>, en donde se agrupan muestras de dos ciclos agrícolas diferentes, resultaron ser estadísticamente iguales a las muestras M<sub>4</sub>, M<sub>8</sub>, M<sub>7</sub> y M<sub>5</sub>, pero significativamente diferentes a las muestras M<sub>9</sub>, M<sub>11</sub>, M<sub>12</sub>, M<sub>10</sub>, M<sub>13</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>1</sub>.

En México no existen trabajos reportados o metodologías enfocadas a determinar el vigor del grano de cebada, mientras que en países como Estados Unidos, el vigor es expresado como el porcentaje de germinación que un determinado lote de semilla presenta.

En este trabajo se determinó el vigor en base a la prueba estandarizada para determinar el vigor en semillas de maíz (Moreno, 1996), en donde el vigor se expresa con base a la longitud alcanzada por la plántula en un periodo de siete días.

**Fig. 2 Determinación del vigor expresado en longitud de plúmula**



\*letras iguales no son significativamente diferentes Tukey-Kramer ( $\alpha = 0.05$ )

 Ciclo agrícola 2002-2003

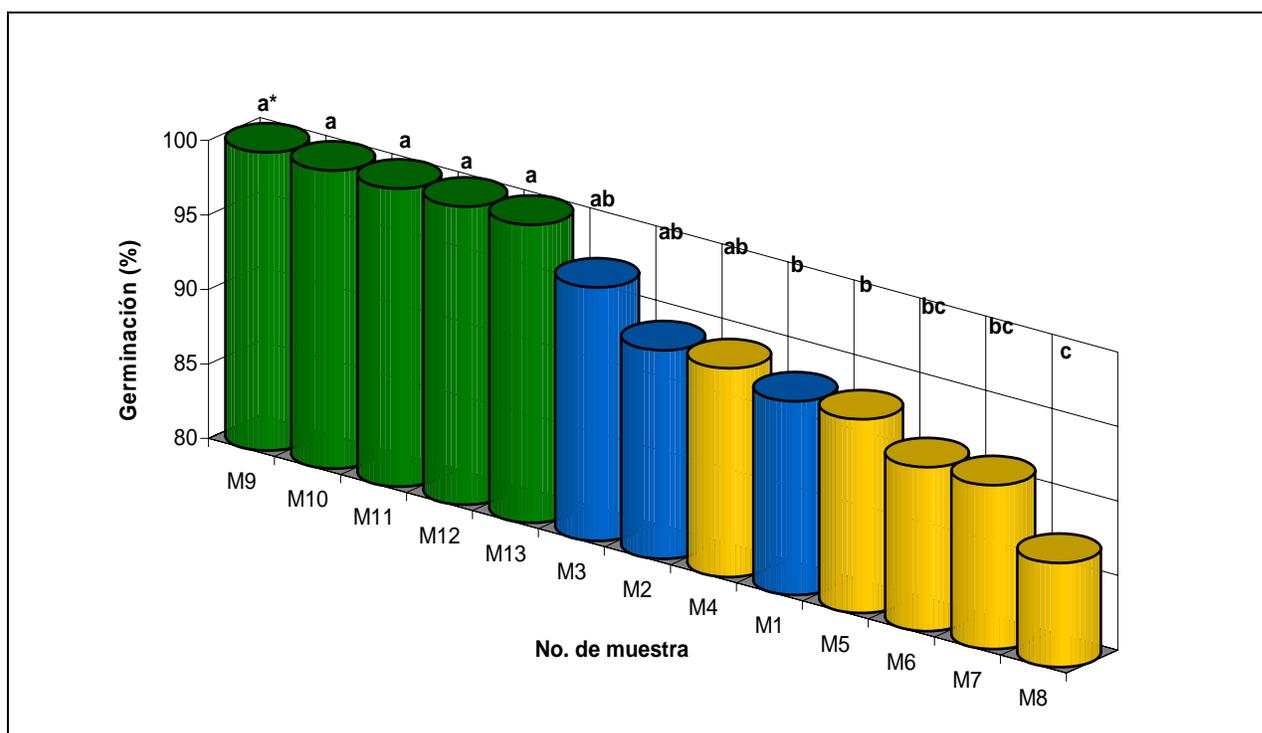
 Ciclo agrícola 2003

 Ciclo agrícola 2003-2004

### 7.3. Análisis de la prueba de germinación

En la prueba para determinar el porcentaje de germinación (Fig. 3) se observó que las muestras M<sub>9</sub>, M<sub>10</sub>, M<sub>11</sub>, M<sub>12</sub> y M<sub>13</sub> tuvieron el mayor porcentaje de germinación (100%), las cuales pertenecen a un mismo ciclo agrícola (2003-2004), además resultaron ser estadísticamente iguales a las muestras M<sub>3</sub>, M<sub>2</sub> y M<sub>4</sub>. La muestra M<sub>8</sub> resultó ser la que menor porcentaje de germinación presentó (87%) la cual fue estadísticamente igual a las muestras M<sub>6</sub> y M<sub>7</sub>, mientras tanto las muestras M<sub>1</sub> y M<sub>5</sub> resultaron ser significativamente diferentes de las muestras M<sub>9</sub>, M<sub>10</sub>, M<sub>11</sub>, M<sub>12</sub>, M<sub>13</sub> y M<sub>8</sub>, pero estadísticamente iguales a las muestras M<sub>3</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>6</sub> y M<sub>7</sub>.

**Fig. 3 Determinación de la germinación de grano de cebada maltera**



\*letras iguales no son significativamente diferentes Tukey-Kramer ( $\alpha = 0.05$ )

 Ciclo agrícola 2002-2003

 Ciclo agrícola 2003

 Ciclo agrícola 2003-2004

De acuerdo con la NMX-FF-O43-SCFI-2003, la cual establece un porcentaje mínimo de germinación para el grano de cebada maltera de 85%, todas las muestras analizadas están por arriba del límite establecido. Sin embargo, considerando el límite establecido en los Estados Unidos por la Malting Internacional Co., la cual establece un porcentaje de germinación mayor o igual al 95%, siete de las trece muestras analizadas, no cumplen con dicho límite, presentando una germinación por debajo de los límites exigidos en Estados Unidos.

Por otro lado y con respecto a lo establecido por el Carlsberg Research Laboratory (Vaag, 2005), la germinación del grano de cebada se encuentra relacionada a las condiciones presentes durante el periodo y lugar de almacenamiento (cuadro 5).

**Cuadro 5. Tiempo de almacenamiento del grano de cebada en relación con su contenido de humedad y la temperatura de almacén**

Temperatura °C	% de contenido de humedad				
	10	12	14	16	18
0	16 años	6 años	2 años	1 años	190 días
2	14 años	5 años	1.8 años	315 días	160 días
4	11 años	4 años	1.5 años	260 días	130 días
6	9 años	3 años	1.3 años	210 días	105 días
8	7.5 años	2.5 años	1 años	170 días	89 días
10	6 años	2 años	300 días	140 días	70 días
12	5 años	1.6 años	240 días	110 días	55 días
14	3.8 años	1.3 años	190 días	85 días	45 días
16	3 años	1 años	150 días	65 días	35 días
18	2.3 años	290 días	115 días	50 días	25 días
20	1.8 años	220 días	90 días	40 días	20 días
22	1.4 años	170 días	70 días	30 días	15 días
24	1 años	130 días	55 días	25 días	12 días
26	290 días	100 días	40 días	18 días	9 días
28	210 días	70 días	30 días	13 días	7 días
30	160 días	55 días	22 días	10 días	5 días

Fuente: Vaag, 2005.

Por lo tanto si se presentan condiciones inadecuadas de almacenamiento como puede ser grano con alto contenido de humedad y alta temperatura dentro del almacén, la germinación del grano tiende a decrecer progresivamente, a medida que el periodo de almacenamiento se incrementa, expresándose en la pérdida de las propiedades biológicas del grano y en particular en la capacidad de germinación.

En este caso, las muestras analizadas que mostraron los menores porcentajes de germinación coinciden con las que más tiempo se mantuvieron almacenadas, previamente a la realización de la prueba (ciclos agrícolas 2002-2003 y 2003).

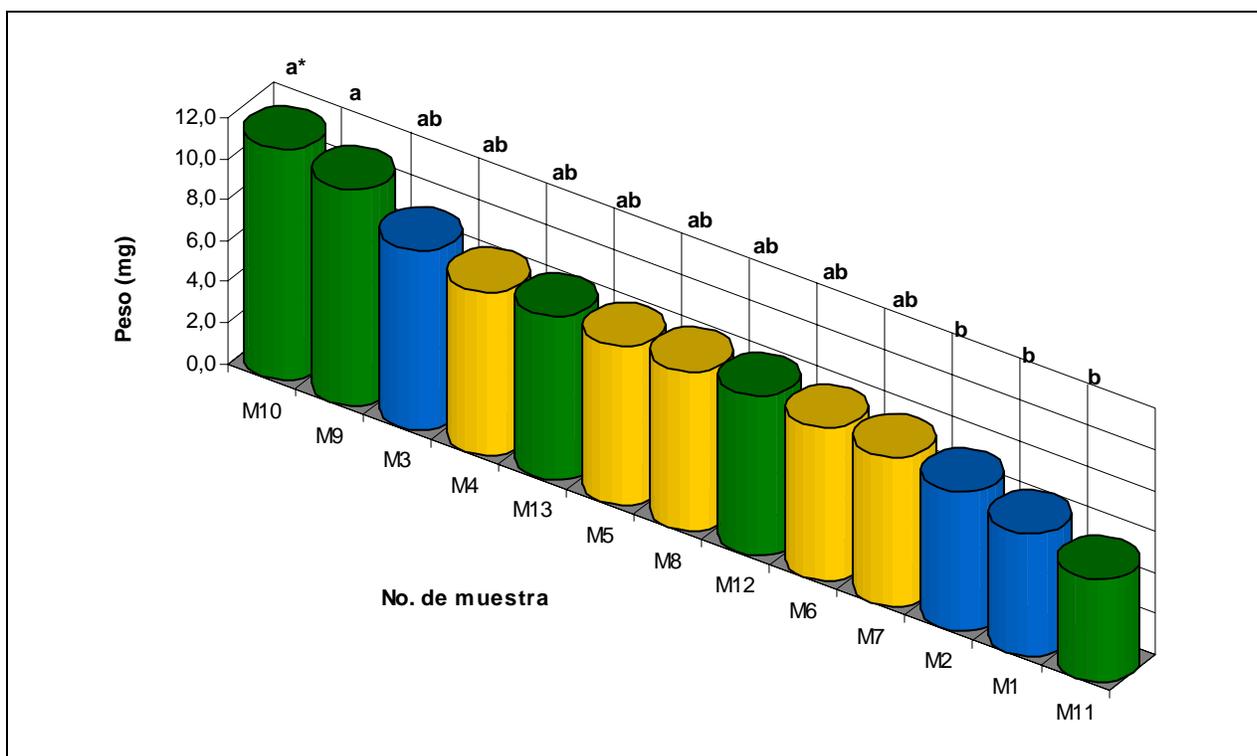
#### **7.4. Análisis de la prueba de peso seco**

En la prueba para determinar el peso seco (Fig. 4) las muestras  $M_{10}$  y  $M_9$  fueron las que mayor peso seco obtuvieron (11.3 y 10.5 mg, respectivamente), correspondiendo a la muestra  $M_{11}$  el menor peso seco (5.0 mg). Se observó que entre las muestras  $M_{10}$ ,  $M_9$ ,  $M_3$ ,  $M_4$ ,  $M_{13}$ ,  $M_5$ ,  $M_8$ ,  $M_{12}$ ,  $M_6$  y  $M_7$  no existe diferencia significativa, registrando todas ellas los mayores valores en cuanto a peso seco se refiere y agrupando a muestras procedentes de tres ciclos agrícolas diferentes. Mientras que las muestras  $M_2$ ,  $M_1$  y  $M_{11}$  presentaron diferencia significativa con respecto a las muestras anteriores, pues registraron los menores valores de peso seco, agrupando a muestras procedentes de dos ciclos agrícolas diferentes.

En México no se han reportado trabajos realizados para determinar el peso seco en cebada maltera, considerando que después de la germinación del grano la malta es secada para continuar con el proceso de elaboración de la cerveza, la realización de esta prueba puede aportar datos sumamente importantes, para que, en conjunto con el resto de las pruebas ya señaladas, se tengan evaluaciones mas completas acerca de las condiciones en las cuales el grano de cebada es procesado. Ya que los datos obtenidos

pueden servir como parámetro para determinar que lotes de grano y de que área productora, darán un mayor rendimiento en malta seca, utilizando esta última en la elaboración de cerveza, por ello es importante determinar que lotes de grano y de que área o ciclo agrícola expresaran un bajo rendimiento de malta seca y poder darles un tratamiento adecuado de manera que no se vea afectada la calidad y cantidad del producto final.

**Fig. 4 Determinación del peso seco de grano de cebada maltera**



\*letras iguales no son significativamente diferentes Tukey-Kramer ( $\alpha = 0.05$ )

 Ciclo agrícola 2002-2003

 Ciclo agrícola 2003

 Ciclo agrícola 2003-2004

## **7.5. Determinación de micobiota en medio de cultivo PDA y MSA**

### **7.5.1. Determinación de micobiota en medio de cultivo PDA**

En la prueba de determinación de los hongos presentes en cebada maltera, realizada en medio de cultivo PDA (Cuadro 6), se encontró que en el ciclo O-I 2002-2003 el género que predominó fue *Penicillium* con un total de 107 aislamientos, con una frecuencia del 33% y una densidad relativa del 66%, estos resultados también han sido reportados en muestras de cebada maltera en otros países (Haikara *et al.*, 1997, y Ackermann, 1998). Otros hongos determinados con menor número de aislamientos, fueron *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium* y *Epicoccum*, entre los más abundantes. Lo cual nos indica que estas muestras estuvieron sometidas a un periodo largo de almacenamiento y que además, posiblemente por el bajo contenido de humedad que presentaron (9.9 a 9.4 %), estaban almacenadas en temperatura baja desarrollándose *Penicillium*, ya que este género requiere contenidos de humedad del grano alrededor de 18 – 20 % en cereales para su desarrollo, sin embargo, Moreno (1996) menciona que estos hongos pueden crecer a temperaturas muy bajas, inclusive bajo cero (-2 °C). Es importante señalar que las especies de este género reducen el poder germinativo de las semillas almacenadas, además de producir micotoxinas.

En el ciclo P-V 2003 el género *Alternaria* fue el que presentó mayor número de aislamientos con 419, una frecuencia de aislamiento del 100% y una densidad relativa del 42%, estos resultados también fueron encontrados por otros autores (Haikara *et al.*, 1997, Lacey *et al.*, 1980, Gyllang *et al.*, 1981, y Ackermann, 1998). Otros hongos que tuvieron una presencia importante durante este ciclo agrícola fueron *Helminthosporium*, *Epicoccum* y *Fusarium*. Para el ciclo O-I 2003-2004 el género con mayor presencia fue *Alternaria* con 915 aislamientos, una frecuencia del 100% y una densidad relativa del 55%, mientras que

los hongos que tuvieron una presencia importante fueron *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* y *Fusarium*.

**Cuadro 6. Micobiota presente en granos de cebada maltera en medio de cultivo PDA**

Género	No. de aislamientos			Frecuencia de aislamiento			Densidad relativa		
				(%)			(%)		
	(a*)	(b**)	(c*)	(a*)	(b**)	(c*)	(a*)	(b**)	(c*)
<i>Absidia sp.</i>	0	4	0	0	25	0	0	0	0
<i>Alternaria sp.</i>	20	419	915	100	100	100	12	42	55
<i>Arthrinium sp.</i>	2	0	0	33	0	0	1	0	0
<i>Aspergillus sp.</i>	0	14	2	0	75	17	0	1	0
<i>Chaetomium sp.</i>	11	0	3	33	0	17	7	0	0
<i>Cladosporium sp.</i>	14	3	294	100	50	83	9	0	18
<i>Curvularia sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Epicoccum sp.</i>	5	151	328	100	100	100	3	15	20
<i>Fusarium sp.</i>	0	77	57	0	100	83	0	8	3
<i>Helminthosporium sp.</i>	1	309	59	33	100	100	1	31	4
<i>Mucor sp.</i>	0	7	1	0	50	17	0	1	0
<i>Nigrospora sp.</i>	0	2	14	0	25	50	0	0	1
<i>Penicillium sp.</i>	107	1	0	33	25	0	66	0	0
<i>Phoma sp.</i>	1	13	2	33	25	17	1	1	0
<i>Rhizopus sp.</i>	0	2	0	0	25	0	0	0	0
<i>Stemphylium sp.</i>	2	2	1	67	25	17	1	0	0
<i>Torula sp.</i>	0	0	0	0.0	0.0	0.0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>163</b>	<b>1004</b>	<b>1676</b>				<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

(a) Ciclo O-I 2002-2003

(b) Ciclo P-V 2003

(c) Ciclo O-I 2003-2004

\* Variedad Esperanza

\*\*Variedad Esmeralda

### 7.5.2. Determinación de micobiota en medio de cultivo MSA

En la determinación de los hongos presentes en grano de cebada maltera realizada en medio de cultivo MSA (Cuadro No. 7), se encontró que en el ciclo O-I 2002-2003, el género que mayor presencia tuvo fue *Epicoccum* con un total de 47 aislamientos, una

frecuencia del 100% y una densidad relativa del 33%, seguido en orden de importancia por los géneros *Cladosporium*, *Alternaria*, *Chaetomium* y *Penicillium*. Para el ciclo P-V 2003 el género que mayor presencia tuvo fue *Alternaria* con 691 aislamientos, una frecuencia de aislamiento del 100% y una densidad relativa del 64%, siguiéndole en orden de importancia por el número de aislamientos los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Helminthosporium* y *Epicoccum*. Para el ciclo O-I 2003-2004 el género que mayor presencia tuvo también fue *Alternaria* con 783 aislamientos, una frecuencia de aislamiento del 100% y una densidad relativa del 51%, siguiéndole en orden de importancia por el número de aislamientos los géneros *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium* y *Nigrospora*.

**Cuadro 7. Micobiota presente en granos de cebada maltera en medio de cultivo MSA**

Género	No. de aislamientos			Frecuencia de aislamiento			Densidad relativa		
				(%)			(%)		
	(a*)	(b**)	(c*)	(a*)	(b**)	(c*)	(a*)	(b**)	(c*)
<i>Absidia sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Alternaria sp.</i>	24	691	783	100	100	100	17	64	51
<i>Arthrinium sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus sp.</i>	2	234	9	33	100	33	1	22	1
<i>Chaetomium sp.</i>	23	0	0	33	0	0	16	0	0
<i>Cladosporium sp.</i>	27	9	459	100	50	83	19	1	30
<i>Curvularia sp.</i>	0	1	1	0	25	17	0	0	0
<i>Epicoccum sp.</i>	47	28	232	100	75	100	33	3	15
<i>Fusarium sp.</i>	0	57	20	0	100	50	0	5	1
<i>Helminthosporium sp.</i>	1	37	5	33	100	50	1	3	0
<i>Mucor sp.</i>	0	9	0	0	50	0	0	1	0
<i>Nigrospora sp.</i>	0	0	12	0	0	67	0	0	1
<i>Penicillium sp.</i>	18	8	0	33	75	0	13	1	0
<i>Phoma sp.</i>	1	0	1	33	0	17	1	0	0
<i>Rhizopus sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Stemphylium sp.</i>	0	2	2	0	25	17	0	0	0
<i>Torula sp.</i>	0	1	0	0	25	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>143</b>	<b>1077</b>	<b>1524</b>				<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

(a) Ciclo O-I 2002-2003

(b) Ciclo P-V 2003

(c) Ciclo O-I 2003-2004

\* Variedad Esperanza

\*\*Variedad Esmeralda

Agrupando el análisis realizado al grano de cebada en ambos medios de cultivo (PDA y MSA), se encontraron cinco de los diez géneros de cebada reportados en México por Hernández-Pérez (1998) y Gutiérrez-García (2000), como patógenos del cultivo de cebada, los cuales son *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.* y *Helminthosporium sp.* De los cuales, *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.* y *Fusarium sp.*, junto con *Penicillium sp.*, están reportados por Sanchis *et al.* (1993), Torres (1993), Carrillo (2003) y Rousseau (2004), como géneros que agrupan especies potencialmente productoras de micotoxinas en el grano de cebada. Así mismo, estos resultados coinciden con lo reportado con Gutiérrez-García (2000) en cuanto a la presencia de los géneros *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Phoma*, *Aspergillus* y *Penicillium*, quien señala a estos géneros como los más abundantes en el grano de cebada maltera. Estos resultados también coinciden con lo encontrado por Muñoz-Rodríguez (2001), Ramírez-Marchand (2003), Romero-Bautista (2004) y De la Rosa (2004), quienes aislaron a los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Helminthosporium* y *Penicillium*. El género *Helminthosporium* se identificó a nivel de especie encontrando a *Helminthosporium sativum* como la más abundante en las muestras analizadas (97%) y de *Helminthosporium speciferum* se obtuvieron pocos aislamientos (3%).

Por otra parte Rabie (1997) aisló más de treinta géneros del grano de cebada, mencionando a *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Epicoccum* y *Fusarium*, como los más importantes en función del número de aislamientos realizados, seguidos de *Chaetomium*, *Curvularia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phoma* y *Rhizopus*, estos últimos encontrados en menor proporción; estos géneros también fueron identificados en este trabajo.

Así mismo, Salas and Steffenson (1999), Moreno (2000), Olsson *et al.* (2002), Kosiak and Torp (2004), Medina *et al.* (2006), hacen mención de géneros como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, poniendo mayor énfasis en la presencia de *Fusarium*, en virtud de la importancia que las especies de este género tienen como posibles productoras de micotoxinas en el grano de cebada.

Por otro lado, de los géneros ya mencionados destacan *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Cladosporium sp.* y *Fusarium sp.* además de, *Penicillium sp.*, *Nigrospora sp.*, *Stemphylium sp.* y *Rhizopus sp.* reportados por Munar and Sebree (1997), Hippeli and Elstner (2001), Young (2001), Sarlin *et al.* (2005<sub>a</sub>) y Sarlin *et al.* (2005<sub>b</sub>), como géneros cuyas especies pueden sintetizar la hidrofobina, metabolito secundario asociado al “gushing” de la cerveza, más comúnmente conocido como la sobreproducción de espuma y el consecuente derramamiento del líquido inmediatamente después de abrir el envase. De los géneros ya mencionados se tuvo presencia de todos ellos en las muestras analizadas, lo cual sugiere, que el riesgo de presentar gushing en la producción de cerveza mexicana es muy alto, debido a las mínimas concentraciones de hidrofobinas necesarias para que se presente este problema.

### **7.5.3. Caracterización de los géneros de hongos aislados de cebada maltera**

Para la identificación de los hongos presentes en las dos variedades de cebada maltera analizadas en este trabajo, se consideró la macromorfología y micromorfología de las colonias de acuerdo a claves especializadas (Cuadro 8), así mismo en este cuadro se mencionan la enfermedad, distribución e importancia de cada uno de los géneros descritos.

**Cuadro 8. Características de los géneros de hongos aislados de granos de cebada maltera (*Hordeum vulgare* L.)**

Género	Enfermedad	Distribución	Importancia	Características morfológicas
<p><i>Alternaria</i> spp.</p>  <p>100x</p>	Manchas foliares	Cosmopolita	La mayoría de las especies son saprofitas y otras Patógenas débiles	<p>La colonia es generalmente gris oscura, pero también puede ser blanca, de color verde oliva, café o casi negro.</p> <p>Los conidióforos son de color café oscuro a oliváceo, se producen individualmente o en ocasiones, en pequeños grupos; pueden ser simples o ramificados.</p> <p>Los conidios de la mayoría de las especies saprofitas de <i>Alternaria</i> que se presentan en los cereales se desarrollan en cadenas, tienen forma de huevo u óvalo y a menudo se ahusan para formar un pico en el ápice. Son de color café oscuro, con paredes lisas ligera o marcadamente rugosas, con varios septos transversales y longitudinales u oblicuos.</p> <p>Los conidios de las especies de <i>Alternaria</i> tienen características morfológicas únicas, mediante las cuales se puede identificar fácilmente este género. No obstante, las similitudes entre las especies del género y la variabilidad de la forma, el tamaño y la septación de las esporas hacen muy difícil identificar cada especie.</p>
<p><i>Arthrinium</i> spp.</p> 	Ninguna	Cosmopolita	Saprofito común e invasor secundario	<p>La colonia en semilla inicialmente tiene abundante micelio aéreo blanco, que se vuelve gris a negro con la producción de grandes masas de conidios.</p> <p>Los conidióforos son hialinos, excepto por los gruesos septos transversales que suelen ser de color café purpúreo a café oscuro.</p>

(Continuación cuadro 8)

Género	Enfermedad	Distribución	Importancia	Características morfológicas
<i>Aspergillus spp.</i>	Pudriciones	Cosmopolita	<p>Principal agente causal del deterioro del maíz almacenado con un contenido de humedad superior al 15%. La sequía y las altas temperaturas favorecen la síntesis de aflatoxinas que son tóxicas para el ser humano y los animales, además de afectar el buen sabor del grano. La infección de la semilla puede reducir la germinación. Algunas especies se desarrollan en campo.</p>	<p>Los conidios a menudo se forman en grupos apretados a lo largo de los extremos de los conidióforos muy angostos. Los conidios son solitarios, lisos, unicelulares, oscuros, ovalados, a menudo achatados o esféricos; suelen tener una banda hialina alrededor del margen y están unidos por una conexión corta al conidióforo.</p> <p>La colonia en la semilla por lo general se expande y es de color verde amarillento muy claro, verde amarillento intenso, café oliváceo o café.</p> <p>Los conidióforos hinchados en el ápice producen numerosas células esporíferas (fiálides), con esporas en largas cadenas. Las cadenas conidiales típicamente son esféricas, hendidas en varias columnas mal definidas. Los conidióforos tienen paredes gruesas incoloras, lisas o rugosas. Los ápices son alargados cuando los conidios son jóvenes, y se vuelven luego subesféricos o esféricos. Puede haber una o dos series de células esporíferas (fiálides y esterigmas) según la especie. Los conidios son típicamente esféricos o subesféricos ostensiblemente lisos, ornamentados, a veces ovalados o en forma de pera al principio, forma que en ocasiones conservan. La producción de grandes cantidades de esporas que son esparcidas por el aire pueden provocar enfermedades respiratorias en el hombre y en los animales. Algunas especies son productoras de micotoxinas.</p>



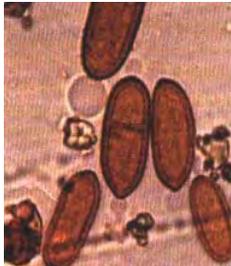
100x

(Continuación cuadro 8)

Género	Enfermedad	Distribución	Importancia	Características morfológicas
<i>Chaetomium</i> spp.	Ninguna	Cosmopolita	Saprofita común e invasor secundario	<p>La colonia en la semilla es blanca y el desarrollo del micelio varía de escaso a muy abundante.</p> <p>Se encuentran peritecios en la superficie de la semilla, bajo el micelio aéreo blanco. Los peritecios son esféricos o alargados, con un ostiolo y una pared celular membranosa oscura cubierta por vellos de diversos tipos.</p> <p>Las ascas son hialinas, generalmente en forma de garrote pero en algunos casos cilíndricas, contienen ocho ascosporas. Las ascosporas son unicelulares y generalmente en forma de limón; son expulsadas a través del ostiolo como una masa entre los pelos o como una columna, según las condiciones ambientales.</p> <p>La colonia de las especies de <i>Chaetomium</i> se pueden reconocer fácilmente por la presencia de peritecios con con muchos pelos oscuros y rígidos.</p> <p>En ocasiones las semillas con poca capacidad de germinación están muy contaminadas con <i>Chaetomium</i>.</p>
<i>Cladosporium</i> spp.	Pudriciones (Mohos negros)	Cosmopolita	Muchas especies saprofitas se encuentran comúnmente en las semillas	<p>La colonia en semilla se propaga extensamente o en ocasiones como pequeños puntos ,a menudo de color verde oliva, pero también algunas veces gris, amarillo parduzco claro, café o café negruzco oscuro, en grupos algodonosos, penachos o vellosa. Las colonias tienen un crecimiento relativamente lento y producen poco micelio aéreo, pero normalmente tienen una esporulación generosa. La semilla produce poblaciones densas de conidióforos.</p> <p>Los conidióforos están erguidos, de color café oliváceo pálido a café, ramificados irregularmente en el ápice.</p> <p>Los conidios se producen en cadenas en las ramificaciones de los conidióforos, son ovalados,</p>



40x



100x

(Continuación cuadro 8)

Género	Enfermedad	Distribución	Importancia	Características morfológicas
<i>Curvularia spp.</i>	Manchas foliares	Cosmopolita	Se le encuentra con frecuencia como parásito o saprofito del maíz y el trigo.	<p>cilíndricos u oblongos, con extremos redondeados, hialinos o de color café oliváceo a café, lisos o rugosos, unicelulares o con uno a tres septos. Las cadenas de conidios son muy frágiles y se rompen con facilidad. <i>Cladosporium</i> se caracteriza por los conidióforos pigmentados erectos, con cadenas ramificadas de conidios en cabezas dendroides. Este género a menudo se puede identificar por sus distintivos conidios en forma de limón, que tienen cicatrices de unión oscuras y bien marcadas y muestran una considerable variación en cuanto al tamaño y la septación según las distintas especies y también en una misma especie.</p> <p>La colonia se extiende disgregada sobre la semilla; es café, gris o negra, velluda, algodonosa o en forma de cojín.</p> <p>Las hifas son ramificadas, septadas, incoloras o café, lisas o con protuberancias rugosas. Los estromas a menudo son grandes, erguidos, negros, cilíndricos, a veces ramificados.</p> <p>Los conidióforos se presentan individualmente o en grupos, en forma terminal o lateral sobre las hifas, también sobre los estromas cuando están presentes; son de color café, septados, rectos o curvos, simples o ramificados.</p> <p>Los conidios se producen en el ápice o los lados del conidióforo. Los conidios son rectos o curvos, generalmente anchos en el medio y estrechos hacia los extremos, en forma de curva ovalada, huevo invertido</p>



100x

(Continuación cuadro 8)

Género	Enfermedad	Distribución	Importancia	Características morfológicas
<i>Epicoccum</i> spp.	Mancha roja del grano del maíz dulce	Cosmopolita	Efectos insignificantes; saprofito común e invasor secundario, <i>Epicoccum</i> en ocasiones es confundido con especies de <i>Fusarium</i>	<p>garrote o pera, ocasionalmente redondeados en la base o con un conspicuo punto de unión, tienen tres o más septos, lisos o rugosos y a menudo tienen una o más células centrales más grandes y más oscuras que las demás. Los conidios oscuros y ligeramente curvos, con células centrales más anchas y células terminales más pálidas, son típicos de las especies de <i>Curvularia</i>. La especie puede ser confundida visualmente con especies de <i>Drechslera</i> y <i>Bipolaris</i> de esporas pequeñas.</p> <p>La colonia en semilla crece con rapidez y suele mostrar una pigmentación amarilla, de color ámbar a anaranjado o rojo dentro del micelio compacto blanco, y en particular alrededor de éste.</p> <p>Los conidióforos son compactos y a veces ramificados, ralos, oscuros, lisos, cortos, se forman en grupos apretados formando un esporodoquio.</p> <p>Los conidios maduros son de color café oscuro a negro, en su mayoría esféricos pero también en forma de pera, septados irregularmente, y pueden estar marcados muy toscamente como una red. Las septas a menudo están ocultas por la gruesa y rugosa pared de la espora, que parece estar cubierta por protuberancias cortas. Los conidióforos comúnmente se presentan en oscuras masas en forma de cojín de tamaño variable dentro del micelio y sobre la superficie de éste.</p> <p>Las colonias de las especies de <i>Epicoccum</i> con frecuencia son de color variable y pueden existir varias coloraciones en una colonia los colores más frecuentes son el amarillo, el anaranjado y el rojo</p>



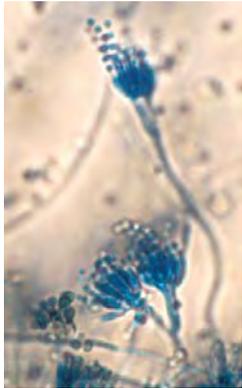
40x

(Continuación cuadro 8)

Género	Enfermedad	Distribución	Importancia	Características morfológicas
<p><i>Helminthosporium</i> spp.</p>  <p>40x</p>	<p>Punta negra del grano tizón de la plántula o pudrición común de la raíz.</p>	<p>Cosmopolita</p>	<p>Importante patógeno del trigo y otros cereales en zonas templadas</p>	<p>y en ocasiones el café y el verde. Cuando hay masas de esporas oscuras, pueden verse como arena negra salpicada sobre el micelio. Las esporas pueden ser confundidas con las esporas de los carbones y tizones.</p> <p>La colonia en semilla es de brillante color café oscuro a negro; está compuesta principalmente de masas densas de conidióforos y conidios. Los conidióforos son de color café claro a oscuro, cortos, erguidos, en La mayoría de los casos individuales, solitarios o en pequeños grupos, rectos o alternadamente doblados. Los conidios son curvos o rectos, de color café oliváceo oscuro, lisos, más anchos en el medio, con extremos redondeados y una nítida cicatriz dentro de la célula basal; la parte final de las células terminales es subhialina; tienen de 3 a 12 septos. Los conidios se ven negros y brillantes con un aumento bajo, pero, con aumento, son de color café oliváceo oscuro. Tienen paredes gruesas, pueden ser rectos o ligeramente curvos y tienen una característica forma de barril.</p>
<p><i>Nigrospora</i> spp.</p>  <p>100x</p>	<p>Pudriciones</p>	<p>Cosmopolita</p>	<p>Se presenta con frecuencia pero causa pérdidas menores, saprofito en los desechos vegetales en zonas cálidas.</p>	<p>La colonia en semilla inicialmente es blanca y los brillantes conidios negros se destacan por contraste, dando a las colonias una apariencia llamativa. En los cultivos más viejos, las hifas se oscurecen y con la abundante producción de conidios, las colonias se ven negras. Los conidióforos son cortos, inflados y de color café pálido, salen de la hifa en ángulo recto; producen conidios de manera individual en la parte terminal. Los conidios son de color café ahumado o negro azabache, esféricos o en forma de huevos. Los peritecios, formados en grupos de uno a</p>

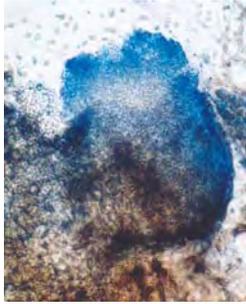
(Continuación cuadro 8.)

Género	Enfermedad	Distribución	Importancia	Características morfológicas
<i>Penicillium</i> spp.	Pudriciones	Cosmopolita	Se reduce la germinación y se produce tizón de las plántulas	<p>siete en series o en hileras irregulares, son esféricos u ovalados. Las ascas tienen pedicelos cortos y en forma de garrote. Las ascosporas son hialinas, granulares, curvas, se ahusan hacia la base y tienen extremos redondeados, son inicialmente unicelulares pero después de salir del asca, pueden desarrollar un septo transversal único que divide en forma desigual la espora en dos células.</p> <p>Los conidios son muy oscuros, ligeramente más largos en el eje horizontal, producidos en conidióforos de color café pálido, muy cortos y con una protuberancia característica.</p> <p>Las colonias en semilla tienen una tasa de crecimiento entre lenta y moderada. El micelio por lo general no es muy abundante, pero hay una abundante esporulación que da a la colonia una apariencia de cojín, comúnmente en un tono azul-verde.</p> <p>Los conidióforos generalmente son conspicuos, más o menos erguidos hialinos, rugosos o lisos, septados, con una serie de ramificaciones que le dan la estructura característica de un cepillo, con típicas fiáldes hialinas en forma de frasco que producen largas cadenas de conidios. Los conidios son unicelulares, esféricos u ovoides, lisos o rugosos y de color brillante, por lo general un tono de azul-verde.</p> <p>En algunas especies se forman esclerocios.</p> <p>Las colonias de <i>Penicillium</i> pueden ser confundidas con las de las especies de <i>Aspergillus</i>. No obstante las masas de esporas de <i>Penicillium</i> generalmente son azules-verdes y menos compactas. Los conidios de <i>Aspergillus</i> se producen en estructuras que parecen globos en lugar de escobas.</p>



40x

(Continuación cuadro 8)

Género	Enfermedad	Distribución	Importancia	Características morfológicas
<p><i>Phoma</i> spp.</p>  <p>20x</p>	<p>Pudriciones y enfermedades foliares</p>	<p>Cosmopolita</p>	<p>Puede presentarse como patógeno después de periodos prolongados de clima húmedo; se observa con frecuencia como invasor secundario</p>	<p>La colonia en la semilla tiene escaso micelio blanco o gris, pero produce grandes cantidades de picnidios de color café oscuro o negro en la superficie de la semilla.</p> <p>Los picnidios son casi esféricos, de color café oscuro, con paredes delgadas, de tamaño muy variable y con un conspicuo ostiolo protuberante.</p> <p>Los conidios son unicelulares, oblongos u ovalados, hialinos. Son liberados de los picnidios en un cirro curvo de color crema.</p> <p>Los picnidios de las especies de <i>Phoma</i> a menudo se desarrollan en colonias compactas y producen abundantes esporas.</p> <p>Los conidios unicelulares distinguen a las especies de <i>Phoma</i> de los hongos con picnidios del complejo <i>Septoria</i>.</p>
<p><i>Rhizopus</i> spp.</p>  <p>40x</p>	<p>Pudriciones</p>	<p>Cosmopolita</p>	<p>Produce pérdidas menores de poca importancia; puede ser importante entre las pudriciones de almacenamiento en condiciones de humedad y de temperatura elevadas</p>	<p>La colonia en la semilla se extiende con rapidez por medio de estolones con abundante micelio gris suelto. Los estolones producen numerosos esporangióforos de color café y rizoides.</p> <p>Los estolones son hialinos y se tornan de color café hacia los nudos, cerca de los cuales puede haber una septa. Los rizoides son cortos y de color café; a veces no existen.</p> <p>Los esporangióforos surgen individualmente o en pequeños grupos de los nudos de los estolones; son de color café, lisos o finamente rugosos, no septados.</p> <p>Los esporangios son esféricos, inicialmente blancos y más tarde negros, tienen numerosas esporas.</p> <p>Las esporangiosporas son amarillentas o de color café claro, esféricas u ovaladas, con estrías longitudinales.</p> <p>A menudo se le llama moho de alfiler porque los esporangios parecen cabezas negras de alfileres y están ampliamente entremezclados en el micelio algodonoso.</p>

(Continuación cuadro 8)

Género	Enfermedad	Distribución	Importancia	Características morfológicas
<i>Stemphylium</i> spp.	Moho negro	Cosmopolita	Saprofita común en materia vegetal muerta	<p>La colonia de <i>Stemphylium</i> en semilla es gris, café oliváceo o negro, en forma de cojín o algodonosa. Crece con bastante rapidez y ésta constituida por conidióforos y numerosos conidios de color café-negro.</p> <p>Los conidióforos son de color café oscuro, simples o a veces ramificados. Se forman oscuras protuberancias terminales sucesivas a medida que se producen en sucesión cada conidio nuevo.</p> <p>Los conidios son de color café oliváceo a oscuro, con tabiques horizontales, verticales y oblicuos; tienen forma rectangular u ovalada, están redondeados en los extremos, son lisos o rugosos.</p> <p>Los conidios más viejos son casi negros, muy rugosos.</p> <p>Los ascostromas son esféricos o algo achatados, negros. Las ascas son cilíndricas o en forma de garrote y tiene ocho ascosporas dispuestas en dos hileras.</p> <p>Las ascosporas son de color café amarillento claro u oscuro, en forma de garrote, con siete septas y tienen tabiques horizontales, verticales u oblicuos.</p> <p>Los conidios carecen del pico prominente que caracteriza a las especies de <i>Alternaria</i>.</p>
<i>Torula</i> spp.	Moho de hollín de la espiga del trigo	Cosmopolita	Saprofita común e invasor secundario	<p>En la semilla, el hongo produce pequeñas colonias compactas de color verde oliva, que pueden aglutinarse y que cuando son más viejas, suelen tornarse de color café.</p> <p>Hay pocos o ningún conidióforo, que no se distinguen con facilidad, con conidios que surgen más o menos directamente de las hifas vegetativas.</p> <p>Los conidios se producen en largas cadenas que se rompen en fragmentos de una o más células cuando maduran.</p> <p>Los conidios tienen forma de barril, con las células terminales redondeadas, tienen una superficie lisa o delicadamente rugosa y son de color café oscuro a negro. A menudo se produce la ramificación de la cadena en una célula esférica, que es más oscura y más notablemente espinosa que las otras.</p>



100x



40x

(Continuación cuadro 8)

<b>Género</b>	<b>Enfermedad</b>	<b>Distribución</b>	<b>Importancia</b>	<b>Características morfológicas</b>
				<i>Torula</i> se caracteriza por las cadenas simples o ramificadas de conidios oscuros, que se rompen con facilidad y que surgen más o menos de las hifas somáticas.

Fuente: Warham, *et al.*, 1996

Créditos de fotografía: Ma. Cristina Julia Pérez Reyes, UNIGRAS FES Cuautitlán, UNAM.

## 7.6. Determinación de especies del género *Fusarium*

### 7.6.1 Determinación de especies del género *Fusarium* aisladas del medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA)

Los resultados (Cuadro 9), muestran que para el ciclo O-I 2002-2003, no se aislaron especies de este hongo. En el ciclo P-V 2003 la especie *Fusarium equiseti* fue la más abundante con un total de 59 aislamientos, una frecuencia del 100% y una densidad relativa del 77%, otras especies identificadas fueron *F. sambucinum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* y *F. semitectum*. Para el ciclo O-I 2003-2004 *Fusarium poae* fue la especie predominante con 16 aislamientos con una frecuencia de aislamiento del 33% y una densidad relativa del 28%, seguido en orden de importancia respecto del número de aislamientos por *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. oxysporum*, como las especies más abundantes.

**Cuadro 9. Especies de *Fusarium* presentes en granos de cebada maltera en medio de cultivo PDA**

Especie	No. de aislamientos			Frecuencia de aislamiento			Densidad relativa		
				(%)			(%)		
	(a*)	(b**)	(c*)	(a*)	(b**)	(c*)	(a*)	(b**)	(c*)
<i>F. crookwellense</i>	0	3	1	0	25	33	0	4	2
<i>F. culmorum</i>	0	3	7	0	50	17	0	4	12
<i>F. dimerum</i>	0	0	1	0	0	17	0	0	2
<i>F. equiseti</i>	0	59	14	0	100	50	0	77	25
<i>F. graminearum</i>	0	3	7	0	25	17	0	4	12
<i>F. lateritium</i>	0	0	2	0	0	17	0	0	4
<i>F. oxysporum</i>	0	3	6	0	50	33	0	4	11
<i>F. poae</i>	0	0	16	0	0	33	0	0	28
<i>F. sambucinum</i>	0	4	3	0	25	17	0	5	5
<i>F. semitectum</i>	0	2	0	0	25	0	0	3	0
Total	0	77	57				0	100	100

(a) Ciclo O-I 2002-2003

(b) Ciclo P-V 2003

(c) Ciclo O-I 2003-2004

\* Variedad Esperanza

\*\*Variedad Esmeralda

### 7.6.2. Determinación de especies del género *Fusarium* aisladas del medio de cultivo malta sal agar (MSA)

Los resultados (Cuadro 10) muestran que en el ciclo O-I 2002-2003 no se aislaron especies del género *Fusarium*. Para el ciclo P-V 2003 la especie que predominó fue *F. equiseti* con 40 aislamientos, una frecuencia de aislamiento del 75% y una densidad relativa del 70%, siguiéndole en orden de importancia por el número de aislamientos realizados *F. oxysporum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. sambucinum*. Para el ciclo O-I 2003-2004 la especie predominante fue *Fusarium oxysporum* con 14 aislamientos, una frecuencia de aislamiento del 17% y una densidad relativa del 70%, otras especies aisladas fueron *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. poae* y *F. sambucinum*.

Los hongos *F. graminearum* y *F. culmorum*, también fueron encontrados en cebada por Sweeney and Dobson (1998), Olsson *et al.* (2002) y Ramírez-Marchand (2003), asociadas a la síntesis de deoxinivalenol, además de ser consideradas como patógenos comunes en grano pequeño.

Rabie (1997) aisló diez especies del género *Fusarium* en grano de cebada, de las cuales cinco de ellas están reportadas como toxígenas, estos resultados coinciden con las especies encontradas en este estudio: *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. poae* y *F. sambuncinum*.

En un trabajo realizado por Ramírez-Marchand (2003) aisló catorce especies del género *Fusarium*, de las cuales seis también fueron aisladas en este trabajo; destaca *F. lateritium*, ya que es el único autor en la literatura consultada que menciona haberla aislado. Además de que esta especie poco común está reportada por Marasas *et al.* (1984), como toxígena. Así mismo Gutiérrez-García (2000) aisló en cebada nueve especies del género *Fusarium*, cinco de las cuales (*F. graminearum*, *F. sambucinum*, *F. dimerum*, y *F. equiset*) coinciden con nuestros resultados.

**Cuadro 10. Especies de *Fusarium* presentes en granos de cebada maltera en medio de cultivo MSA**

Especie	No. de aislamientos			Frecuencia de aislamiento			Densidad relativa		
				(% )			(% )		
	(a*)	(b**)	(c*)	(a*)	(b**)	(c*)	(a*)	(b**)	(c*)
<i>F. crookwellense</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. culmorum</i>	0	3	0	0	25	0	0	5	0
<i>F. dimerum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. equiseti</i>	0	40	1	0	75	17	0	70	5
<i>F. graminearum</i>	0	1	0	0	25	0	0	2	0
<i>F. lateritium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>F. oxysporum</i>	0	12	14	0	50	17	0	21	70
<i>F. poae</i>	0	0	1	0	0	17	0	0	5
<i>F. sambucinum</i>	0	1	1	0	25	17	0	2	5
<i>F. semitectum</i>	0	0	3	0	0	17	0	0	15
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>57</b>	<b>20</b>				<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

(a) Ciclo O-I 2002-2003

(b) Ciclo P-V 2003

(c) Ciclo O-I 2003-2004

\* Variedad Esperanza

\*\*Variedad Esmeralda

Agrupando los resultados obtenidos de los aislamientos realizados en los medios de cultivo PDA y MSA y la posterior resiembra en medio de cultivo PSA (papa-sacarosa-agar), se identificaron diez especies del género *Fusarium*, de las cuales *F. equiseti*, resultó ser la que mayor número de aislamientos registró, seguida de *F. oxysporum* y de *F. poae*, estando todas ellas reportadas por Marasas *et al.*(1984), como productoras de toxinas tales como la zearalenona y deoxinivalenol, principalmente, (Cuadro 11).

Se observó que en los casos en que es reportada la presencia de especies del género *Fusarium*, existe una similitud en al menos cinco especies, además de que en todos los casos estas se encuentran reportadas como toxígenas, en el caso de este estudio se puede afirmar

que las especies aisladas efectivamente son capaces de sintetizar deoxinivalenol, sobresaliendo el caso particular de las muestras correspondientes al ciclo agrícola 2002-2003, que a pesar de encontrarse libres de la presencia de *Fusarium*, mantuvieron importantes concentraciones de deoxinivalenol.

**Cuadro 11. Características de la macromorfología y micromorfología de las especies de *Fusarium* identificadas en cebada maltera de riego y temporal**

<b>Especie</b>	<b>Conidios</b>	<b>Conidióforo</b>	<b>Clamidosporas</b>	<b>Estado perfecto</b>	<b>Morfología de la colonia</b>	<b>Características distintivas</b>
Sección EUPIONNOTES <i>F. dimerum</i> Penzig	Microconidios ausentes, macroconidios abundantes pequeños con uno o dos septos	Simple, las monofálides son ramificadas	Presentes pero muy escasas	No se conoce	En PDA es de lento crecimiento. La colonia es de varios colores del blanco a naranja, aunque generalmente color beige. El reverso de la colonia generalmente del mismo color que en el anverso.	Es estable en el medio de cultivo. Es cosmopolita.
						
Sección SPOROTRICHELLA <i>F. poae</i> (Peck) Wollenw	Microconidios abundantes globosos u ovals, macroconidios son generalmente raros con tres a cinco septos con una célula basal en forma de pie	Simple; las monofálides son ramificadas; microconidióforos cortos y anchos.	Escasas, se presentan en grupos o en cadenas	No se conoce	En PDA el crecimiento es rápido, con micelio aéreo denso el cual es de color blanco a rosado. Los esporodocios se presentan rara vez. El reverso de la colonia es de color rojo carmín.	Abundante producción de microconidios en en las monofálides. Es estable en el medio de cultivo. Es cosmopolita. Se ha reportado como especie tóxigena.
						

(Continuación cuadro 11)

Especie	Conidios	Conidióforo	Clamidosporas	Estado perfecto	Morfología de la colonia	Características distintivas
<p>Sección <i>ARTHROSPORIELLA</i> <i>F. semitectum</i> Berk. &amp; Rav</p> 	<p>Los microconidios son escasos; los macroconidios se originan de dos maneras, unos formados en el micelio aéreo y otros en esporodoquios, en ambos casos son delgados y curvados.</p>	<p>Simple, con monofiálides y polifiálides ramificadas</p>	<p>Presentes</p>	<p>No se conoce</p>	<p>Crece rápido en PDA con micelio aéreo denso el cual es de color marrón a café. Los esporodoquios pueden estar presentes o ausentes y son de color anaranjado. El reverso de la colonia puede presentar varios colores desde el marrón hasta el café puede presentar algunos moteados de color oscuro, rara vez es de color rojo carmín.</p>	<p>Se caracteriza por la presencia de polifiálides en el micelio aéreo y por la forma ahusada de los macroconidios formados en el micelio aéreo. Es cosmopolita. Esta reportada como especie toxígena.</p>
<p>Sección <i>GIBBOSUM</i> <i>F. equiseti</i> (Corda) Sacc.</p> 	<p>Cuando se presentan los microconidios pueden formarse en el micelio aéreo son de forma oval o en forma de coma. Los macroconidios son marcadamente septados con una curvatura en forma de hoz. La célula apical es muy alargada la cual se curva hacia adentro, mientras que la célula basal es en forma de pie</p>	<p>Simple; las monofiálides son ramificadas</p>	<p>Abundantes, con paredes rugosas son producidas en grupos o en cadenas</p>	<p><i>G. intricans</i> Wollenw.</p>	<p>Crecimiento rápido en PDA con micelio aéreo abundante el cual es blanco al principio, y después café en los cultivos más viejos. El reverso de la colonia varía de color marrón a café con algunos moteados de color marrón, en ocasiones puede ser de color rojo.</p>	<p>Los macroconidios se distinguen por presentar la célula apical alargada y por la célula basal en forma de pie. Es cosmopolita. Esta reportada como especie toxígena.</p>

(Continuación cuadro 11)

Especie	Conidios	Conidióforo	Clamidosporas	Estado perfecto	Morfología de la colonia	Características distintivas
<p>Sección <b>DISCOLOR</b> <i>F. sambucinum</i> Fuckel</p> 	<p>Microconidios generalmente ausentes; macroconidios cortos y gruesos distintivamente septados con pared celular gruesa, fuertemente curvados en su superficie ventral y dorsal. La célula basal en forma de pie</p>	<p>Simple; las monofiálides son ramificadas</p>	<p>Generalmente son abundantes, se forman solas en cadena o en grupo.</p>	<p><i>G. pulicaris</i> (Fr.) Sacc.</p>	<p>Crecimiento rápido en PDA con o sin micelio aéreo, cuando el micelio aéreo se presenta, es de color blanco marrón o rosado a café rojizo. Puede presentar esporodoquios de color azul, crema, marrón o naranja. El reverso de la colonia puede presentar varios colores, siendo más frecuente el rojo carmín, pero también puede ser marrón o café.</p>	<p>Es cosmopolita. Esta reportada como especie toxígena.</p>
<p>Sección <b>DISCOLOR</b> <i>F. culmorun</i> (W.G. Smith) Sacc.</p> 	<p>Microconidios ausentes; macroconidios gruesos marcadamente septados con pared celular gruesa, superficie ventral y dorsal curvada. La célula basal en forma de pie o ligeramente con una muesca</p>	<p>Simple; las monofiálides son ramificadas</p>	<p>Generalmente abundantes se presentan más frecuentemente solas, aunque también en cadenas o grupos.</p>	<p>No se conoce</p>	<p>Crecimiento rápido en PDA con micelio aéreo abundante generalmente blanco pero también puede presentar color amarillento a marrón hacia la base de la colonia. Puede presentar esporodoquios anaranjados a rojo marrón en cultivos viejos. El reverso de la colonia es generalmente de color rojo carmín.</p>	<p>Es relativamente estable en el medio de cultivo. Es cosmopolita. Esta reportado como especie toxígena.</p>

(Continuación cuadro 11)

Especie	Conidios	Conidióforo	Clamidosporas	Estado perfecto	Morfología de la colonia	Características distintivas
<p>Sección DISCOLOR <i>F. graminearum</i> Schwabe</p> 	<p>Microconios ausentes; macroconidios marcadamente septados con la pared celular gruesa. Célula basal en forma de pie, la célula apical en forma de cono. La superficie ventral es menos curvada que la superficie dorsal.</p>	<p>Simple; las monofiálides son ramificadas</p>	<p>Generalmente se forman muy lento en el medio de cultivo. Cuando éstas se presentan se forman con más frecuencia en los macroconidios pero también pueden observarse en el micelio.</p>	<p><i>G. zeae</i> (Schw) Petch</p>	<p>Crecimiento rápido en PDA con micelio aéreo abundante, el cual es frecuentemente amarillo a marrón con los márgenes blancos a rojo carmín. Puede presentar esporodoquios de color rojo marrón a anaranjado, los cuales cuando se presentan están esparcidos en el medio, principalmente si los cultivos tienen más de 30 días de edad. El reverso de la colonia es usualmente de color rojo carmín.</p>	<p>Es relativamente estable en el medio. Es cosmopolita. Esta reportada como especie toxígena.</p>
<p>Sección DISCOLOR <i>F. crookwellense</i> Burgess, Nelson &amp; Toussoun</p> 	<p>Microconidios ausentes; macroconidios marcadamente septados con pared celular gruesa. Con la superficie ventral menos curvada que la superficie dorsal, la cual es marcadamente curvada. La célula basal en forma de pie, la apical es marcadamente estrecha en la punta.</p>	<p>Simple las monofiálides son ramificadas</p>	<p>Presentes, se forman en las hifas y en los macroconidios.</p>	<p>No se conoce</p>	<p>Crecimiento rápido en PDA con micelio aéreo abundante, inicialmente de color blanco y luego de color marrón. Forma esporodoquios de color café rojizo, por lo general aparecen en el centro del cultivo y después en otras porciones del mismo. El reverso de la colonia es de color carmín.</p>	<p>Es poco estable en el medio de cultivo. Es cosmopolita. Esta reportada como especie toxígena.</p>

(Continuación cuadro 11)

Especie	Conidios	Conidióforo	Clamidosporas	Estado perfecto	Morfología de la colonia	Características distintivas
Sección <b>LATERITIUM</b> <i>F.lateritium</i> Ness	 <p>Microconidios ausentes o esparcidos en algunos aislamientos, pero en otros suelen ser abundantes, de forma elipsoidal de huso o agrupados, de cero a tres septos. Macroconidios abundantes generalmente de forma cilíndrica con la superficie ventral y dorsal paralelas. Célula basal en forma de pie, la célula apical en forma de pico o anzuelo.</p>	Simple; las monofiálides son ramificadas	Presentes. Formadas de manera individual o en cadena.	<i>G. baccata</i> (Wallr.) Sacc.	De crecimiento lento en PDA con micelio aéreo esparcido. Esporodoquios generalmente abundantes y usualmente de color naranja. Los cultivos frecuentemente son rojo carmín en ambas caras. Pero también pueden ser de color blanco a rosado en el anverso y de varios colores como naranja a marrón en el reverso.	Es generalmente estable en el medio de cultivo. Es frecuente en plantas leñosas. Esta reportada como especie toxígena.
Sección <b>ELEGANS</b> <i>F. oxysporum</i> Schlecth. Emed. Snyder & Hans.	 <p>Microconidios abundantes, generalmente unicelulares de forma oval a reniforme se producen en falsas cabezas. Macroconidios abundantes con ligera forma de hoz, con pared celular delgada, con la célula apical atenuada y la célula basal en forma de pie.</p>	Simple; las monofiálides son ramificadas y aquella en las cuales se producen los microconidios son cortas	Presentes, de manera individual o bien en pares. En algunos cultivos éstas se forman en la parte interna del medio.	No se conoce	Crecimiento rápido en PDA con micelio aéreo abundante, el cual puede teñir de color púrpura el medio de cultivo al invadirlo. Cuando los esporodoquios son abundantes estos son de color crema a marrón o bien de color naranja. El reverso de la colonia puede ser de varios colores que van desde azul oscuro a rojo oscuro.	Presencia de clamidosporas y de microconidios en falsas cabezas en monofiálides cortas. Esta especie cuenta con razas o formas especiales muestran gran diversidad en PDA. Es cosmopolita. Esta reportada como especie toxígena.

Créditos de fotografía: Ma. Cristina Julia Pérez Reyes, UNIGRAS FES Cuautitlán, UNAM.

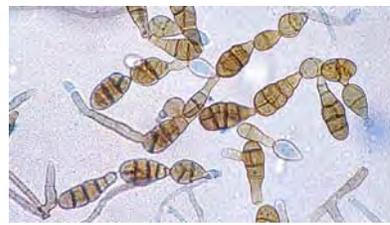
De acuerdo con Marasas, *et al.* 1984

### 7.6.3. Determinación del género *Alternaria* en grano de cebada maltera

El género *Alternaria* se solía dividir en tres secciones de acuerdo a la formación de cadenas de conidios y de las dimensiones de tales cadenas. Posteriormente se tomó en cuenta el aspecto de los conidióforos y se les reunió en tres secciones que abarcan seis grupos de especies en base a la morfología sobre medio de cultivo Papa-Zanahoria-Agar (PZA), a 25°C con alternancia de luz-oscuridad (8/16 hrs. respectivamente). Las características distintivas de los grupos encontrados se mencionan en el cuadro 12, (Carrillo, 2003, Simmons and Roberts, 1993).

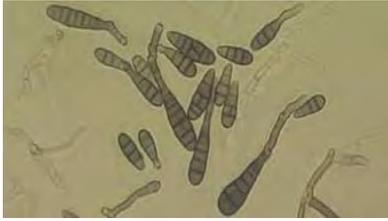
El género *Alternaria* identificado a nivel de grupo morfológico en este trabajo fue de 58% de *Alternaria tenuissima* especie representante del grupo 1, 14 % de *Alternaria arborescens*, especie representativa del grupo 3, 17% de *Alternaria alternata* especie representante del grupo 4 y 11% de *Alternaria infectoria* especie representativa del grupo 6.

**Cuadro 12. Macromorfología y micromorfología de *Alternaria***

Grupo/especie representativa	Características
<p>(1) <i>Alternaria tenuissima</i> (Ness: Fries) Wiltshire</p> 	<p>Produce cadenas rectas relativamente largas de esporas formadas sobre cortos conidióforos primarios, pero ocasionalmente hay una ramificación corta sobre un conidióforo secundario formado en la base de la cadena desde una célula intercalar del conidio. En el medio de cultivo la cadena tiene una posición erguida, vertical.</p>
<p>(4) <i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keissler</p> 	<p>Produce cadenas de diez o más conidios muy ramificadas a partir de conidióforos cortos. La ramificación de los conidios surge de conidióforos secundarios desde células conidiales basales o apicales dando un aspecto abierto. Las cadenas aparecen en el medio de cultivo como manojos densos y aislados.</p>

(6) *Alternaria infectoria*

Fuckel



Se caracteriza por largos conidióforos secundarios apicales, con varios sitios conidiógenos, lo que resulta en una ramificación abierta. Los conidióforos primarios son cortos y se producen en manojos dando al cultivo un aspecto granular. La forma de los conidios el color y la superficie de la colonia varía dentro de este grupo de especies.

(3) *Alternaria arborescens*

Simmons



Produce largos conidióforos primarios con conidios en cadenas ramificadas. La ramificación ocurre predominantemente desde el ápice conidial y el conidio primario puede alcanzar hasta dos veces el tamaño del conidio siguiente llevando un corto conidióforo secundario. La proliferación apical predomina resultando un aspecto relativamente compacto y complejo

\* ( ) = Grupo

---

### 7.7. Determinación de micotoxinas en grano de cebada maltera

Al realizar el análisis para determinar la presencia de micotoxinas en el grano de cebada maltera (Cuadro 13), procedente de tres ciclos agrícolas diferentes, se detectó la presencia de aflatoxinas en la prueba realizada con cromatografía de inmunoafinidad, en tres muestras, correspondiendo la más alta concentración a la muestra M<sub>7</sub> (4 µg kg<sup>-1</sup>), mientras que las muestras M<sub>12</sub> y M<sub>13</sub> registraron las concentraciones más bajas (1 µg kg<sup>-1</sup> cada una). Para el resto de las muestras no se detectó la presencia de aflatoxinas.

Con respecto al deoxinivalenol, esta toxina se presentó en el 100% de las muestras, correspondiendo la mayor concentración a la muestra M<sub>13</sub> (56,900 µg kg<sup>-1</sup>) y la menor concentración a la muestra M<sub>7</sub> (1,700 µg kg<sup>-1</sup>).

Para ocratoxina A, zearalenona, alternariol, monometil-éter de alternariol y ácido tenuazoico, no se detectó la presencia de estas toxinas en las muestras analizadas.

Con respecto a la aflatoxina, la cual ha sido reportada en grano de cebada maltera por Sanchis *et al.* (1993), Torres (1993), Carrillo (2003) y Rousseau (2004), la concentración de esta toxina en las muestras analizadas estuvo por debajo de los límites permitidos internacionalmente y por la NOM-188-SSA-1-2002 según VICAM, (1999), que establece para granos y cereales para consumo humano una concentración de 20 µg kg<sup>-1</sup> (Gimeno y Ligia, 2003). Sin embargo de acuerdo con lo reportado por Mélotte (2005), las concentraciones en este trabajo se ubicaron dentro del rango que este autor reporta de manera experimental en grano de cebada y en malta, dichas concentraciones fueron de 0.1 a 0.5 µg kg<sup>-1</sup>.

**Cuadro 13. Análisis del contenido de micotoxinas en grano de cebada maltera**

Muestra	Aflatoxina* ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Aflatoxina** ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Deoxinivalenol** ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Ocratoxina A* ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Zearalenona* ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Alternarioles*		
						AOH ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	AME ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	TeA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
M <sub>1</sub>	0	0	14,000	0	0	0	0	0
M <sub>2</sub>	0	0	18,000	0	0	0	0	0
M <sub>3</sub>	0	0	15,500	0	0	0	0	0
M <sub>4</sub>	0	0	15,000	0	0	0	0	0
M <sub>5</sub>	0	0	21,000	0	0	0	0	0
M <sub>6</sub>	0	0	19,000	0	0	0	0	0
M <sub>7</sub>	0	4	1,700	0	0	0	0	0
M <sub>8</sub>	0	0	7,000	0	0	0	0	0
M <sub>9</sub>	0	0	14,000	0	0	0	0	0
M <sub>10</sub>	0	0	18,250	0	0	0	0	0
M <sub>11</sub>	0	0	14,500	0	0	0	0	0
M <sub>12</sub>	0	1	11,000	0	0	0	0	0
M <sub>13</sub>	0	1	56,900	0	0	0	0	0

\* Determinada por cromatografía de capa fina

\*\* Determinada por columnas de inmunoafinidad de anticuerpos monoclonales

Para el caso del DON, toxina encontrada en grano de cebada maltera por Sanchis *et al.* (1993), Torres (1993), Carrillo (2003), en concentraciones de 0.1 a 21.8 mg kg<sup>-1</sup> por Salas and Steffenson (1999), de 0.04 a 1.6 mg kg<sup>-1</sup> por Moreno *et al.* (2000), de 5 a 857  $\mu\text{g kg}^{-1}$  por Olsson *et al.* (2002), de 0.05 a 0.91 mg kg<sup>-1</sup> por parte de Tutelyan (2004), y de 737  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 8,092  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , 7,121  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y 32,746  $\mu\text{g kg}^{-1}$  reportados en cada una de las cuatro variedades de cebada mexicana evaluadas por Legzdina and Buerstmayr (2004). En el caso del presente trabajo solamente diez de las trece muestras tuvieron presencia de cepas del género *Fusarium*, sin embargo todas las muestras presentaron concentraciones de DON que fueron de 1,700 a 56,900  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , lo cual confirma el hecho de que la ausencia del hongo no garantiza que el sustrato analizado se encuentre libre de micotoxinas, por otra parte esta toxina aún no cuenta con una legislación oficial en México ni en ningún otro país, que permita establecer límites en su concentración en cebada maltera o en cereales en general. Sin embargo, destaca el trabajo realizado por Mélotte (2005), quien hace mención acerca de las

concentraciones de DON encontradas en cebada y en malta las cuales van de 5 a 30  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , valores en general muy por debajo de los obtenidos en el presente análisis.

Con respecto a la ocratoxina A, la zearalenona y los alternarios, micotoxinas reportadas en grano de cebada por Sanchis *et al.* (1993), Torres (1993), Carrillo (2003) y Rousseau (2004), en este trabajo no se determinó la presencia de dichas micotoxinas, sin embargo no se puede descartar que estas se puedan presentar en posteriores cosechas realizadas en los mismos sitios de procedencia de las muestras utilizadas en este análisis, esto debido al número y diversidad de hongos que se encuentran establecidos como inóculo en las áreas productoras de este cereal.

Con respecto a la micobiota se observó que las muestras correspondientes a la variedad Esperanza del ciclo O-I, y originaria de la región del Bajío mostró la mayor cantidad de aislamientos realizados en comparación a las muestras de la variedad Esmeralda del ciclo P-V, originarias de los Valles Altos, así mismo se determinó que la concentración de la micotoxina Deoxinivalenol resultó ser numéricamente mayor en las muestras de la variedad Esperanza originarias de la región del Bajío, lo cual nos sugiere una mayor susceptibilidad de esta variedad a la presencia y ataque de hongos relacionados a los cereales y en específico al cultivo de la cebada maltera, así como a la síntesis de determinadas micotoxinas.

## VIII. CONCLUSIONES

La determinación del contenido de humedad y germinación realizadas en este trabajo, demostraron que las muestras analizadas de las variedades Esmeralda y Esperanza se encuentran dentro de los límites establecidos por la Norma Mexicana (NMX-FF-043-SCFI-2003) siendo adecuadas para su uso en la industria maltera.

En la prueba de vigor se encontró que las muestras de la variedad Esperanza correspondientes al ciclo O-I, 2003-2004 presentaron un menor periodo de almacenamiento en consecuencia presentaron un mayor vigor, debido a que no mostraron daños fisiológicos.

Las pruebas de vigor y de peso seco a pesar de nos ser utilizadas como un índice de calidad biológica en el malteado, se pueden establecer para evaluar el rendimiento del grano durante el proceso.

En las muestras de riego de la variedad Esperanza procedentes del Bajío del ciclo O-I 2002-2003 se encontró mayor presencia de *Penicillium*, mientras que en el ciclo O-I 2003-2004 el género más abundante fue *Alternaria*, siendo este último resultado similar a lo que se observó en la variedad Esmeralda del ciclo P-V 2003 procedente de los Valles Altos.

Otros géneros encontrados en menor proporción fueron *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Fusarium* y *Aspergillus*, caracterizándose estos hongos por ser causantes de enfermedades en la planta, además de ocasionar decremento en la calidad y cantidad del grano durante su formación en el campo.

La importancia de la presencia de hongos como *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Stemphyllium* y *Rhizopus*, radica en que bajo determinadas condiciones son capaces sintetizar metabolitos secundarios tales como las micotoxinas, asociadas a trastornos en la salud humana y animal, así como las hidrofobinas metabolitos asociados a la sobreproducción de espuma en la cerveza y causantes del deterioro de la calidad de este producto.

Las dos variedades utilizadas en este trabajo son altamente susceptibles de sufrir contaminación con Deoxinivalenol, esta otra toxina puede estar presente en el grano de cebada, en la malta e incluso en la cerveza, aun cuando el hongo asociado a su síntesis no se encuentre contaminando dicho sustrato al momento de las evaluaciones.

En tres de las muestras analizadas se determinó una concentración mínima de Aflatoxinas totales, así mismo no se detectó la presencia de Zearalenona, Ocratoxina A, y Alternarioles (AOH, AME, TeA).

## **IX. RECOMENDACIONES**

Es importante la determinación de las cuatro pruebas biológicas realizadas al grano de cebada, y aunque en el caso de la prueba de peso seco y de vigor expresado en longitud media de plúmula, no se encontraron reportados trabajos específicos, los resultados aquí obtenidos pueden servir de referencia en futuras evaluaciones, debido a que cualquiera de estas pruebas pueden considerarse complementarias entre si para poder determinar de manera más precisa en que condiciones biológicas se encuentra un lote de grano previamente a su utilización en la elaboración de malta y así mismo mediante procedimientos de evaluación establecer el posible rendimiento que se puede esperar de dicho lote.

Las concentraciones de la micotoxina Deoxinivalenol determinadas en la evaluación de las muestras de grano de cebada, deben ser consideradas como factor de riesgo para la salud humana, debido a que fueron encontradas en concentraciones por arriba de los límites permitidos para consumo humano, por lo que se debe realizar un análisis de ésta toxina de manera rutinaria.

Es importante determinar la presencia de Deoxinivalenol en cerveza, para poder corroborar si durante el proceso de malteado, se reduce o biotransforma esta toxina, ya que esta, como algunas otras toxinas, puede encontrarse en concentraciones inferiores a las originalmente detectadas en la materia prima inicial, aun cuando ésta haya pasado por varios procesos de industrialización , siendo el factor de riesgo más importante el hecho de que varias de estas toxinas se acumulan en órganos y tejidos, razón por la cual es importante el conocimiento del riesgo que conlleva un mal manejo del cultivo en campo o

bien del grano cosechado y almacenado en condiciones favorables al desarrollo y proliferación de hongos capaces de sintetizar este tipo de metabolitos.

## X. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Abarca M.L., Bragulat M.R. y Castellá G. 2000. Hongos productores de micotoxinas emergentes. Revista Iberoamericana de Micología. 17: S63-S68.
2. Abramson, D., Hulasare, R. White, N.D.G., Jayas, D.S. 1999. Mycotoxin formation in hulles barley during granary storage at 15 and 19% moisture content. Journal of Stored Products Research 35 (1999) 279-305.
3. Ackermann, A. 1998. Mycoflora of South African Barley and Malt. J. Am. Soc. Brew. Chem. 56(4):169-176.
4. AOAC International. 1995. Oficial methods of Análisis of the Association of Oficial Analytical Chemists. The Association: Arlintong, VA. 325 p.
5. Almueda A. y Lizaso J. 2001. Hongos y Micotoxinas. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Tres Cantos, Madrid. España. 1-9.
6. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). 1995. Cebada. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 32 pp.
7. Arango-Mejía, Ma. C. 2003. Micotoxinas y Salud Humana. Facultad de Ciencias para la Salud. Universidad de Caldas. Manizales, Colombia. 18 pp.
8. Betina, V. 1984. Mycotoxins: Production, isolation, separation and purification. Developments in Food Science, Vol. 8. Ed. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
9. Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England. 237 pp.
10. Candlish, A.A.G., M.K., G. Harran., Smith, J.E. 1991. Inmunofluorescence column chromatography for detection of total aflatoxin in experimental situations. Biotech. 5:317-322.
11. Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Salta. Argentina. 126 pp.

12. Centeno, S. and Calvo, M<sup>a</sup> A. 2002. Mycotoxins Produced by Fungi Isolated Wine Cork Stoppers. *Pakistan Journal of Nutrition*. 1(6):267-269.
13. Da Motta S. and Soares V. 2000. A Method for Determination of Two *Alternaria* toxins, Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether, in Tomato Products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 31:315-320.
14. De la Rosa I. 2004. Madurez de las semillas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) y su relación con la calidad fisiológica y sanitaria. Tesis de Maestría Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Estado de México.
15. Eppley, R.M. 1968. Screening method for zaeralenone, aflatoxin, and ochratoxin. *JAOAC* 51:74-78
16. FAO (Food and Agriculture Organization). 1997. "Worldwide Regulations for Mycotoxins 1995". A compendium. FAO Food and Nutrition: Paper 64. (Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations).
17. Ferris i Tortajada J., García i Castell J., Berbel-Tornero O. 2001. Micotoxinas y cáncer pediátrico. *Revista Española de Pediatría*; 2001; 57(3): 279-280.
18. Gallego-Brogeras, L. Ma. 2005. <http://www.analizacalidad.com/micotoxinas.htm>
19. García, A.G. 1989. Manual de Métodos para el análisis de Micotoxinas en Granos. Departamento de Botánica, Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 163 pp.
20. Gimeno, A. y Ligia, M. 2003. Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y en Humanos. Special Nutrients, Inc. USA (Ed.). Talleres gráficos del SRL, Buenos Aires, Argentina. 160 pp.
21. Gjertsen, P., Trolle B. and Andersen, K. 1963. Weathered barley as a contributory of gushing in beer. *Proc. Eur. Brew. Conv. Congr.*, Brussels, 320-341.

22. Gjertsen, P. 1967. Gushing in beer; its nature, cause and prevention. *Brew. Digest* 42(5), 80-84.
23. González, H.H.L., Martínez, E.J. & Resnik, S.L. 1997. Fungi associated with sorghum grain from Argentina. *Mycopathologia* 139:35-41.
24. Gutiérrez-García G.R. 2000. Patógenos transmitidos vía semilla en el cultivo de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en los Valles Altos de México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 99 pp.
25. Gyllag, H. Kjenllen, K. Haikara, A. and Sigsgaard, P. 1981. Evaluation of fungal contaminations of barley and malt. *J. Inst. Brew.* 87:248-251.
26. Haikara, A. Mäkinen, V. and Hakulinen, R. 1997. On the microflora of barley after harvesting, during storage and in malting. *Proc. Eur. Brew. Conv.* 16:35-46.
27. Hernández-Pérez D. 1998. Enfermedades de maíz (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) presentes en México. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Estado de México.
28. Hippeli, S. and Elstner, E.F. 2001. Are Hydrophobins and/or Non-Specific Lipid Transfer Protein Responsible for Gushing in Beer? New Hypotheses on the Chemical Nature of Gushing Inducing Factors. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen. 57c, pp1-8.
29. Ilender Corporation of America. Notas científicas. 1998. 8 pp.
30. Impulsora Agrícola, S.A. de C.V. 2004.
31. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). 2005. Cuadernos Estadísticos.
32. Kitabatake, K. 1978. A Word component responsible for gushing in beer. *Bull. Brew. Sci.*, 24. 21-32.

33. Kitabatake, K. and Amaha, M. 1977. Effect of chemical modifications on the gushing-inducing activity of a hydrophobic protein produced by a *Nigrospora sp.* Agric. Biol. Chem. 41. 1011-1019.
34. Kosiak Barbara, and Torp Mona. 2004. *Alternaria* and *Fusarium* in Norwegian grains of reduced quality- a matched pair sample study. International Journal of Food Microbiology. Volume 93, Issue 1. Pages 51-62.
35. Lacey, J. Hill, S. T., and Edwards, M. A. 1980. Micro-organism in stored grains- Their enumeration and significance. Trop. Stored. Prod. Inf. 39:19-33.
36. Legzdina, L. and Buerstmayr, H. 2004. Comparision of infection with *Fusarium* head blight and accumulation of mycotoxins in grain of hulles and covered barley. Journal of Cereal Science. 40 (2004) 61-67.
37. López, P. P., Guzmán, O. F.A. y Román, G. A.D. 2005. Calidad física de diferentes variedades de cebada (*Hordeum sativum* Jess) cultivadas en los estados de Hidalgo y Tlaxcala. VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, Gto. pp 8-15.
38. Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., Tousson, T.A. 1984. Toxigenic *Fusarium* species: Identity and Mycotoxicology, University Park, PA: Pennsylvania State University Press.
39. Martínez-Cruz F. 2002. Incidencia de hongos en semilla de cebada proveniente de tres sistemas de labranza. Tesis de Licenciatura Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo. de México. 73 pp.
40. Medina, A., Valle-Algaria, M.F., Meteo, R., Gimeno-Adelantado, V.V., Mateo, F. and Jiménez, M. 2006. Survey of the Micobiota of Spanish malting barley and Evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. International Journal of Food Microbiology. In Press.

41. Mélotte, L. 2005. Survey on the analysis of mycotoxins. Analysis Committee of the European Brewery Convention. European Community. 8 pp.
42. Moreno, C.M, Martínez, Y. A.J y Raybaudi M.R. 2000. Determinación de deoxinivalenol (DON) en trigo, cebada y maíz y su relación con los niveles de mohos totales, *Fusarium spp.*, porcentaje de colonización y actividad de agua. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Vol. 50 No. 2.
43. Moreno, M. E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 393 pp.
44. Munar, M.J. and Sebree, B. 1997. Gushing – A Maltster's View. Journal American Society of Brewing Chemists, Inc. 55(3); 119-122.
45. Muñoz-Rodríguez R. 2001. Efecto de la resistencia genética y el control químico de *Fusarium graminearum* S. en la producción de toxinas en cebada (*Hordeum vulgare* L.). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco Edo. de México.
46. Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* Species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. University, Park and London. 193 pp.
47. Northolt, M.D. & Van Egmond, H.P. 1982. Contamination of ripening cheese with *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin. In Proceedings of a fourth meeting on mycotoxins in animal disease, 1-3 april 1981, Weybridge. Pepin, G.A; Patterson, D.S.P. and Gray, D.E. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Alnwick, Northumberland. Pp: 90-92.
48. Ocampo, S. I., Jaimez, O.J., Contreras, L.E., Carranza, G.J. 2005. Estudio de la micoflora y contenido de aflatoxinas presentes en cebada cultivada y almacenada en el estado de Hidalgo. VII Congreso Nacional de Ciencias de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato, Gto. 245-253 pp.

49. Olsson, J., Bôrjesson, T., Lundstedt, T. y Schnûrer, J. 2002. Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *International Journal of Food Microbiology* 72 (2002) 203-214.
50. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Micotoxinas. Reporte de la Segunda Jornada FAO/WHO/UNEP. Conferencia Internacional en Micotoxinas. Bangkok, Tailandia, 28 de Septiembre a 2 de Octubre, 1987.
51. Park D.L., Lee L.S., Price R.L., Pohland A.E. 1998. Review of the decontamination of aflatoxins by ammoniation: Current status and regulation. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71:685-703.
52. Peraica, M., Radic, B. Lucic, A. Pavlovic, M. 2000. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. *Boletín de la Organización Mundial de la Salud.* 77 (9): 754-766.
53. Placinta C.M, D'Mello J.P.F. 1999. A review of Worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 78 21-37.
54. Rabie, C.J., Lübben A. 1997. Enumeration of fungi in barley. *International Journal of Food Microbiology* 35. 117-127.
55. Ramírez-Marchand C. 2003. La fusariosis de la espiga de la cebada: especies, distribución, daños, toxinas y perspectivas de manejo en los Valles Altos de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Departamento de Parasitología Agrícola. UACH. Texcoco, Estado. de México. 138 pp.
56. Robledo, Ma. de L., Marín, Sonia y Ramos, A.J. 2001. Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit, México. *Revista Iberoamericana de Micología* 2001; 18: 141-144.

57. Romero-Bautista S. 2004. Hongos transmitidos por semilla de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en la región de Tolcayuca, Hidalgo. Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México. 73 pp.
58. Rousseau, J. 2004. Ocratoxina A en los vinos: Estado de los conocimientos. Instituto Cooperativo del Vino. Vinidea.Net Wine Internet Technical Journal. 5 pp.
59. Salas, B. and Steffenson, B.J. 1999. *Fusarium* Species Pathogenic to Barley and Their Associated Mycotoxins. Plant Disease. 83:667-674.
60. Sanchis V., Marín S. y Ramos A.J. 2000. Control de micotoxinas emergentes situación legislativa actual. Revista Iberoamericana de Micología. 17: S69-S75.
61. Sanchis V. Ramos, A.J., Solsona, A., Marin, S. and Pardo, E. 1993 Incidence of mycotoxigenic *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus* in barley. Journal of Food Protection 56: 246-248.
62. Sarlin, T., Laitila, A., Pekkarinen, A. and Haikara, A. 2005a. Effects of Three *Fusarium* Species on the Quality on Barley and Malt. Journal American Society of Brewing Chemists, Inc. 63(2); 43-49.
63. Sarlin, T., Satâlâ, N., Linder, M.M, Penttilâ, M. 2005b. Fungal Hydrophobins as Predictors of the Gushing Activity of Malt. Journal The Institute on Brewing & Distilling. 111(2); 105-111.
64. Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. 2002. Coordinación General de Comunicación Social. México, D.F. Num. 416/02.
65. Secretaría de Economía. 2003. Dirección General de Normas. Norma Mexicana: NMX-FF-SCFI-2003. Productos Alimenticios no Industrializados para Consumo Humano Cereal-Cebada Maltera- (*Hordeum vulgare* L. y *Hordeum distichum* L.)- Especificaciones y Métodos de Prueba. 27 pp.

66. Semple, R.L, Frio, A.S, Hicks, P.A and Lozare, J.V.1987. Mycotoxin prevention and control in foodgrains. A collaborative publication of the UNDP/FAO regional. Bangkok, Thailandia.
67. Shade, J.E. y A.D. King, Jr. 1984. Analysis of the major *Alternaria* toxins. J. Food Chem. 12:978-995.
68. Simmons, Emory G. and Roberts, Rodney G. 1993. *Alternaria* Themes and Variations (73). Mycotaxon. Volume XLVIII, pp. 109-140.
69. Smith, J.E., G.L. Solomons, C.W. Lewis and J.G. Anderson. 1994. Mycotoxins in Human Nutrition and Health. Directorate General XII Science, Research and Development (ed.), European Commision. 300 pp.
70. Stubbs, R.W., Prescott, J.M., Saari E.E., y Dubin, H.J. 1986. Manual de metodología sobre las enfermedades de los cereales. CIMMYT, México, D.F. 46 p.
71. Sweeney J. Michael and Dobson D.W. Alan. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus* and *Penicillium* species. International Journal of Food Microbiology 43. 141-158.
72. Torres A. 1993. *Alternaria* metabolites in sunflowers seeds. Incidence and effect of pesticides on their production. Mycophatologia 121: 17-20.
73. Tutelyan Victor A. 2004. Deoxinivalenol en cereals in Russia. Toxicology Letters 153 173-179.
74. USDA. 2004. Guía del Importador: La cebada de E.E.U.U. 20 pp.
75. Vaag, P. 2005. Storage Condition Barley Grain. A simple and rapid test for gushing tendency in brewing materials. Proc. Congr. Eur. Brew. Conv. 24:155-162.
76. VICAM., 1999. Mycotoxin testing system. Aflatest. Somerville, M.A.
77. Warham, E.J., Butler, L.D. and Sutton, B.C. 1996. Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. Manual de laboratorio. CIMMYT. México, D.F. 84 pp.

78. Young, K. 2001. Fungal associations with weather stained barley in Western Australia.  
Proc. 7<sup>th</sup> Int. Barley Genet Symp. Vol 2, 1-9.