



UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO EN ALIMENTOS

Caracterización del Crecimiento y Producción de Aflatoxinas en una Cepa Toxigénica de Aspergillus flavus Link, Aislada de Maíz Colectado en Sonora.

TESIS



BIBLIOTECA
D. I. P. A.

que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

José Manuel Llano Sotelo

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

CONTENIDO

Pág.

LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xv
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	3
REVISION DE LITERATURA.....	5
Micotoxinas.....	5
Diversidad de las Micotoxinas.....	6
Toxicidad de las Micotoxinas.....	8
Aflatoxinas.....	10
Microorganismos Productores y Características	
Químicas.....	12
Toxicidad de las Aflatoxinas.....	12
Biosíntesis de las Aflatoxinas.....	14
Regulación Metabólica.....	16
Factores que Afectan la Producción de	
Aflatoxinas.....	18
Metabolitos de la Planta.....	18
Metabolitos del Hongo.....	20
Nutrientes.....	20
Aflatoxinas en el Maíz.....	24
<u>Aspergillus flavus</u> y <u>Aspergillus parasiticus</u>	25

CONTENIDO (Continuación...)

	Pág.
Biología.....	25
Nutrición.....	26
Metabolismo.....	26
Reproducción.....	29
Métodos para el Estudio de <u>Aspergillus flavus</u>	29
Cultivo.....	29
Crecimiento del <u>Aspergillus flavus</u>	30
Producción de Aflatoxinas por <u>Aspergillus</u> <u>flavus</u>	30
Métodos de Análisis de Aflatoxinas.....	31
Método CB.....	32
Métodos Inmunoquímicos.....	33
Elisa.....	33
Aflatest.....	34
HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución).	35
MATERIALES Y METODOS.....	37
Descripción General del Trabajo.....	37
Etapa 1: Obtención de la Cepa Productora.....	40
Etapa 2: Preparación del Inóculo.....	43
Etapa 3: Estudio del Crecimiento y Producción de Aflatoxinas en los Medios Experimentales.....	46

Determinación de Aflatoxinas por Cromatografía	
Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	49
Extracción y Purificación.....	49
Derivación.....	50
Sistema.....	50
Condiciones Cromatográficas.....	50
Fase Móvil.....	50
Análisis.....	52
Inyección.....	52
Preparación e Inyección de Estándares.....	52
Obtención y Evaluación de Datos.....	52
Estandarización de la Técnica de HPLC para	
Aflatoxinas.....	54
Curvas de Calibración.....	54
Factor de Respuesta.....	55
Eficiencia y Resolución.....	56
Descripción de la Morfología.....	58
Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	59
RESULTADOS Y DISCUSION.....	61
Clasificación de Cepas por Características	
Morfológicas.....	61

CONTENIDO (Continuación...)

Pág.

Crecimiento y Producción de Aflatoxinas de las	
Cepas Representativas.....	63
Descripción de la Morfología.....	69
Colonia 43 QV.....	69
Colonia 47 QV.....	73
Colonia 44 QV.....	78
Colonia 49 QV.....	78
Colonia 63 EA.....	78
Caracterización del Crecimiento y Producción de	
Aflatoxinas.....	85
Crecimiento y Producción de Aflatoxinas en los	
Medios Experimentales.....	85
Cambios en pH.....	85
Cuantificación del Crecimiento.....	89
Velocidad de Crecimiento.....	92
Producción Máxima de Biomasa.....	95
Producción de Aflatoxinas Totales.....	96
Máxima Producción de Aflatoxinas.....	100
Producción de Aflatoxina G1.....	101
Producción de Aflatoxina B1.....	103
Producción de Aflatoxina G2.....	105
Producción de Aflatoxina B2.....	107

CONTENIDO (Continuación...)

	Pág.
Producción Específica.....	109
CONCLUSIONES.....	112
RECOMENDACIONES.....	113
BIBLIOGRAFIA.....	114
ANEXO I. Claves para Grupo y Especie de Raper y Fennell.....	123
ANEXO II. Cromatogramas.....	129
ANEXO III. Curvas de Calibración.....	135
ANEXO IV. Efecto de la Concentración de Aflatoxinas en el Factor de Respuesta del Detector de Fluorescencia.....	141

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1. Algunas Micotoxinas Producidas por Especies de <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> y <i>Fusarium</i>	7
2. Programa de Elución Usado en HPLC.....	51
3. Preparación de las Cuatro Mezclas de Aflatoxinas G-1, G-2, B-1 y B-2 (Estándares)...	53
4. Eficiencia de la Separación y Resolución de los Picos de las Aflatoxinas G1, B1, G2 y B2 Usando HPLC.....	57
5. Cepas Obtenidas con Características Morfológicas Similares.....	62
6. Cuantificación de Crecimiento de las Cepas Representativas de Grupos con Características Morfológicas Similares.....	64
7. Producción de Aflatoxinas de las Cepas Representativas de Grupos con Características Morfológicas Similares.....	66
8. Confirmación de los Resultados de Producción de Aflatoxinas en Cultivos en Medio YES Modificado.....	68
9. Dimensiones Estructurales de las Cepas 43 QV y 47 QV.....	70

LISTA DE TABLAS (Continuación...)

Tabla	Pág.
10. Análisis de Varianza, Cuadrados Medios, para los Parámetros pH, Micelio, Aflatoxinas Totales, Aflatoxina G1, Aflatoxina B1, Aflatoxina G2, Aflatoxina B2, Aft/Mic en las Pruebas de Crecimiento y Producción de Aflatoxinas de la Cepa 43 QV.....	86
11. Análisis de Varianza, Cuadrados Medios, para los Parámetros Velocidad de Crecimiento, Máxima Producción de Aflatoxinas y Producción Máxima de Biomasa en las Pruebas de Crecimiento y Producción de Aflatoxinas de la Cepa 43 QV.....	87
12. Valores de Velocidad de Crecimiento, Producción Máxima de Biomasa, Máxima Producción de Aflatoxinas y Máxima Producción de Aflatoxinas por g de Micelio en las Pruebas de Crecimiento y Producción de Aflatoxinas de la Cepa 43 QV.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Principales Sitios de Acción de las Micotoxinas a Nivel Celular.....	9
2. Sitios donde las Micotoxinas Interfieren con el Metabolismo de los Carbohidratos.....	11
3. Síntesis Propuesta de Aflatoxinas y Compuestos Relacionados.....	15
4. Formación de Metabolitos Secundarios en la Idiofase.....	28
5. Secuencia de los Pasos Generales de la Investigación.....	38
6. Etapa 1, Obtención de la Cepa Productora de Aflatoxinas.....	41
7. Etapa 2, Cultivo Inicial, Preparación del Inóculo.....	44
8. Etapa 3, Estudio del Crecimiento y Producción de Aflatoxinas en los Medios Experimentales....	47
9. Cabezuela a 400X de la cepa 43 QV (<u>A. flavus</u> Link).....	71
10. Esporas a 1000X de la cepa 43 QV (<u>A. flavus</u> Link).....	72
11. Cabezuelas a 400X de la cepa 47 QV (<u>A. flavus</u> Link).....	74

LISTA DE FIGURAS (Continuación...)

Figura	Pág.
12. Cabezuelas a 100X de la cepa 47 QV (<u>A. flavus</u> Link).....	75
13. Célula pie a 400X de la cepa 47 QV (<u>A. flavus</u> Link).....	76
14. Esporas a 1000X de la cepa 47 QV (<u>A. flavus</u> Link).....	77
15. Cabezuelas a 400X de la cepa 44 QV (<u>A. flavus</u> Link).....	79
16. Cabezuelas a 100X de la cepa 49 QV (<u>A. flavus</u> variedad columnaris).....	80
17. Célula pie a 400X de la cepa 49 QV (<u>A. flavus</u> variedad columnaris).....	81
18. Esporas a 1000X de la cepa 49 QV (<u>A. flavus</u> variedad columnaris).....	82
19. Cabezuela a 1000X de la cepa 63 EA (<u>A. parasiticus</u> Speare).....	83
20. Conidióforos a 100X de la cepa 63 EA (<u>A. parasiticus</u> Speare).....	84
21. Variación del pH en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.....	88
22. Variación del Peso del Micelio en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.....	90

LISTA DE FIGURAS (Continuación...)

Figura	Pág.
23. Producción de las Aflatoxinas Totales en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.....	97
24. Producción de la Aflatoxina G1 en Tres Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.....	102
25. Producción de la Aflatoxina B1 en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.....	104
26. Producción de la Aflatoxina G2 en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.....	106
27. Producción de la Aflatoxina B2 en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.....	108
28. Producción Específica en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.....	110

RESUMEN

Se aisló la cepa toxigénica responsable de la presencia de aflatoxinas en maíz contaminado, colectado en la región Centro de Sonora. Se hizo una observación del grano quebrado y entero bajo luz ultra violeta, colectándose las fracciones que presentaban fluorescencia verde amarillenta. De cada fracción se aislaron las cepas de A. flavus y A. parasiticus presentes. Se agruparon las cepas por características morfológicas similares y se seleccionaron la más frecuentemente encontrada y la más productora.

Se evaluó el crecimiento y producción de aflatoxinas de la cepa aislada durante 96 horas en un medio sintético, en donde se varió la fuente de carbono (almidón y glucosa) y la presencia de zinc. Para los análisis de aflatoxinas se utilizó (HPLC) con detector de fluorescencia. Este se empleó para determinar el tipo de aflatoxinas producidas por la cepa y para caracterizar la producción de ellas al variar las condiciones de cultivo.

La cepa que produjo más aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y totales fue una de A. flavus Link. Esta presentó esclerocios y colonias color verde fuerte. La anterior cepa al crecer en diferentes fuentes de carbono y zinc, produjo mayor peso del micelio en el medio con glucosa

al 30%. En tanto que la mayor producción específica de aflatoxinas se presentó en el medio con glucosa al 3%. La cepa más productora no fue la más frecuentemente encontrada. Una cepa diferente de A. flavus fue de la que se aislaron más cepas. Esta también produjo aflatoxinas, aunque en menor cantidad, sobresaliendo la producción de la aflatoxina B1.

INTRODUCCION

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios, producidas principalmente por los microorganismos Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus (Diener y Davis, 1969). Estos hongos pueden crecer en una gran variedad de materiales, siendo los cereales buenos substratos para la producción de aflatoxinas. Aspergillus flavus puede invadir a las mazorcas de maíz en el campo ya sea en forma directa o en forma indirecta a través de los insectos (Moreno, 1988).

El grano se contamina en el campo y éste puede sufrir un posterior deterioro en el almacén. Los principales factores que afectan el desarrollo de Aspergillus flavus durante el almacenamiento son: humedad, ya que no crece a humedades menores de 16%; temperatura, siendo el rango de crecimiento de 6 a 46°C; oxígeno, presentandose bloqueo del crecimiento a niveles de oxígeno menores de 0.5% (Lillehoj, 1983). Un factor muy importante en el campo, que influye en el esparcimiento de Aspergillus flavus, es la presencia de insectos (Sauer, 1987).

El grano de maíz comunmente es quebrado con la maquinaria al transportarlo de los camiones a los silos, o al secarlo. Esta condición del grano influye también en

el crecimiento de A. flavus. Al estar el grano quebrado, el hongo tiene mayor facilidad de penetrar a éste. A. flavus se desarrolla mejor, ya que tiene los nutrientes más disponibles (Sauer, 1987).

Conocer los factores que provocan la formación de las aflatoxinas por Aspergillus flavus en el maíz, puede servir para prevenir o disminuir la producción de las aflatoxinas. La identificación de los factores que regulan la producción de aflatoxinas en Aspergillus flavus relacionados con el metabolismo del hongo, puede ayudar a planear estrategias para controlar la contaminación. Estas podrían ser el desarrollo de genotipos tolerantes, o el uso de compuestos que inhiban el crecimiento del hongo.

El grano de maíz posee carbohidratos como glucosa, sacarosa y almidón (Boyer y Shannon, 1986). Además de metales traza como zinc y cobre (Failla y col., 1986).



**BIBLIOTECA
D. I. P. A.**

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar el crecimiento y producción de aflatoxinas de la cepa toxigénica de Aspergillus flavus o Aspergillus parasiticus aislada de maíz contaminado en la región, en presencia de zinc y diferentes fuentes de carbono.

Objetivos Particulares

1. Aislar los hongos del grupo Aspergillus flavus a partir de maíz contaminado con aflatoxinas e identificar hasta especie las cepas aisladas.
2. Seleccionar las cepas de A. flavus y A. parasiticus más frecuentemente encontradas y la más productora de aflatoxinas.
3. Caracterizar el crecimiento y producción de aflatoxinas de la cepa más productora en un medio estándar de cultivo y en presencia de zinc.

4. Caracterizar el crecimiento y producción de aflatoxinas de la cepa más productora en un medio estándar de cultivo y teniendo como fuente de carbono glucosa o almidón.

REVISION DE LITERATURA

En la presente revisión bibliográfica se analizan a las micotoxinas, específicamente a las aflatoxinas, respecto a los factores que afectan, o controlan su producción. La revisión se enfocará principalmente a Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus, desde el punto de vista de la metodología para el estudio de Aspergillus flavus, así como, referente a la cuantificación de las aflatoxinas.

Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos producidos por algunos hongos (Moreno, 1988). La ingestión de pequeñas cantidades de estos metabolitos pueden ser tóxicas a los animales (aflatoxinas, zearalenona, citrinina) y ciertas son tóxicas al estar en contacto con la piel, por ejemplo la toxina T-2 es tóxica en la piel del ganado, cerdos y aves de corral (Moreno, 1988; y Betina, 1989).

Se han descubierto varias micotoxinas que son responsables de las enfermedades de los animales domésticos y de granja (Moreno, 1988). Cuando las micotoxinas son ingeridas en dosis muy pequeñas, no causan una enfermedad declarada, sino que ocasionan reducción del

crecimiento, del vigor y de la conversión del alimento; también producen mayor susceptibilidad a enfermedades. Por ejemplo, el ingerir aflatoxinas, estimula la salmonelosis en gallinas (Moreno, 1988).

Las micotoxinas causan problemas económicos afectando la salud y desarrollo de los animales. Además, éstas alteran la calidad sanitaria de los granos ocasionando un riesgo para la salud (Moreno, 1988).

Diversidad de las Micotoxinas

Las micotoxinas no constituyen una categoría química ya que no poseen un rasgo en común. Estas pueden ser encontradas en una serie de grupos químicos estructuralmente relacionados como son: policétidos, ácidos tetrámicos, dicetopiperacinas, péptidos y terpenos. Las aflatoxinas están dentro de los decapolicétidos (Bu'Lock, 1980). En la Tabla 1 se muestran a algunas micotoxinas producidas por especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, hongos frecuentemente invasores de los granos almacenados (Moreno, 1988).

Tabla 1. Algunas Micotoxinas Producidas por Especies de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.

<u>Género Aspergillus</u>		<u>Género Penicillium</u>	
<u>Hongo</u>	<u>Toxina</u>	<u>Hongo</u>	<u>Toxina</u>
<i>A. chevalieri</i>	Xantocilina	<i>P. cyclopium</i>	Acido penicílico Ocratoxina A
<i>A. clavatus</i>	Patulina	<i>P. expansum</i>	Patulina Citrinina
<i>A. fumigatus</i>	Viriditoxina Gliotoxina	<i>P. viridicatum</i>	Ocratoxinas Viridicatina
<u>Género Fusarium</u>			
<u>Hongo</u>	<u>Toxina</u>		
<i>F. avenaceum</i>	Tricotecenos Zearalenona		
<i>F. equiseti</i>	Tricotecenos Zearalenona		
<i>F. graminearum</i>	Zearalenona Tricotecenos		

Fuente: Moreno, (1988).

Toxicidad de las Micotoxinas

La toxicidad de las micotoxinas varía con la estructura y sensibilidad presentada en la especie animal que las ingiere. Las aflatoxinas y ocratoxinas producen hepatotoxicidad; citrinina y ocratoxinas causan nefrotoxicidad. Las lactonas, ácido penicílico y citreoviridina tienen efectos cardiotóxicos. Mientras que el deoxinivalenol causa rechazo a los alimentos y vómito, el ácido terreico influye en la diabetes, por ejemplo, al recibir las ratas una dosis 0.2 mg en el peritoneo o 50 μg en la dieta por un período de 24 semanas, estas muestran disminución en el glucógeno del hígado y aumento en la glucosa de la sangre. Los efectos tóxicos de algunas micotoxinas puede resultar en la muerte de animales de campo y humanos (Betina, 1989).

Las micotoxinas actúan en varios sitios de las células. Estas pueden modificar el ADN (ácido desoxirribonucleico) (Fig. 1), influir en la transcripción, en la síntesis de proteína o en algunos casos, las micotoxinas actúan con las enzimas o coenzimas (Betina, 1989). Las micotoxinas interfieren en el metabolismo de los carbohidratos y pueden actuar como desacopladores en la fosforilación oxidativa. Algunas micotoxinas dañan las membranas de células eucarióticas, afectan el metabolismo de los lípidos, e interfieren

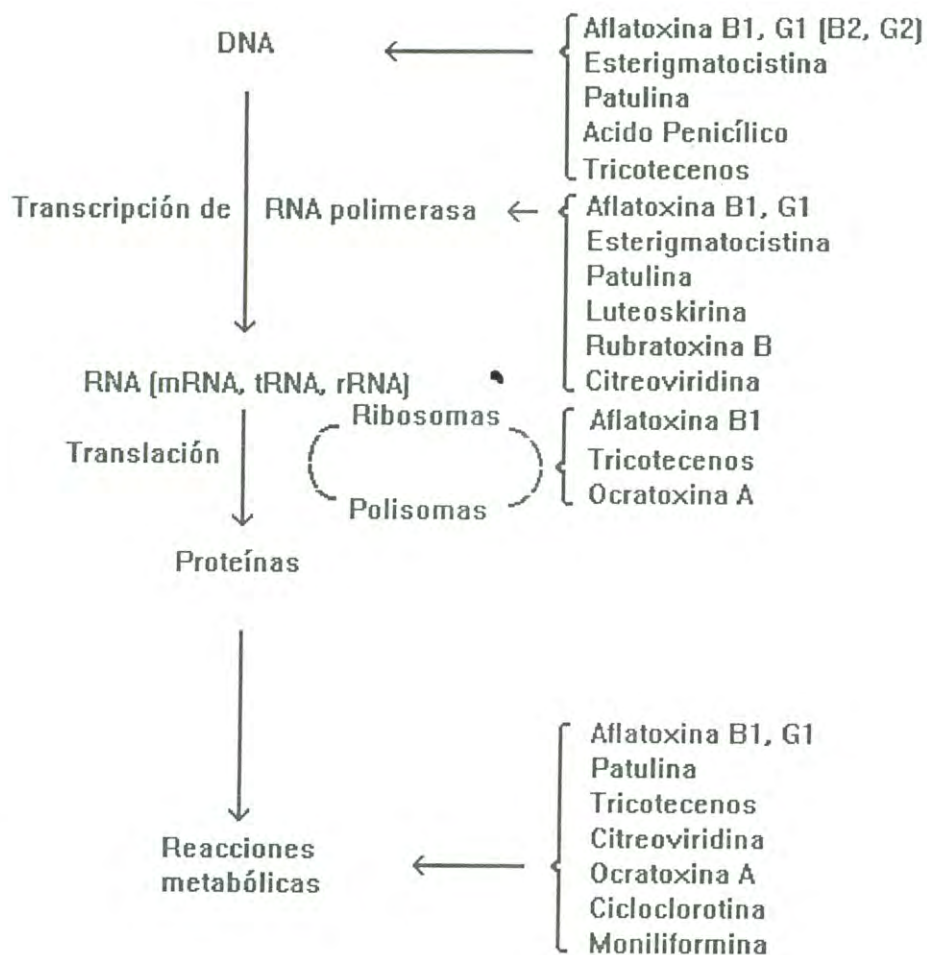


Figura 1. Principales Sitios de Acción de las Micotoxinas a Nivel Celular.

Fuente: Betina, (1989).

en los pasos de la cadena respiratoria mitocondrial (Betina, 1989).

En la Fig. 2 se muestran los sitios donde las micotoxinas interfieren en el metabolismo de los carbohidratos. La aflatoxina B1 y cicloclorotina inhibe la síntesis de glucógeno al disminuir las actividades de la sintetasa y transglicosilasa. La citreoviridina inhibe también la glucógeno sintetasa. La aflatoxina B1 disminuye la actividad de la fosfoglucomutasa la cual convierte glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato (Betina, 1989). La aflatoxina B1 y cicloclorotina acelera la oxidación de glucosa-6-fosfato. La ocratoxina A inhibe la síntesis de fosfoenolpiruvato carboxilasa, la enzima que transforma oxaloacetato a fosfoenolpiruvato. La moniliformina inhibe la decarboxilación oxidativa del piruvato y α -cetoglutarato (Betina, 1989).

Aflatoxinas

En 1960, en Inglaterra más de 100,000 pavitos murieron de una enfermedad desconocida a la cual se le denominó enfermedad X del pavo. En el mismo año en el estado de California en Estados Unidos se encontraron truchas, las cuales tenían hepatomas. Se recibieron reportes en 1961 de Kenia y Uganda de grandes pérdidas

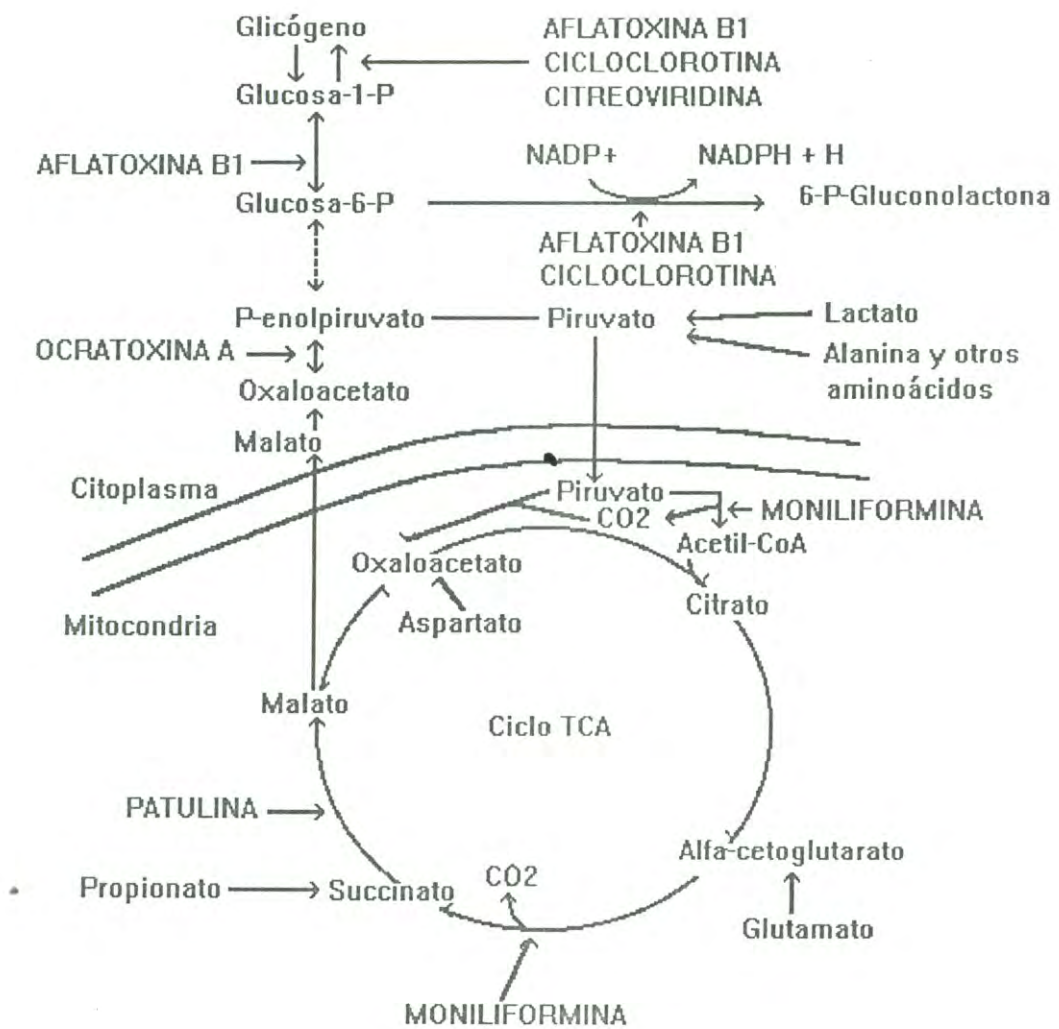


Figura 2. Sitios donde las Micotoxinas Interfieren con el Metabolismo de los Carbohidratos.
Fuente: Betina, (1989).

de patitos de una enfermedad parecida. Después se observó que las aflatoxinas eran las responsables de las enfermedades anteriormente mencionadas (Goldblatt, 1969).

Microorganismos Productores y Características Químicas

Las aflatoxinas son producidas por A. flavus y A. parasiticus, principalmente (Diener y Norman, 1969). Estas son clasificadas dentro de las series difurocoumarociclopentenona y las difurocoumarolactonas. Las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 son los componentes principales de extractos crudos de aflatoxinas. La aflatoxina B2 es dihidro derivado de la aflatoxina B1 y la aflatoxina G2 es el dihidro derivado de la aflatoxina G1. Otras aflatoxinas son la M1, M2, B2a, M2a, GM1, G2a, GM2a y B3 (Betina, 1989).

Las aflatoxinas M1 y M2 fueron aisladas de la orina de oveja. En tanto que las restantes aflatoxinas fueron aisladas de extractos de A. flavus. La aflatoxina M2 es idéntica a la dihidroaflatoxina M1, obtenida por hidrogenación de M1 (Betina, 1989).

Toxicidad de las Aflatoxinas

De las cuatro aflatoxinas que mejor se conocen, la aflatoxina B1 es la más tóxica, seguida de la G1, B2 y G2, en orden de toxicidad decreciente. Todas las aflatoxinas

son tóxicas al hígado, y la aflatoxina B1 es el hepatocarcinógeno más potente (Betina, 1989). Una dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de toxina en la dieta causa tumores en el hígado de las ratas. Las aflatoxinas B2 y G1 también causan tumores en las ratas. Se ha encontrado también que la aflatoxina M1 es carcinogénica (Betina, 1989).

Los efectos biológicos de las aflatoxinas son diversos. La toxicidad varía de especie a especie e incluso con el sexo del animal (Betina, 1989). Hay una asociación entre el cáncer de hígado y el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas en humanos. En ciertas regiones de Kenia, Tailandia, Uganda y Sudáfrica, la incidencia de cáncer primario en hígado fue de 1.2 a 13 en 100,000 personas, lo cual estuvo relacionado con concentraciones elevadas de aflatoxinas en los alimentos. La ingestión estimada de aflatoxinas en varias regiones de los países anteriores varió de 3.5 a 222.1 mg/Kg de peso corporal (Palmgren y Wallace, 1987). En regiones donde se tiene alta incidencia de cáncer de hígado y consumo de aflatoxinas hay alta incidencia de hepatitis (Palmgren y Wallace, 1987).

Biosíntesis de las Aflatoxinas

Los precursores en la síntesis de aflatoxinas son el acetil y el malonil coenzima A (Moss, 1987). El mecanismo más aceptado para la biosíntesis de aflatoxinas parte de una molécula de acetil-CoA ($\text{CH}_3\text{-COSCoA}$) y 9 moléculas de malonil CoA ($\text{HO}_2\text{CH}_2\text{C-COSCoA}$) las cuales se transforman a un progenitor policétido (compuesto con varios enlaces C=O). El compuesto policétido se transforma en averantin, y éste se convierte a averufin, el cual se rearregla transformandose a acetato de versiconal. El acetato de versiconal se convierte a versicolorin A, el cual se transforma a esterigmatocistina, probablemente por una descarboxilación oxidativa y la eliminación de un carbono de un grupo metilo; el compuesto anterior se convierte en la aflatoxina B1 al perder un grupo metilo. La aflatoxina B1 se puede transformar a la aflatoxina G1 con la inserción de oxígeno entre el carbono 3 y 4 (Fig. 3). La biosíntesis de las aflatoxinas fue deducida con espectroscopía ^{13}C NMR. La secuencia de la biosíntesis de las aflatoxinas fue elucidada por la identificación de intermediarios, el uso de mutantes, inhibidores enzimáticos, la conversión de precursores potenciales por la célula y sistemas celulares libres a aflatoxinas (Steyn y col., 1980). Las enzimas involucradas en la síntesis de aflatoxinas pueden ser divididas en dos grandes fases:

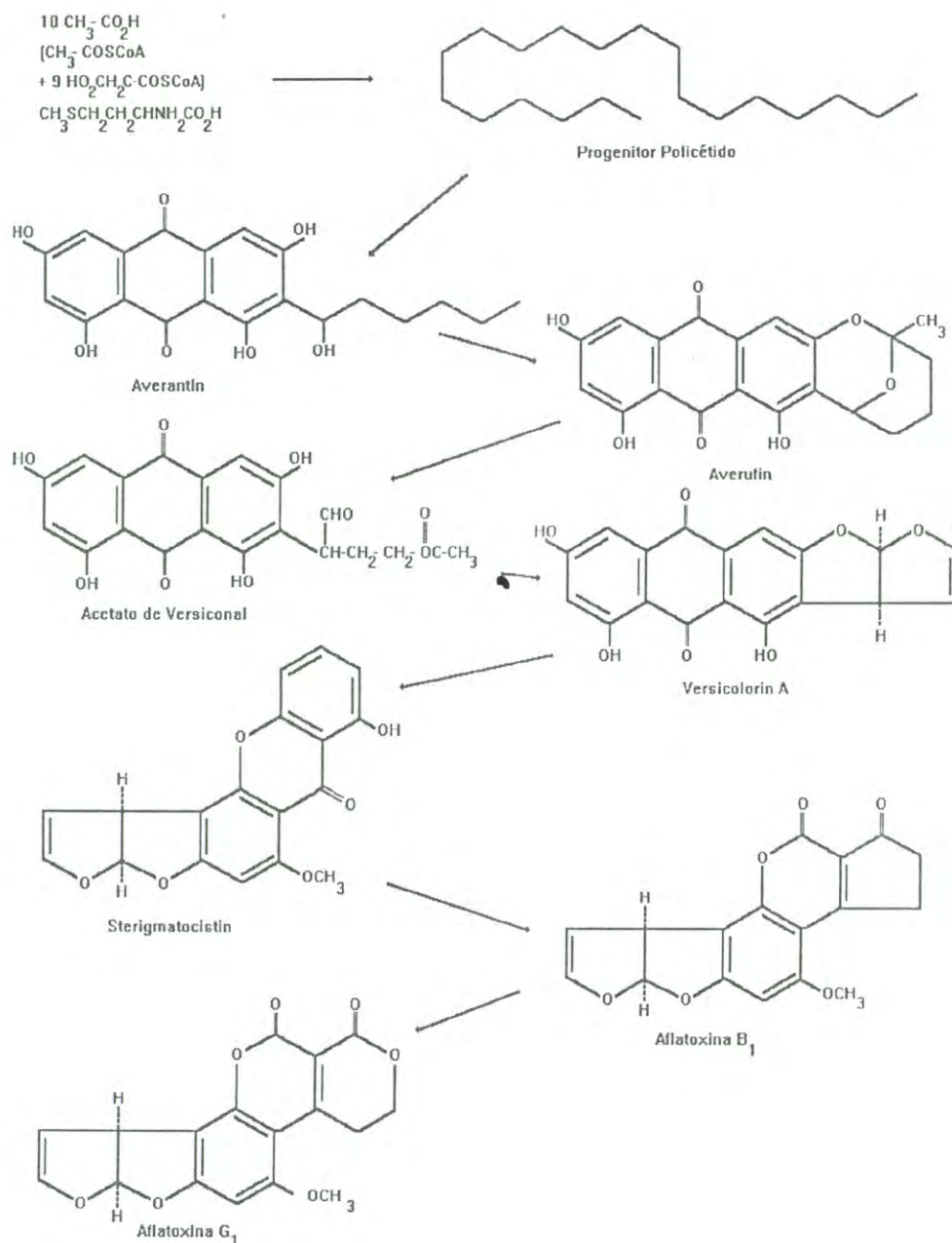


Figura 3. Síntesis Propuesta de Aflatoxinas y Compuestos Relacionados.

Fuente: Steyn y col., (1980).

construcción del precursor antraquinona (averufin) por el policétido sintetasa y la división y rearreglo, la cual involucra enzimas que tienen diferentes especificidades a los substratos (Steyn y col., 1980). De las enzimas responsables de la síntesis de aflatoxinas pocas se han purificado, por ejemplo: metiltransferasa y versicolonal ciclasa (Chang y col., 1993). Las aflatoxinas son sintetizadas fuera de la mitocondria (Buchanan y Lewis, 1984).

Regulación Metabólica

La regulación metabólica en microorganismos y en organismos superiores se lleva a cabo en cuatro niveles. El primer nivel lo constituyen parámetros como el pH, concentración de iones metálicos, enzimas y coenzimas. Este nivel es el más sencillo e involucra a los parámetros principales que afectan las reacciones enzimáticas (Yeomans, 1977).

En el segundo nivel están las enzimas reguladoras. Las enzimas reguladoras están generalmente cerca de una secuencia multienzimática (Yeomans, 1977). Por ejemplo en la síntesis del aminoácido L-isoleucina, se tiene una secuencia de 5 enzimas (Bender y Brubacher, 1977). La mayoría de ellas son inhibidas por el producto final de la

secuencia. Por ejemplo: histidina inhibe fosforibosil-ATP pirofosforilasa y el triptófano inhibe a antranilato sintetasa (Yeomans, 1977).

En el tercer nivel está el control genético de la velocidad de síntesis proteica. En las células hay enzimas constitutivas y enzimas adaptativas o inducidas. Las enzimas constitutivas están presentes casi siempre en cantidades casi constantes. Las enzimas adaptativas o inducidas son sintetizadas con la presencia de cierto substrato (Yeomans, 1977). Por ejemplo, las enzimas inducidas β -galactosidasa, β -galactósido-permeasa y β -galactósido-transacetilasa son sintetizadas con la presencia de compuestos como lactosa e IPTG (derivado isopropilo). Los genes de las enzimas inducidas por lo general están reprimidos (Yeomans, 1977). En el cuarto nivel están las hormonas. Este control se realiza en organismos multicelulares (Yeomans, 1977).

Los mecanismos que se proponen que regulan la biosíntesis de aflatoxinas son los siguientes:

1. Alteración en las actividades específicas de las enzimas asociadas con la utilización de carbohidratos.
2. Interferencias en las fuentes de nitrógeno y del zinc con deshidrogenasas NADP dependientes y la consecuente disminución de la proporción NADPH/NADP, lo cual podría

favorecer la síntesis de aflatoxinas en lugar de ácidos grasos (Luchese y Harrigan, 1993).

Factores que Afectan la Producción de Aflatoxinas

La producción de aflatoxinas depende de las condiciones de crecimiento, humedad, temperatura, substrato, aereación, tiempo de incubación y otros factores que afectan el estado de los hongos (Steyn y col., 1980). Los metabolitos de la planta (proteínas, compuestos fenólicos y fitoalexinas) influyen en el crecimiento de hongos y producción de toxinas (Vidhyasekaran, 1988). Los factores ambientales como humedad y temperatura son muy importantes en la producción de aflatoxinas (Payne, 1992).

Metabolitos de la Planta. Las plantas tienen mecanismos de defensa contra casi todos los microorganismos. Entre estos mecanismos está el empleo de lectinas, el aumento en la síntesis de proteínas y de enzimas, y el uso de compuestos fenólicos y fitoalexinas (Vidhyasekaran, 1988). Las lectinas se encuentran en las membranas celulares de las plantas, en los constituyentes citoplásmicos, en las paredes celulares de las plantas, así como en las semillas. Las lectinas pueden actuar como reconocedoras de patógenos o no patógenos (Vidhyasekaran, 1988).

Algunas de las proteínas actúan como receptores de toxinas y enzimas producidas por los patógenos. La síntesis de proteína aumenta en las interacciones planta microorganismo patógeno (Vidhyasekaran, 1988).

Entre los compuestos fenólicos están los flavonoides, quinonas, xantonas, ligninas, melaninas, taninos y glucósidos. Los compuestos fenólicos son sustancias tóxicas a los hongos y las bacterias, y a altas concentraciones inhiben la germinación de las esporas y el crecimiento de los hongos. Algunos compuestos fenólicos inhiben la producción de enzimas de hongos e inactiva las enzimas. Los compuestos fenólicos pueden suprimir la producción de toxinas o detoxificar las toxinas producidas por los hongos (Vidhyasekaran, 1988).

Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular los cuales son sintetizados y acumulados en las plantas después de la exposición de las plantas a los microorganismos. Las fitoalexinas inhiben la germinación de las esporas, el crecimiento del micelio y el crecimiento bacteriano (Vidhyasekaran, 1988).

Las lectinas, la síntesis de proteína y fitoalexinas, influyen en el crecimiento de los hongos en tanto que los compuestos fenólicos inhiben el crecimiento de los hongos

y pueden suprimir la producción de toxinas (Vidhyasekaran, 1988).

Metabolitos del Hongo. Para que el A. flavus se desarrolle en forma óptima, tiene que crecer casi en forma pura. El maíz, algodón y cacahuate en el Sureste de Estados Unidos tienen el riesgo de la presencia de aflatoxinas, ya que el A. flavus se desarrolla en estos cultivos casi en forma pura (Christensen y Meronuck, 1986). En un experimento en el que se hizo crecer A. flavus junto con esporas de hongos de A. ochraceus, Penicillium citrinum, P. cyclopium y P. urticae, las cuales producen las toxinas ocratoxina, citrinina, ácido penicílico y patulina, se observó que afectaron dichas toxinas la producción de aflatoxinas por A. flavus (Trucksess y col., 1988).

Nutrientes. Se ha reportado una máxima producción de aflatoxinas con 30% de glucosa, el máximo crecimiento se obtuvo cuando el medio tenía 10% de glucosa. Se ha observado que una amplia variedad de carbohidratos pueden inducir la síntesis de aflatoxinas, pero se concluye que los carbohidratos no actúan como inductores (Luchese y Harrigan, 1993).

Luchese (1991), afirma que bajo algunas circunstancias, la presencia de glucosa o de otros carbohidratos no es necesaria para la síntesis de aflatoxinas y que el requerimiento de glucosa varía con la composición del medio. En tanto que Abdollahi y Buchanan (1981), mencionan que la glucosa o un producto de su metabolismo, parece que inducen a una o más de las enzimas responsables para la síntesis de aflatoxinas. Wiseman y Buchanan (1987), sugieren que la síntesis de aflatoxinas en A. parasiticus no se da en substratos que contienen concentraciones menores de 0.1 M de carbohidratos (Luchese y Harrigan, 1993).

La ribosa, xilosa, glucosa, fructosa, sorbosa, manosa, galactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa y glicerol inducen la producción de aflatoxinas. En tanto que la lactosa, ácido láctico, piruvato de sodio, ácido oleico, ácido cítrico, acetato de sodio, alfa metil-D-glucósido, 3-O-metil-D-glucósido, cAMP, o cGMP no inducen la síntesis de aflatoxinas (Abdollahi y Buchanan, 1981). Buchanan y Ayres, (1977); y Shantha y Murthy (1981), concluyeron que cualquier acumulación significativa de intermediarios aumenta la actividad del ciclo del TCA (ácido tricarboxílico) y disminuye la producción de aflatoxinas (Luchese y Harrigan, 1993).

Rusul y colaboradores (1987), reportaron que los cultivos con una fase lenta extendida con la presencia de ácido acético producen grandes cantidades de aflatoxinas. En tanto que Shih y Marth (1974); Maggon y col., (1977); y Tyagi y Venkitasubramanian (1981), han propuesto que niveles elevados de NADPH (fosfato nicotinamida adenina dinucleótido) estimulan la síntesis de aflatoxinas. Se ha reportado que el nitrógeno orgánico estimula la síntesis de aflatoxinas. Thapar (1988), reportó una producción alta de aflatoxina con fuentes de nitrógeno orgánico tales como aminoácidos y nitrato de amonio. Payne y Hagler (1983), encontraron que la prolina estimula más la producción de aflatoxinas que otras fuentes de nitrógeno (Luchese y Harrigan, 1993).

Los efectos de las fuentes de nitrógeno en la síntesis de metabolitos secundarios usualmente está dada por la represión de unas enzimas que se encargan de asimilar iones de amonio o del metabolismo de aminoácidos o en la represión de enzimas que se encargan del catabolismo de nitrógeno al usar rápidamente fuentes de nitrógeno tales como el amoníaco. Shih y Marth (1974), observaron que una concentración de nitrógeno abajo del óptimo para el crecimiento máximo, produce máxima producción de lípidos y aflatoxinas (Luchese y Harrigan, 1993).

Se encontró una correlación positiva entre los niveles de aflatoxina y los niveles de zinc y cobre en maíz (Failla y col., 1986). El zinc afecta el ciclo glicolítico y el ciclo del ácido tricarboxílico. La ausencia de zinc activa el ciclo de el fosfogluconato por lo que no se sintetiza aflatoxina (Luchese y Harrigan, 1993).

Davis y col. (1967), reportaron el incremento de la producción de aflatoxina en la ausencia de manganeso dándose la disminución en el crecimiento de *Aspergillus*. El efecto del manganeso en la producción de aflatoxina puede ser de inhibición o estimulación dependiendo de la concentración empleada; se presenta inhibición con 0.7 mM y estimulación con 0.2, 0.5 y 1.2 mM de cloruro de manganeso. Los metales traza como manganeso, magnesio y vanadio favorecen la formación de aflatoxinas hidroxiladas (Luchese y Harrigan, 1993).

Niveles altos de fósforo inorgánico inhiben la biosíntesis de metabolitos secundarios debido a sus propiedades quelantes, provocando la falta de metales traza esenciales, o la inhibición de intermediarios fosforilados dentro de los ciclos de síntesis. Una concentración alta de fósforo inorgánico podría aumentar la formación de ATP influyendo en la carga de alta energía

en la célula y así afectando negativamente en la producción de aflatoxinas (Luchese y Harrigan, 1993).

La biosíntesis de aflatoxinas y ácidos grasos está correlacionado inversamente. Además la biosíntesis de aflatoxinas se induce con los lipoperóxidos. Weinberg (1974), establece que el metabolismo secundario no se da en cultivos continuos si al medio se le proporciona constantemente fuentes de fosfato y nitrógeno (Luchese y Harrigan, 1993).

Aflatoxinas en el Maíz

Las aflatoxinas en el maíz de Estados Unidos son producidas principalmente por A. flavus. La producción de aflatoxinas es un problema común en el sureste de los Estados Unidos y en otros estados de la Unión Americana. Se tiene riesgo de producción de aflatoxinas en el maíz que crece en el sureste de Estados Unidos ya que el A. flavus se desarrolla en el interior del grano de maíz, casi en forma pura (Christensen y Meronuck, 1986).

Una región reconocida en México como problemática por la contaminación del maíz que se produce por aflatoxinas, es la de Tamaulipas. Guzmán y Estrada (1994) evaluaron la contaminación por aflatoxinas durante la recepción de maíz en el ciclo primavera verano de 1991 en la Zona Agrícola

de Valle Hermoso, Tamaulipas. Las muestras que presentaron contaminación mayor que 20 ppb fueron 285. El 63 % del total de las muestras presentó una contaminación menor que 20 ppb, un 39% de 21 a 120 ppb y un 70% presentó contaminación mayor de 120 ppb. En éste estudio se comprobó que el problema de contaminación se dá en el campo y que éste puede ser tan serio que afecte a todo el maíz sembrado en una región.

Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus

Biología

Los hongos A. flavus y A. parasiticus se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y aire, y causan contaminación en el maíz, cacahuates, algodón y nueces. El A. flavus tiene conidióforos biseriados, conidios casi lisos o ligeramente rugosos, el color de la colonia es amarillo verdoso y la superficie de la colonia es irregular. El A. parasiticus tiene conidióforos, la mayoría de las veces uniseriado, los conidios son equinulados, y el color de la colonia es verde (Diener y Davis, 1987).

Nutrición

Los hongos A. flavus y A. parasiticus requieren de zinc para la síntesis de aflatoxinas. La cantidad mínima necesaria para la síntesis de aflatoxina por A. flavus es de 0.4 mg/l, en tanto que la máxima producción de aflatoxina se tiene a 0.8 mg/l (Luchese y Harrigan, 1993). Otros elementos traza como manganeso y cobre influyen en la síntesis de las aflatoxinas. El manganeso hace que aumente la producción de aflatoxinas en A. flavus, en tanto que el cobre disminuye la producción de aflatoxinas. En A. parasiticus, el cobre manganeso y el boro tiene poco efecto en la formación de aflatoxinas. La formación de aflatoxinas por A. flavus está afectada por el nivel y el tipo de los elementos traza presente en el sustrato. Altos niveles de fosfato inhiben la formación de compuestos secundarios. Los reportes de los efectos de los aminoácidos sobre la síntesis de las aflatoxinas son contradictorios (Davis y Diener, 1983).

Metabolismo

Los microorganismos sintetizan metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios están formados por compuestos de bajo peso molecular y son usados para contruir moléculas esenciales o se convierten a coenzimas. Son considerados metabolitos primarios a los aminoácidos, nucleótidos de purina y pirimidina, las vitaminas, ácido

cítrico y fumárico. Los metabolitos secundarios son moléculas sintetizadas por algunos microorganismos, estos metabolitos se producen generalmente al final del ciclo de crecimiento. Los metabolitos secundarios no se requieren para crecer pero sirven para sobrevivir. Los metabolitos secundarios generalmente no se producen en la fase de crecimiento rápido (trofofase), se forman en el siguiente estado de producción (idiofase), ver Fig. 4.

La mayoría de los microorganismos son sensibles a su propio compuesto tóxico en el principio de la trofofase. En la idiofase los microorganismos se hacen resistentes al compuesto tóxico que ellos producen (Wang y col., 1979).

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios de los hongos. Cuando los hongos crecen se producen pocas aflatoxinas, o no se producen. A veces los fosfatos, nitrógeno o algunos metales traza hace que disminuya el crecimiento y el metabolismo primario se hace desorganizado por lo que varios metabolitos primarios se acumulan (Davis y Diener, 1983). Los metabolitos primarios como el piruvato, malato, acetato y varios aminoácidos estimulan la actividad de enzimas del metabolismo secundario. El ácido láurico puede estimular la producción de aflatoxinas mientras que otros

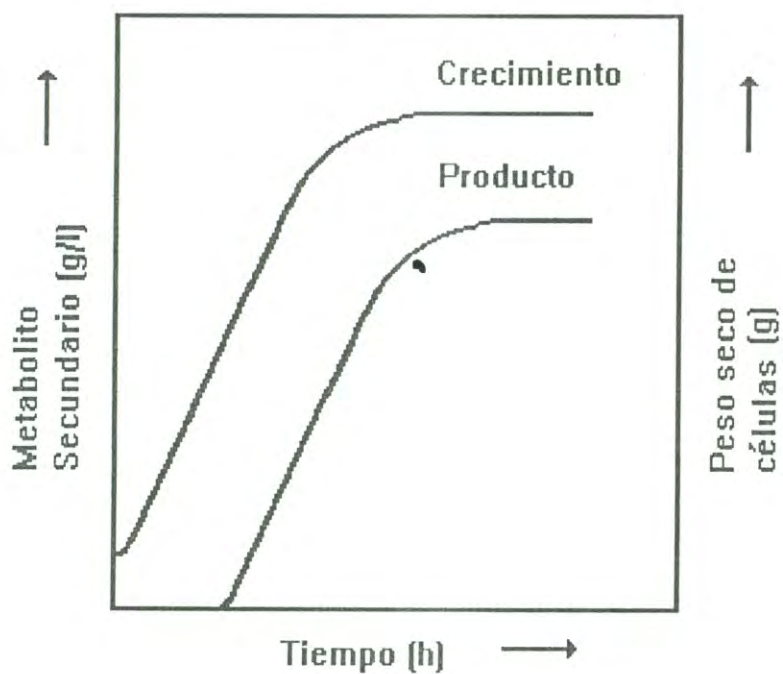


Figura 4. Formación de Metabolitos Secundarios en la Idiofase.
Fuente: Wang y col., (1979).

ácidos carboxílicos son inhibidores de la producción de aflatoxinas (Davis y Diener, 1983).

Reproducción

Aspergillus está dentro del orden ascomycetes. Los ascomicetes se reproducen generalmente por esporas asexuales, conidios, aunque pueden formar algunas veces esporas sexuales, ascosporas (Burdon y Williams, 1980).

Métodos para el Estudio de *Aspergillus flavus*

Cultivo

Hay varios medios para el crecimiento y desarrollo de *A. flavus*. Se emplean tanto medios líquidos, sólidos y substratos naturales. Los substratos naturales producen más micotoxinas que los medios líquidos. Cuando se requieren grandes cantidades de micotoxinas para hacer estudios con animales se usan substratos naturales. Inicialmente las toxinas fueron producidas en medio Czapek con la adición de sulfato de zinc o extracto de levadura en medio Raulin-Thom. Otro medio desarrollado fue el YES (extracto de levadura y glucosa), que contiene 2% de extracto de levadura y 15 a 20% de sacarosa. Este medio incrementó la producción de aflatoxina B1 de 150 a 340 ppm en cultivos de *A. flavus* y es ampliamente usado para la producción de toxinas (Diener y Davis, 1987).

Crecimiento del Aspergillus flavus. El contenido de humedad mínimo de los productos agrícolas para el desarrollo de A. flavus es aquel en equilibrio con una humedad relativa de 85%. En los cereales como trigo, maíz y sorgo el contenido de humedad es de 16.5-18.5% con base a peso húmedo (Moreno, 1988).

Prácticamente no existe límite de humedad máximo para el desarrollo de A. flavus y A. parasiticus y la producción de aflatoxinas. En granos de almacén con contenidos de humedad en equilibrio con humedades relativas superiores al 85%, se desarrollan otros microorganismos, los que inhiben el desarrollo de A. flavus y la producción de aflatoxinas. A. flavus crece lentamente a temperaturas menores de 12°C, y rápidamente a temperaturas hasta de 55°C (Moreno, 1988).

Producción de Aflatoxinas por Aspergillus flavus. La temperatura mínima para la producción de aflatoxinas es 12°C, la óptima es de 27 a 30°C y la máxima de 40 a 42°C. Bajo condiciones óptimas para el desarrollo de A. flavus, la producción de aflatoxinas puede ser alta a las 24 horas. El máximo se alcanza de 7 a 10 días y si el cultivo se continúa, los niveles siguen erráticamente (Moreno, 1988).

Uno de los requisitos para la producción de aflatoxinas es la presencia de una cepa de A. flavus, o A. parasiticus productora de aflatoxinas y que se encuentre prácticamente en cultivo puro, y no en competencia con otros microorganismos (Moreno, 1988).

Métodos de Análisis de Aflatoxinas

El análisis de aflatoxinas en productos agrícolas se lleva a cabo por tres tipos de pruebas, presuntiva, pruebas rápidas de escrutinio y los métodos analíticos. La prueba presuntiva como la técnica de luz negra, indica la posibilidad de presencia de las aflatoxinas. Las pruebas rápidas de escrutinio como los métodos de Romer y el de Holaday Velasco, establecen la presencia o ausencia de aflatoxinas y los métodos analíticos como el CB, el BF (oficiales de la AOAC) son para determinar en forma precisa el contenido de aflatoxinas (Moreno, 1988).

El método presuntivo más rápido para detectar aflatoxinas en granos de maíz es la técnica de luz negra. La técnica no detecta aflatoxinas directamente, sino que detecta parte de granos que brillan con fluorescencia verde amarillenta. La fluorescencia es generalmente producida por A. flavus o A. parasiticus cuando crecen en semillas de maíz, algodón, sorgo, trigo o cebada vivas.

Las pruebas rápidas de escrutinio se deben seleccionar de acuerdo a las necesidades del usuario como: equipo barato, que pueda ser mantenido y reparado en forma fácil y rápido, además deben ser fácilmente accesibles y de bajo costo (García, 1989).

Método CB

El CB es el método oficial No. 968.22 del AOAC (1990), para la cuantificación de aflatoxinas. El método a grandes rasgos es como sigue: Se muelen 50 g de la muestra a analizar, posteriormente a ésta se le añaden 25 ml de agua, 250 ml de cloroformo, y 25 g de tierra de diatomeas. Luego se procede a agitar por 30 minutos y filtrar con papel plegado. A continuación se toman 50 ml de filtrado y se realiza la cromatografía de capa delgada. Se pueden cuantificar las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 (AOAC, 1990).

El método CB se ha empleado para el análisis de aflatoxinas en maíz amarillo. La precisión (Coef. de Variación) de éste método varía de 46% a 61% (Coker, 1984). El método funciona muy bien en maíz y cacahuate (Holcomb y col., 1992).

Métodos Inmunoquímicos

Los inmunoensayos son sensitivos, selectivos, precisos, exactos y de fácil automatización. Se tienen dos métodos inmunoquímicos los cuales son el radioinmunoensayo (RIA), y el método enzimático ELISA (Ensayo inmunoabsorbente con unión enzimática).

El método RIA se ha desarrollado para la estimación de aflatoxina B1 en maíz, trigo y crema de cacahuete. Se ha reportado para la estimación de aflatoxina B1 en orina de mono, humano y se ha desarrollado para el análisis de la aflatoxina M1 en leche (Coker, 1984).

Elisa. El metodo ELISA (ensayo inmunoabsorbente con unión enzimática) "enzyme-linked immunosorbent assay" ha sido desarrollado para la estimación de la aflatoxina B1 en maíz, trigo y crema de cacahuete. Con este método se pudieron cuantificar 5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de aflatoxina B1 en mezclas contaminadas con esta cantidad como mínimo (Coker, 1984).

Las ventajas del método ELISA son: rápido, facilidad en la preparación de la muestra, fácil de usar y bajo costo por análisis. La desventaja del método es que solo detecta la aflatoxina B1. En este método el color desarrollado por la enzima por medio de la reacción da una

indicación de la cantidad de aflatoxina B1 presente (Wilson, 1987).

Aflatest. El sistema de pruebas de micotoxina Aflatest es un método rápido, sencillo, de gran precisión para medir las aflatoxinas en productos variados. Este detecta niveles tan bajos como 0.1 ppb y puede medir niveles de hasta 500 ppb. Aflatest permite medir las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1. Existen varias opciones para el análisis de aflatoxinas por Aflatest (Manual de Aflatest, 1989).

El sistema Aflatest requiere de extracciones con metanol:agua de 80:20 ó de 60:40, dependiendo del alimento a analizar. La columna de Aflatest 10 tiene un anticuerpo monoclonal, con una afinidad muy alta para las aflatoxinas B1 y B2; en tanto que, la columna de Aflatest P tiene un anticuerpo monoclonal, con una afinidad muy alta para las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 y M1. Los anticuerpos monoclonales son proteínas globulares los cuales se unen a los antígenos y son producidos por hibridomas de linfocitos. Los hibridomas son células creadas de forma artificial por medio de la unión de un linfocito y una célula de mieloma. Los anticuerpos monoclonales tienen idéntica especificidad (Henry, 1991). El Aflatest se puede emplear para la preparación en HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución). Con el Aflatest las

aflatoxinas se aislan, luego se extraen éstas de la columna de afinidad y se preparan para inyectar sobre el HPLC (Manual de Aflatest, 1989).

HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)

El HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) "High Performance Liquid Chromatography" tiene ciertas ventajas sobre el TLC (Cromatografía de Capa Delgada), algunas de las cuales son importantes en el análisis de micotoxinas. Se tiene la ventaja de la velocidad de análisis y el aumento en la sensibilidad (Hunt, 1982).

Antes que una muestra alimenticia sea analizada para el contenido de aflatoxinas, éstas se deben extraer primero con un solvente apropiado. El extracto resultante debe ser purificado, usando técnicas como partición líquido-líquido o cromatografía de columna abierta, en absorbentes tales como sílica gel o florisil (Hunt, 1982) y (Holcomb y col., 1992). En la cromatografía de partición líquido-líquido hay líquido estacionario enlazado físicamente a las partículas de relleno (García de Marina y del Castillo, 1988).

Es deseable en algunos análisis de aflatoxinas confirmar los picos de identidad, lo anterior se puede hacer, para las aflatoxinas B1 y G1, convirtiendo estos a

su correspondiente hemiacetal usando hidrólisis ácida con ácido trifluoroacético, seguido de la cromatografía (Hunt, 1982).



BIBLIOTECA
D. I. P. A.

MATERIALES Y METODOS

Descripción General del Trabajo

Se evaluó el crecimiento y la capacidad de producción de aflatoxinas del hongo Aspergillus flavus, productor de aflatoxinas, el cual se aisló de maíz contaminado colectado en la región, y para lo cual el trabajo se dividió en tres etapas (Fig. 5).

En la etapa 1, para el aislamiento de la cepa productora, se seleccionaron trozos de maíz con fluorescencia verde amarilla bajo luz ultravioleta de onda larga. Estos se sembraron en medio Malta Sal Agar; se aislaron las cepas de A. flavus y A. parasiticus y después se clasificaron las cepas en grupos por características morfológicas similares.

Se cultivó la cepa/grupo en medio líquido YES modificado (2% de extracto de levadura y 6% de glucosa), se analizaron las aflatoxinas del medio de cultivo por HPLC con Bomba Varian modelo 9012 y Detector de Fluorescencia Varian modelo 9070, a continuación se seleccionó la cepa más productora.

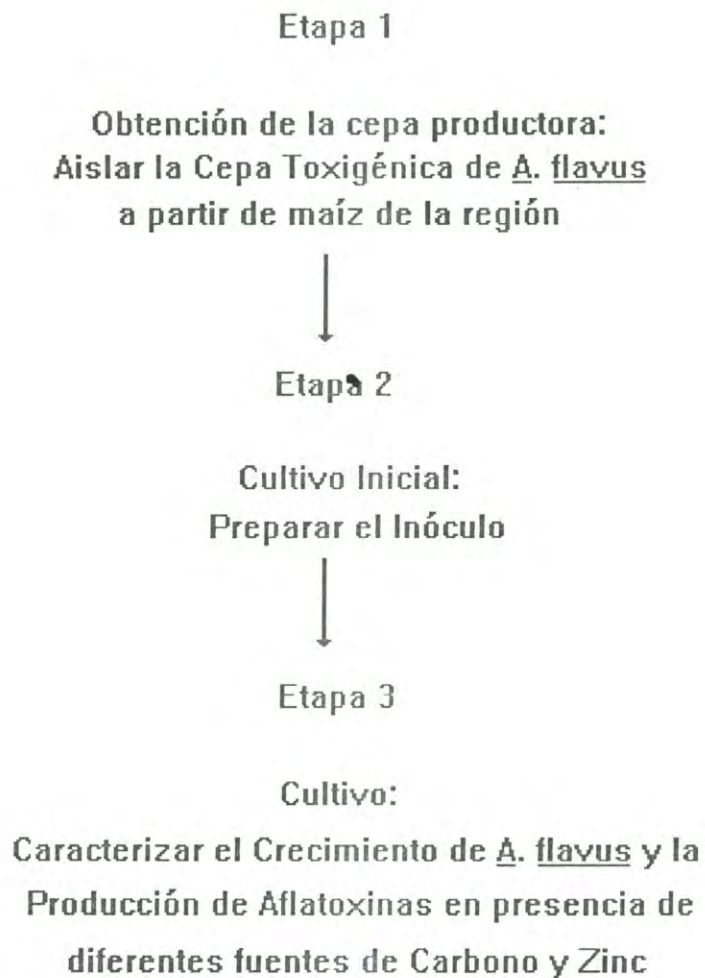


Figura 5. Secuencia de los Pasos Generales de la Investigación.

En la etapa 2 se preparó el inóculo. Este consistió en micelio en su etapa de crecimiento logarítmico. Esto se hizo con el fin de que el A. flavus empleara los compuestos de los medios de cultivo en la formación de metabolitos secundarios en mayor cantidad que los metabolitos primarios. Se sembró la cepa en el medio de cultivo agar extracto de malta, para la producción de esporas, de allí se tomaron éstas para formar una suspensión. Esta suspensión de esporas se utilizó para inocular en medio líquido con el fin de producir micelio, que fue lo que se utilizó como inóculo en los experimentos de crecimiento. La producción de micelio se hizo en dos partes: primero se hizo crecer en medio líquido YES modificado (en lugar de 6% de sacarosa tenía 6% de glucosa), se colectó el micelio y se transfirió a otro medio líquido de peptona-sales minerales, en éste último medio, generalmente no produce aflatoxinas. El micelio obtenido en éste último cultivo se utilizó como inóculo.

En la etapa 3 se hizo el estudio del crecimiento y producción de aflatoxinas de la cepa aislada. Se utilizó el micelio para inocular los medios experimentales, en los cuales se varió la fuente de carbono y el contenido de zinc. Se mostraron a las 0, 24, 48, 72, y 96 horas. Se midió la cantidad de aflatoxinas utilizando el HPLC, el

crecimiento del hongo por medición del micelio producido, además se midió el pH del medio como indicador y control.

Etapa 1: Obtención de la Cepa Productora

En la Fig. 6 se presenta el procedimiento a seguir para esta etapa. Se tomó maíz contaminado y colectado en Sonora. Parte de éste se quebró en un molino Thomas Wiley Laboratory Mill, Modelo 4. Se tomó maíz quebrado y sin quebrar. Se seleccionaron trozos que presentaron fluorescencia verde amarilla bajo luz ultravioleta de onda larga (365 nm) para lo cual se empleó la cámara de luz ultravioleta Chromato-Vue modelo CC-20. Se analizaron aproximadamente 5 kg de granos y trozos.

Se enjuagaron semillas de maíz en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por un minuto, luego las semillas se decantaron, posteriormente estas se dejaron en papel esterilizado. Las semillas se pusieron luego en 4 cajas petri conteniendo agar extracto de malta con sal. Los pedazos de maíz que se vieron brillantes en luz ultravioleta se pusieron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por un minuto, luego los pedazos se decantaron, posteriormente estos se pasaron a papel esterilizado. Los pedazos se pusieron luego en 2 cajas

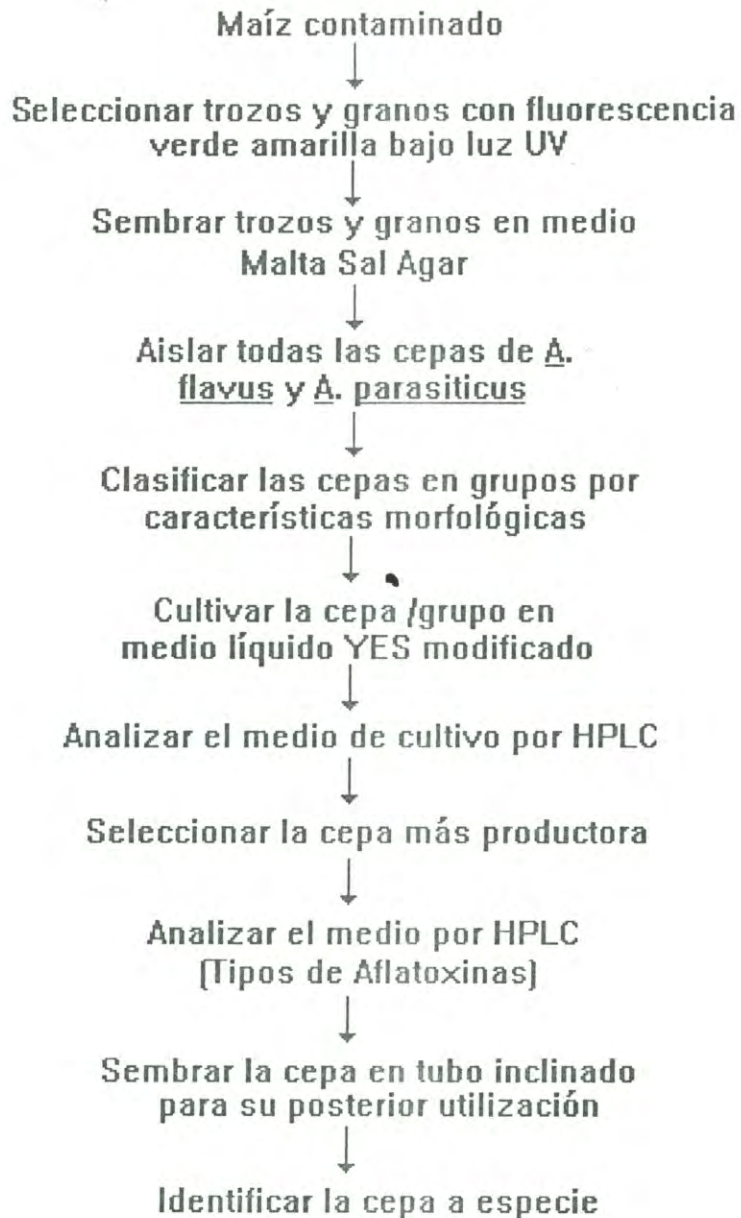


Figura 6. Etapa 1, Obtención de la Cepa Productora de Aflatoxinas.

petri con malta sal agar. El maíz triturado que se vió brillante en luz ultravioleta se le dió el mismo tratamiento que las semillas y los pedazos de maíz. Este se puso en 4 cajas petri con malta sal agar. Las 10 cajas petri que se obtuvieron se pusieron en la incubadora a 27°C, las placas se pusieron sin invertir.

Se aislaron las cepas de A. flavus y A. parasiticus presentes al tomar colonias que crecieron en el maíz entero, quebrado y en pedazos. Estas se sembraron en cajas petri con agar Czapek. Las cajas petri se incubaron a 26°C. Se clasificaron las cepas en grupos por características morfológicas similares. Se cultivaron las cepas en 10 matraces con 100 ml de medio líquido YES modificado con pH ajustado a 5.5. Se inoculó con 1×10^6 esporas por matraz, teniendo 2 matraces por cepa. Estos se incubaron en una incubadora New Brunswick Scientific a la temperatura de 29-33°C a 150 revoluciones por minuto durante 7 días. Luego los matraces se refrigeraron. Posteriormente se separó el líquido obtenido en los matraces del micelio.

El micelio se secó en una estufa de convección a 100-103°C durante 14 horas y media. Obteniendose el peso seco del micelio. El líquido obtenido se extrajo y purificó utilizando columnas de afinidad con anticuerpos.

Posteriormente se evaporaron los viales en una estufa de vacío National Appliance Company. Luego una muestra del líquido obtenido se derivó.

Se analizaron las aflatoxinas del medio de cultivo por HPLC. Posteriormente se confirmaron los resultados de la producción de aflatoxinas de dos cultivos, el cultivo que produjo más aflatoxinas y el cultivo que tuvo mayor número de cepas. Se seleccionó la cepa más productora y se identificó utilizando las claves de Raper y Fennell de (1965) (ver Anexo I).

Etapa 2: Preparación del Inóculo

En la Fig. 7 se presenta el procedimiento a seguir para la preparación del inóculo. A partir del cultivo en tubo inclinado, se sembró en placa en Agar Extracto de Malta que sirvió para obtener una esporulación abundante. Se preparó la suspensión de esporas, para lo cual 3 placas del medio Agar Extracto de Malta se inocularon con esporas de la cepa de A. flavus. Se incubó a 25-29°C por 5 días, se colectaron las esporas en forma aséptica y se suspendieron en agua peptonada al 1% la cual contenía unas gotas de antiespumante tween 80, se diluyó y ajustó hasta obtener una suspensión de 1×10^6 esporas/ml, para lo cual se hizo la cuenta de esporas utilizando un hematocitómetro

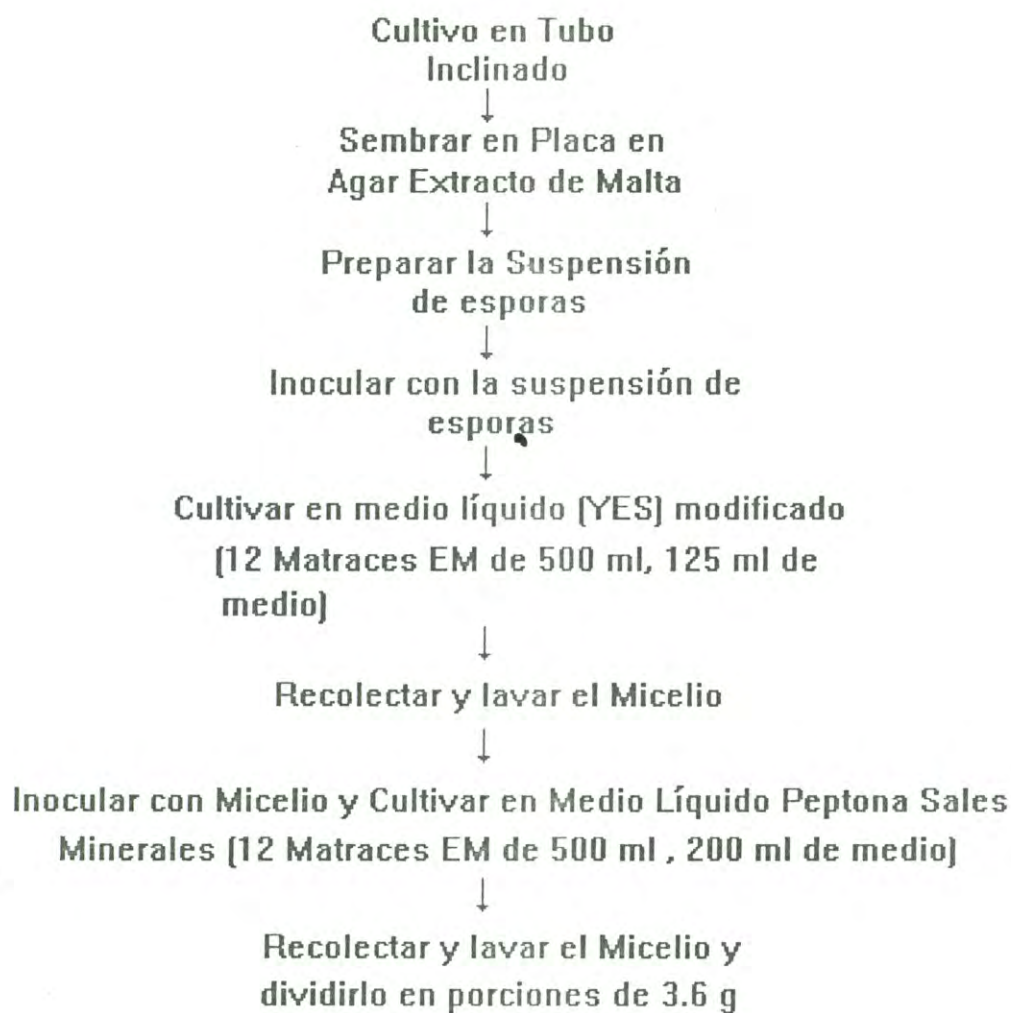


Figura 7. Etapa 2, Cultivo Inicial, Preparación del Inóculo.

(Buchanan y Lewis, 1984). El material anterior, es un portaobjetos con cuadrícula. Para saber el número de esporas que hay en un recipiente, es necesario agregar primero el antiespumante (tween 80) al líquido (para que las esporas se separen) y homogenizarlo. Se tiene que tomar líquido del recipiente con una micropipeta y agregar unas gotas de éste en el portaobjetos. A continuación se observa el portaobjetos en el microscopio. Luego se tiene que contar el número de esporas que hay en 5 cuadrados con cuadrícula. El número obtenido se tiene que multiplicar por el factor de volumen y el factor de dilución. El valor obtenido es igual al número de esporas que hay en un mm^3 . Se hace la conversión a cm^3 .

Doce matraces erlenmeyer (EM) de 500 ml con 125 ml del medio YES modificado (2% de extracto de levadura y 6% de glucosa) se inocularon con 0.5×10^6 esporas (cada matraz). Los matraces se incubaron en una incubadora New Brunswick Scientific con una agitación de (150 rev/min) a 28-29°C por 115 horas. Los pellets de micelio fueron recolectados y filtrados a través de una gasa estéril, enjuagados con una solución de KCl al 0.85% estéril y transferidos a una licuadora estéril que contenía 350 ml de KCl al 0.85% en peso. El micelio se recoletó en una gasa estéril. Después de enjuagarse con KCl al 0.85%, el micelio se dividió en porciones iguales y transferido a 12 matraces EM de 500 ml con 200 ml del medio Peptona-sales

minerales (PMS). Los matraces se incubaron por 24 horas a 26°C en una incubadora New Brunswick Scientific con agitación a 150 rpm. El micelio se recolectó en agua estéril, se enjuagó con KCl al 0.85% y se dividió en las porciones necesarias de 3.6 g c/u (Buchanan y Lewis, 1984).

Etapa 3: Estudio del Crecimiento y Producción de Aflatoxinas en los Medios Experimentales

En la Fig. 8 se presenta el procedimiento para llevar a cabo los experimentos de crecimiento del hongo y la producción de aflatoxinas. Las porciones de 3.6 g obtenidas en el paso anterior se transfirieron a matraces EM de 125 ml que tenían 15 ml de los medios A, B, C y D. El medio A, consistió del medio PMS, donde la peptona se le substituyó por glucosa al 3%. El medio B, consistió del medio PMS, la peptona se substituyó por almidón al 3%. El medio C, consistió del medio A, al que se le quitó todo contenido de zinc. El medio D, consistió del medio PMS, pero la peptona se le substituyó por glucosa al 30%. El Medio de Peptona y sales minerales (PMS), consiste de peptona, 60 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 g; MgSO_4 , 2 g; KH_2PO_4 , 10 g; mezcla de elementos traza y agua, 1000 ml.

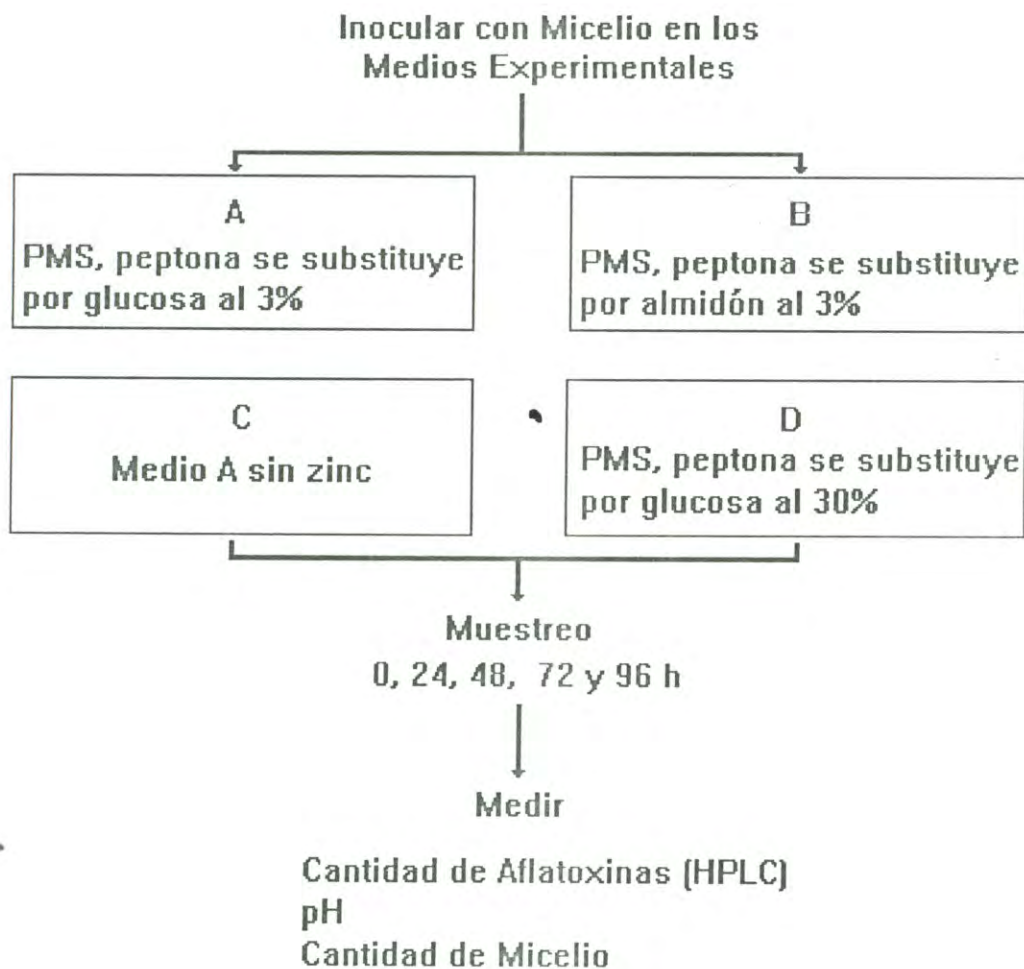


Figura 8. Etapa 3, Estudio del Crecimiento y Producción de Aflatoxinas en los Medios Experimentales.

Los elementos traza Fe, Cu y Mn se adicionaron en el medio de cultivo en cantidades de 1 $\mu\text{g/ml}$ y el calcio en cantidades de 10 $\mu\text{g/ml}$. Para hacer las soluciones de estos elementos se utilizaron FeSO_4 , CuSO_4 , MnSO_4 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y se prepararon en agua. La solución de Zn se preparó utilizando, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.4399 g de ésta sal se disolvieron en una pequeña cantidad de ácido acético glacial y agua, se ajustó el pH de la solución a 5.5 utilizando un potenciómetro Corning pH 2000 plus y el volumen se llevó a 100 ml con agua. El zinc se adicionó en cantidades de 1 $\mu\text{g/ml}$ (Marsh y col., 1975).

Todos los matraces se incubaron sin agitación a 28-29°C. Después de 0, 24, 48, 72 y 96 horas se removieron 2 de los matraces de cultivo de cada uno de los tratamientos y se midió el pH con papel pH Papers Hydrion Micro Essential Laboratory Inc. Cada micelio se recolectó en gasa, se enjuagó con KCl al 0.85%, se secó y pesó. El medio de cultivo se colectó y congeló para el análisis de aflatoxinas por HPLC (Ver Anexo II)(Buchanan y Lewis, 1984).

Determinación de Aflatoxinas por Cromatografía Líquida
de Alta Resolución (HPLC)

Extracción y Purificación

Se utilizó el procedimiento de extracción y purificación del método AFLATEST. En la extracción se tomó 1 ml de medio a analizar y se colocó en la jarra mezcladora. Se agregaron 5 g de cloruro de sodio (NaCl), luego se pusieron 100 ml de solvente de extracción (metanol-agua 80:20), a continuación se cubrió la jarra y se mezcló por un minuto. Se agregaron de 50 a 100 ml del extracto de la muestra cruda en el montaje con el filtro acanalado. Se pasaron 10 ml del extracto de la muestra cruda en un vaso y se diluyeron con 40 ml de agua destilada.

En la purificación se hicieron pasar a presión 10 ml del extracto diluido a través de la columna AFLATEST (columna de afinidad con anticuerpos), a continuación se agregaron 10 ml de agua destilada en el tubo de la jeringa, se pasó el lavado a través de la columna AFLATEST y se lavó la columna nuevamente con 10 ml de agua destilada. Se goteó un ml de metanol grado HPLC en el tubo de la jeringa, se colocó el vial debajo de la salida de la columna, luego se pasó el metanol a través de la columna y se colectó el líquido en el vial.

Derivación

Se secó el líquido en una estufa de vacío National Appliance Company a 60°C. Se agregaron 200^{x5} μl de hexano. Se agregaron 50^{x5} μl de ácido trifluoroacético. Posteriormente se agitó en un agitador vortex por 30 segundos. Se dejó reposar la mezcla por 5 minutos. Se agregaron 1.950^{x5} ml de agua-acetonitrilo (H₂O-CH₃CN) (9-1). Se agitó en el agitador mecánico Thermolyne Maxi Mix por 30 segundos. Se dejaron separar las capas por 10 minutos. Se tomó la fase acuosa. A continuación se filtró con membrana de teflón de 0.5 μm y se inyectaron 100 μl (Park y col., 1990).

A.S.M.M.

Sistema

Esta constituido por una columna C18, un detector de fluorescencia modelo Varian 9070 y una bomba modelo 9012, con capacidad de gradiente ternario. Se empleó la longitud de onda de excitación de 366 nm y la longitud de onda de emisión de 430 nm para el detector.

Condiciones Cromatográficas

Fase Móvil. Consistió de tres solventes: agua con ácido acético al 1% (A), metanol (B) y acetonitrilo (C). El programa de elución se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Programa de Elución Usado en HPLC.

Tiempo (min)	Fase Móvil		
	%A ¹	%B	%C
0	80	5	15
3	80	5	15
7	50	20	30
15	50	20	30

¹ A, agua con ácido acético al 1%, B, metanol y C, acetonitrilo.

Análisis

Inyección. El flujo volumétrico fue de 1.5 ml/min, y el volumen de inyección fue de 100 μ l.

Preparación e Inyección de Estándares. Se prepararon mezclas de las aflatoxinas G-1, G-2, B-1 y B-2, de acuerdo a lo que muestra la Tabla 3. Se tomaron los cuatro viales con las mezclas y se secaron en una estufa de vacío National Appliance Company a 60°C hasta sequedad. Se agregó 200 μ l de hexano. Se agregó 50 μ l de ácido trifluoroacético. Posteriormente se agitó en un agitador mecánico Thermolyne Maxi Mix por 30 segundos. Se dejó reposar la mezcla por 5 minutos. Se agregó 1.95 ml de H₂O-CH₃CN (9-1). Se agitó por 30 segundos. Se dejaron separar las capas por 10 minutos. Se tomó la fase acuosa. A continuación se filtró a través de la membrana de teflón de 0.5 μ m y se inyectaron 100 μ l.

Obtención y Evaluación de Datos. La cuantificación de aflatoxinas se hizo por medio del método de estándar externo. Los datos se obtuvieron en una computadora Acer y se imprimieron en una impresora Panasonic KX-P1121.

Tabla 3. Preparación de las Cuatro Mezclas de Aflatoxinas G-1, G-2, B-1 y B-2 (Estándares).

Vial	Aflatoxinas (ng)			
	B1	G1	B2	G2
1	250	250	125	125
2	500	500	250	250
3	1000	1000	500	500
4	2000	2000	1000	1000

Estandarización de la Técnica de HPLC para Aflatoxinas

Para estandarizar la técnica de HPLC para aflatoxinas se empleó el método del estándar externo. Este consiste en la inyección de un estándar externo a una concentración conocida. Se cuantifica la respuesta del detector y se hace una curva de calibración mediante la inyección de cantidades diferentes del estándar.

Curvas de Calibración

El Anexo III Fig. III-1 muestra la curva de calibración de estándar externo para las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. En el rango de 3.26 a 26.04 ng se observa una respuesta lineal del detector, por lo que se trabajó en ese rango de concentración. El Anexo III Fig. III-2 presenta la curva de calibración de estándar externo para la aflatoxina B1. Se aprecia un coeficiente de regresión alto ($r^2 = 0.9678$). El Anexo III Fig. III-3 muestra la curva de calibración de estándar externo para la aflatoxina B2. Se aprecia también una alta regresión ($r^2 = 0.9579$). El Anexo III Fig. III-4 presenta la curva de calibración de estándar externo para la aflatoxina G1. Se aprecia una alta regresión ($r^2 = 0.9892$). El Anexo III Fig. III-5 muestra la curva de calibración de estándar externo para la aflatoxina G2. Se aprecia una alta regresión ($r^2 = 0.9988$). Para las cuatro aflatoxinas se

obtuvieron r^2 cercanas a uno, lo que aprecia la detección es un comportamiento lineal al aumentar la concentración.

Factor de Respuesta

El factor de respuesta es igual al cociente de la concentración de un compuesto entre el área. Los valores que se obtienen del factor de respuesta se comparan con los picos de interés de la muestra (Macrae, 1982). Para determinar el factor de respuesta se inyectaron diferentes cantidades de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2. Para las aflatoxinas B1 y G1 se inyectaron 6.51, 13.02, 26.04 y 52.08 ng respectivamente, en tanto que para las aflatoxinas B2 y G2 se inyectaron 3.26, 6.51, 13.02 y 26.04 ng. Así mismo, para elaborar la curva de calibración de estándar externo para las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 se determinaron las áreas de los picos de los cromatogramas. El Anexo IV muestra el efecto de la concentración de aflatoxinas en el factor de respuesta del detector de fluorescencia. En el rango de 26 a 52 ng de aflatoxina el factor de respuesta se ve afectado en mayor proporción que en el rango de 3 a 26 ng de aflatoxina. En las aflatoxinas B1 y G1 se tiene mayor factor de respuesta que en las aflatoxinas G2 y B2.

Eficiencia y Resolución

Se determinó la eficiencia de la separación de la columna y la resolución de los picos de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 al usar el HPLC. La resolución se obtuvo sustrayendo el tiempo de retención de dos compuestos, el resultado se multiplica por 2. El resultado se divide entre la adición de las anchuras de banda de los dos compuestos. El número de platos teóricos se obtuvo multiplicando por 5.5 al cociente del tiempo de retención de un compuesto, el cual es dividido por la anchura de banda a la mitad del pico. El cociente obtenido se elevó al cuadrado. El número de platos teóricos es un valor imaginario y da una idea de la eficiencia separativa de una columna (García de Marina y del Castillo, 1988).

En la Tabla 4 se observa la eficiencia de la separación y resolución de los picos de las aflatoxinas G1, B1, G2 y B2 al usar HPLC. Se puede apreciar un valor grande en la cantidad de platos teóricos por lo que se sabe que la columna tiene una gran capacidad de separación. Se puede observar así mismo la altura de platos teóricos. Esta es muy pequeña, por lo que se sabe que la eficiencia de la columna es muy grande. Los datos de resolución indican que la separación entre picos es

Tabla 4. Eficiencia de la Separación y Resolución de los Picos de las Aflatoxinas G1, B1, G2 y B2 Usando HPLC.

Aflatoxina	Tiempos de retención (min)	Número de Platos Teóricos	Altura de Platos Teóricos (mm)
G1	8.7	9690.9	0.0258
B1	9.4	12650.5	0.0198
G2	10.8	38743.3	0.0065
B2	12.0	34407.7	0.0073
Resolución	G1 y B1 1.79	G2 y B2 3.54	B1 y G2 3.87

buena, ya que los valores de resolución fueron mayores que 1.5.

Descripción de la Morfología

Se sembraron 4 cajas petri con agar Czapek, 2 cajas petri con la cepa 43 QV y dos cajas petri con la cepa 47 QV. Estas se pusieron en una incubadora Precision a 28-29°C durante 7 días. Se midieron las colonias de las cepas 43 QV y 47 QV. Se observó el color de las partes aéreas, el micelio, las cabezas conidiales, los esclerocios, la pigmentación del micelio basal (micelio pegado al medio de cultivo), márgenes de colonia y la textura de la colonia. Con ayuda del microscopio (Zeiss) y una escala se midió la célula pie, conidióforo, vesícula y las esporas. Las mediciones en el microscopio fueron 30 por cada parte. Reportandose el valor mínimo, máximo y la media.

Se sembraron 10 cajas petri con agar Czapek de las cepas 43 QV, 44QV, 47QV, 49 QV y 63 EA, 2 cajas petri por cepa. Estas se incubaron en una incubadora Precision a 25-30°C, por 21 días, y se emplearon para confirmar la identificación y tomar fotografías.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Para probar la fuente carbono en el crecimiento y la producción de aflatoxinas se utilizó un diseño de experimentos de un factor con tres niveles los cuales fueron medio A (PMS, peptona se substituyó por glucosa al 3%), medio B (PMS, peptona se substituyó por almidón al 3%) y medio D (PMS, peptona se substituyó por glucosa al 30%). Para probar el efecto del zinc sobre las mismas variables, también se utilizó un diseño de experimentos de un solo factor, pero con dos niveles, los cuales fueron medio A (PMS, peptona se substituyó por glucosa al 3%) y medio C (PMS, peptona se substituyó por glucosa al 3% y no tiene zinc). Las variables respuesta de los experimentos anteriores fueron velocidad de crecimiento, producción máxima de biomasa y máxima producción de aflatoxinas.

• Los datos obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de varianza y se obtuvieron sus niveles de significancia (valor de p). Una prueba fue estadísticamente no significativa (NS), cuando $p > 0.05$ (la hipótesis nula (H_0) no fue rechazada cuando $p > 0.05$). Por otra parte, H_0 fue rechazada cuando $p < 0.05$, siendo el resultado significativo (*) si $0.01 < p < 0.05$ y altamente significativo (**) si $p < 0.01$.

Para observar diferencias entre tratamientos específicos, se usó la prueba de Mínimas Diferencias de Fisher. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el paquete computacional estadístico SAS (SAS, 1988).

RESULTADOS Y DISCUSION

Clasificación de Cepas por Características Morfológicas

Se clasificaron las cepas en grupos por características morfológicas. En la Tabla 5 se observa que se obtuvieron A. flavus Link, A. flavus variedad columnaris y A. parasiticus Speare. Se tuvieron 3 grupos de A. flavus Link, pero con características ligeramente diferentes. El primer grupo presentó esclerocios rápidamente, mientras que, el segundo grupo presentó esclerocios tardíamente (en 5 días). En tanto que el tercer grupo se diferenció de los otros 2 grupos por el color verde fuerte en las colonias. Tal vez se presentaron más cepas del primer grupo, debido a que hubo esclerocios rápidamente. Los esclerocios pudieron proporcionar protección a las células del hongo cuando estaban en el maíz si las condiciones eran desfavorables (Jamieson y Jobber, 1987). Los esclerocios probablemente brindaron mayor posibilidades para sobrevivir. El mayor número de cepas del cultivo 47 QV, se adaptó mejor a las condiciones tanto ambientales como nutricionales presentes cuando se estaba desarrollando el grano. Se obtuvo una cepa de A. flavus variedad columnaris y una cepa de A. parasiticus Speare. Estas dos últimas se presentaron en

Tabla 5. Cepas Obtenidas con Características Morfológicas Similares.

Cultivo ¹	Especie	No. de Cepas	Características distintivas
47 QV	<u>A. flavus</u> Link	34	Presenta esclerocios rápidamente. Colonia color verde claro.
44 QV	<u>A. flavus</u> Link	5	Presenta esclerocios tardíamente (5 días). Colonias color verde claro.
43 QV	<u>A. flavus</u> Link	4	Presenta esterigma uniseriado y biseriado. Hay esclerocios. Tiene un color verde fuerte.
49 QV	<u>A. flavus</u> var. columnaris	1	Verde amarilloso claro.
63 EA	<u>A. parasiticus</u> Speare	1	Verde fuerte azulado.

1 Sembrado en medio Czapek incubado a 26-27°C.

pequeñas cantidades tal vez por que se adaptaron poco a las condiciones ambientales y nutricionales cuando se estaba desarrollando el grano de maíz.

Crecimiento y Producción de Aflatoxinas de las Cepas

Representativas

Las cepas seleccionadas fueron 47 QV A. flavus Link, 44 QV A. flavus Link, 43 QV A. flavus Link, 49 QV A. flavus variedad columnaris y 63 EA A. parasiticus Speare. La letra Q significa que el hongo fue aislado de maíz quebrado y la letra V significa que las colonias eran de color verde. En tanto que la letra E significa que el hongo fue aislado de maíz entero y la letra A significa que la colonia era de color verde azulosa. Se puede observar que fueron tres los cultivos QV con A. flavus Link, lo anterior tal vez se debió a que este hongo se adaptó mejor adentro del grano y se desarrolló mejor cuando estuvo con poca competencia de otros microorganismos. A. parasiticus Speare se obtuvo de maíz entero, lo anterior tal vez se debió a que el hongo no se afectó tanto con la competencia con otros microorganismos o a que este necesitó mayor nutrientes y se desarrolló cerca del germen. En la Tabla 6 se observa la cuantificación del crecimiento por peso seco del micelio de las cepas representativas de grupos con características

Tabla 6. Cuantificación de Crecimiento¹ de las Cepas Representativas de Grupos con Características Morfológicas Similares.

Cultivo	Especie	Micelio Peso seco (g)
47 QV	<u>A. flavus</u> Link	1.6410
44 QV	<u>A. flavus</u> Link	1.4715
43 QV	<u>A. flavus</u> Link	2.0303
49 QV	<u>A. flavus</u> var. columnaris	2.3383
63 EA	<u>A. parasiticus</u> Speare	0.5983

1 Cultivado en medio líquido YES modificado, agitado a 150 rpm a 29-33°C y por 7 días.

morfológicas similares. La mayor cantidad de micelio la produjo A. flavus variedad columnaris, en tanto que la menor cantidad de micelio la produjo A. parasiticus Speare. El valor del micelio producido es característica de cada especie (Crueger y Crueger, 1990). La cantidad de micelio en los cultivos 47 QV, 44 QV y 43 QV con A. flavus Link son diferentes. Esto se puede esperar ya que la producción se da en rangos y no en forma puntual.

En la Tabla 7 se observa la producción de aflatoxinas de las mismas cepas. El cultivo 43 QV de A. flavus Link presentó mayor producción de aflatoxinas; sobresaliendo la producción de la aflatoxina B1. El segundo lugar en producción de aflatoxinas resultó A. flavus variedad columnaris, sobresaliendo también la producción de aflatoxina B1. Tal vez esta aflatoxina se produjo en mayor cantidad ya que se asume que las aflatoxinas B2, G1, G2, M1 y M2 se sintetizan a partir de la aflatoxina B1 (Dutton, 1988). Los cultivos 47 QV y 44 QV con A. flavus Link presentaron una producción de aflatoxina similar. A. parasiticus Speare fue la especie que presentó menos producción de aflatoxinas. Hesseltine y col. (1970), mencionan que A. parasiticus por lo general produce grandes cantidades de aflatoxinas, aunque en maíz las cepas productoras que se han reportado son A. flavus

Tabla 7. Producción de Aflatoxinas¹ de las Cepas Representativas de Grupos con Características Morfológicas Similares.

Cultivo	Especie	Producción de Aflatoxinas				
		B1	B2	G1	G2	Total
		(ng/ml)				
47 QV	<u>A. flavus</u> Link	3.6	2.2	4.0	2.6	12.4
44 QV	<u>A. flavus</u> Link	3.6	3.2	3.4	4.6	14.8
43 QV	<u>A. flavus</u> Link	1216.8	53.4	34.4	53.8	1358.4
49 QV	<u>A. flavus</u> var. columnaris	218.6	0.6	3.6	0.8	223.6
63 EA	<u>A. parasiticus</u> Speare	3.4	1.0	3.8	1.6	9.8

1 Cultivado en medio líquido YES modificado, agitado a 150 rpm a 29-33°C y por 7 días.

(Payne, 1983). El cultivo 43 QV produjo más aflatoxinas que los cultivos 44 QV y 47 QV. Esto se debió posiblemente a que el cultivo 43 QV tuvo bloqueadas ciertas vías de biosíntesis o presentó alterados sistemas que regulan la síntesis. A. parasiticus Speare tal vez produjo pocas aflatoxinas por que no tuvieron bloqueadas ciertas vías de síntesis y se sintetizaron en mayor cantidad otros metabolitos (Crueger y Crueger, 1984).

Posteriormente se confirmaron los resultados de la producción de aflatoxinas de dos cultivos. El cultivo que produjo más aflatoxina (43 QV) y el cultivo que tuvo mayor número de cepas (47 QV). En la Tabla 8 se observa la confirmación de los resultados de la producción de aflatoxinas en los cultivos 43 QV y 47 QV. El cultivo 43 QV con A. flavus Link produjo gran cantidad de aflatoxinas (1133.4 ng/ml), en tanto que el cultivo 47 QV con A. flavus Link produjo trazas de aflatoxinas. Se puede observar que los resultados obtenidos en la primera y segunda determinación fueron muy parecidos.

Tabla 8. Confirmación de los Resultados de Producción de Aflatoxinas en Cultivos en Medio YES Modificado.

Cultivo	Especie	Producción de Aflatoxinas				
		B1	B2	G1	G2	Total
		(ng/ml)				
43 QV	<u>A. flavus</u> Link	1109.2	7.0	17.2	T ¹	1133.4
47 QV	<u>A. flavus</u> Link	T	T	T	T	T

1 T= Trazas

Descripción de la Morfología

Colonia 43 QV

Las colonias presentaron un diámetro promedio de 5.50 cm a los 7 días. Las cabezas conidiales del centro de la colonia fueron color verde oscuro, las cabezas conidiales alrededor del centro de la colonia fueron color verde claro amarilloso. El micelio presente fue algodonoso. Las cabezas conidiales fueron arboreas y columnares. Al séptimo día no había esclerocios, en tanto que al octavo día se presentaron esclerocios blancos que posteriormente cambiaron a color café oscuro. La pigmentación del micelio basal fue blanco. Los márgenes de la colonia fueron difundidos. La textura de la colonia fue granulosa de color verde en el centro rodeado por un borde blanco.

La célula pie midió de 25 a 100 μm con una media de 40.33 μm . El conidióforo midió 180 a 1620 μm de largo con una media de 674 μm . La vesícula fue subglobosa, ésta midió de 20 a 55 μm con una media de 37.5 μm . Los esterigmas fueron uniseriados y biseriados, predominando los primeros. Las esporas fueron equinuladas, éstas midieron de 4 a 6 μm con una media de 4.53 μm (Tabla 9, Fig. 9 y 10). Las medidas del conidióforo, vesícula y esporas están dentro de los rangos de las Claves de Raper y Fennell (1965).

Tabla 9. Dimensiones Estructurales de las Cepas 43 QV y 47 QV.

Cepa 43 QV	Mínimo-Máximo Media (μm)			Raper y Fennell (1965) (μm)
Estructura				
Célula pie	25	100	40.33	--
Conidióforo	180	1620	674.00	Usualmente menos de 1000
Vesícula	20	55	37.50	10-65
Conidio o espora	4	6	4.53	3-6
Cepa 47QV	Mínimo-Máximo Media (μm)			Raper y Fennell (1965) (μm)
Estructura				
Célula pie	10	65	40.00	--
Conidióforo	120	1120	697.33	Usualmente menos de 1000
Vesícula	15	55	38.83	10-65
Conidio o espora	2	6	4.07	3-6



Figura 9. Cabezuela a 400X de la cepa 43 QV (A. flavus Link).



Figura 10. Esporas a 1000X de la cepa 43 QV (A. flavus Link).

Colonia 47 QV

Las colonias presentaron un diámetro promedio de 5.46 cm a los 7 días. Las cabezas conidiales centrales fueron color verde claro, mientras que las cabezas conidiales más externas fueron de color verde claro amarilloso. El micelio presente fue de color blanco. Las cabezas conidiales fueron arboreas y columnares. Había esclerocios blancos que posteriormente cambiaron su color a café oscuro. La pigmentación del micelio basal fue blanco. Los márgenes de la colonia fueron difundidos. La textura de la colonia fue granulosa color verde en el centro y rodeado por un borde blanco. La célula pie midió de 10 a 65 μm con una media de 40 μm . El conidióforo midió de largo 120 a 1120 μm con una media de 697.33 μm . La vesícula que presentó esta colonia fue en forma globosa, la cual midió de 15 a 55 μm con una media de 38.83 μm . Los esterigmas fueron uniseriados y biseriados, sobresaliendo los segundos. Las esporas fueron equinuladas, alcanzando estas 2 a 6 μm con una media de 4.07 μm (Tabla 9, Fig. 11-14). Lo que midió el conidióforo y la vesícula están dentro de los rangos de las Claves de Raper y Fennell (1965).

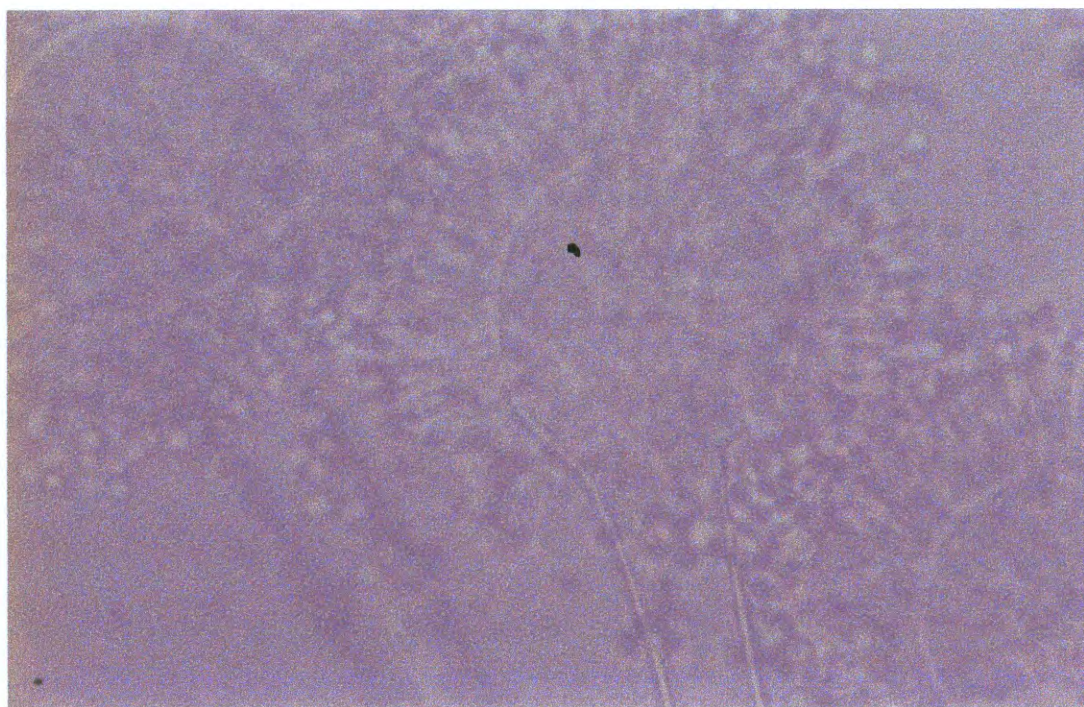


Figura 11. Cabezuelas a 400X de la cepa 47 QV (A. flavus Link).



Figura 12. Cabezuelas a 100X de la cepa 47 QV (A. flavus Link).



Figura 13. Célula pie a 400X de la cepa 47 QV (A. flavus Link).

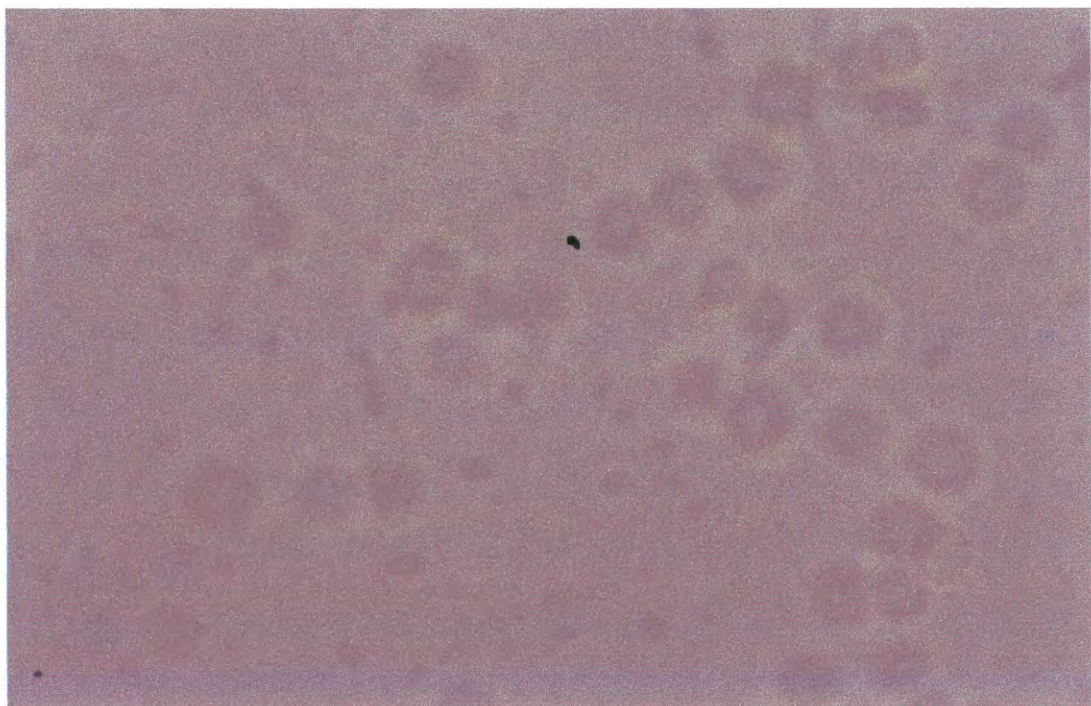


Figura 14. Esporas a 1000X de la cepa 47 QV (A. flavus Link).

Colonia 44 QV

Las colonias en el centro presentaron un color verde claro, mientras que alrededor fue de color blanquecino. Las vesículas se mostraron en forma globosa, los esterigmas fueron uniseriados y biseriados, sobresaliendo los segundos. Al séptimo día no había esclerocios y las esporas fueron equinuladas (Fig. 15). Las características son de A. flavus Link.

Colonia 49 QV

Colonia en el centro de color verde claro y alrededor de color blanco. Vesículas subglobosas, esterigmas uniseriados. Al séptimo día no había esclerocios y las esporas fueron equinuladas (Fig. 16-18). Por las características se sabe que es A. flavus variedad columnaris.

Colonia 63 EA

Colonia color verde oscuro en el centro y alrededor de color blanco. Vesículas subglobosas o con forma de mano de mortero, esterigmas uniseriados. Al séptimo día no había esclerocios y las esporas fueron equinuladas (Fig. 19 y 20). Las características corresponden a A. parasiticus Speare.

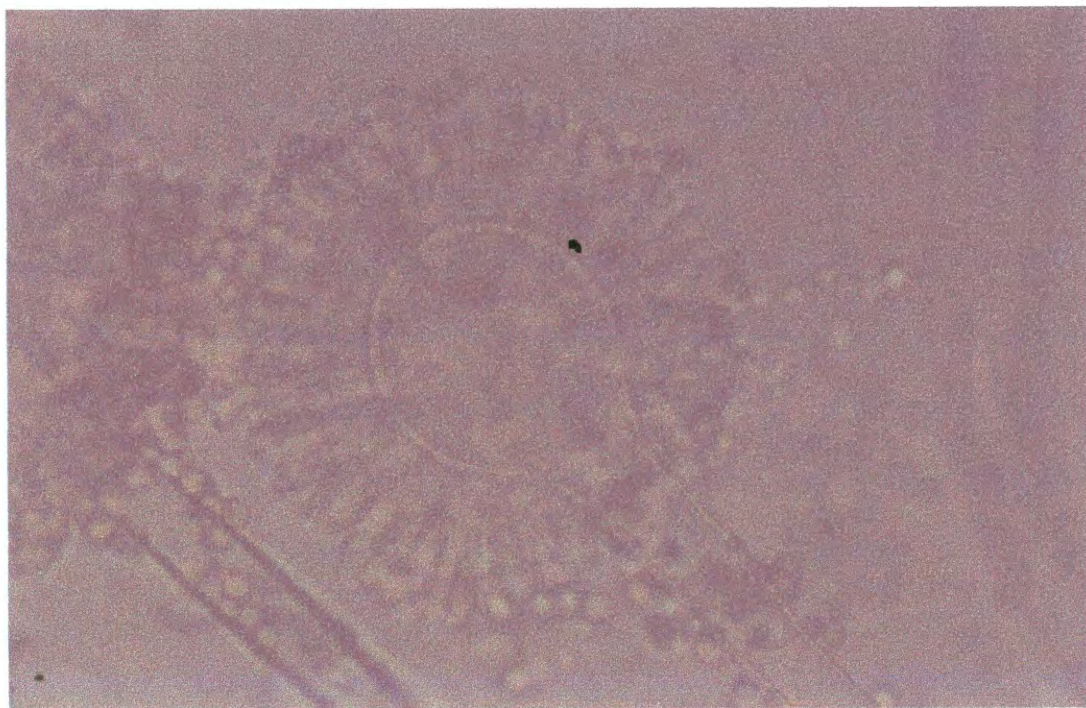


Figura 15. Cabezuelas a 400X de la cepa 44 QV (A. flavus Link).



Figura 16. Cabezuelas a 100X de la cepa 49 QV (A. flavus variedad columnaris).

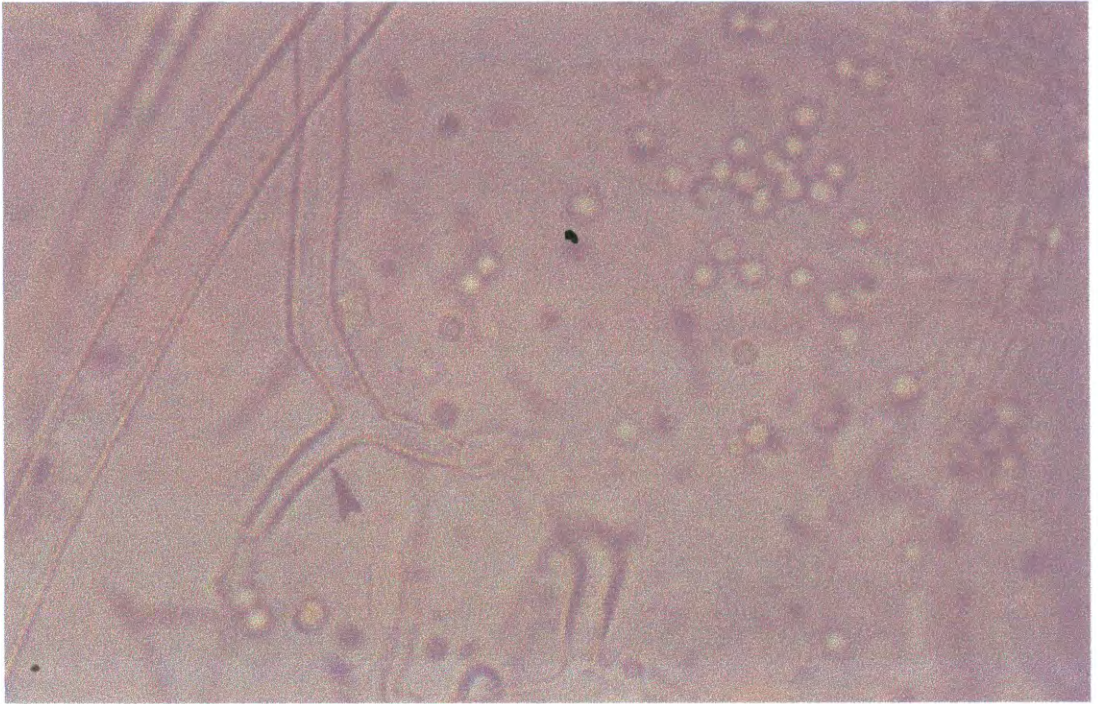


Figura 17. Célula pie a 400X de la cepa 49 QV (A. flavus variedad columnaris).

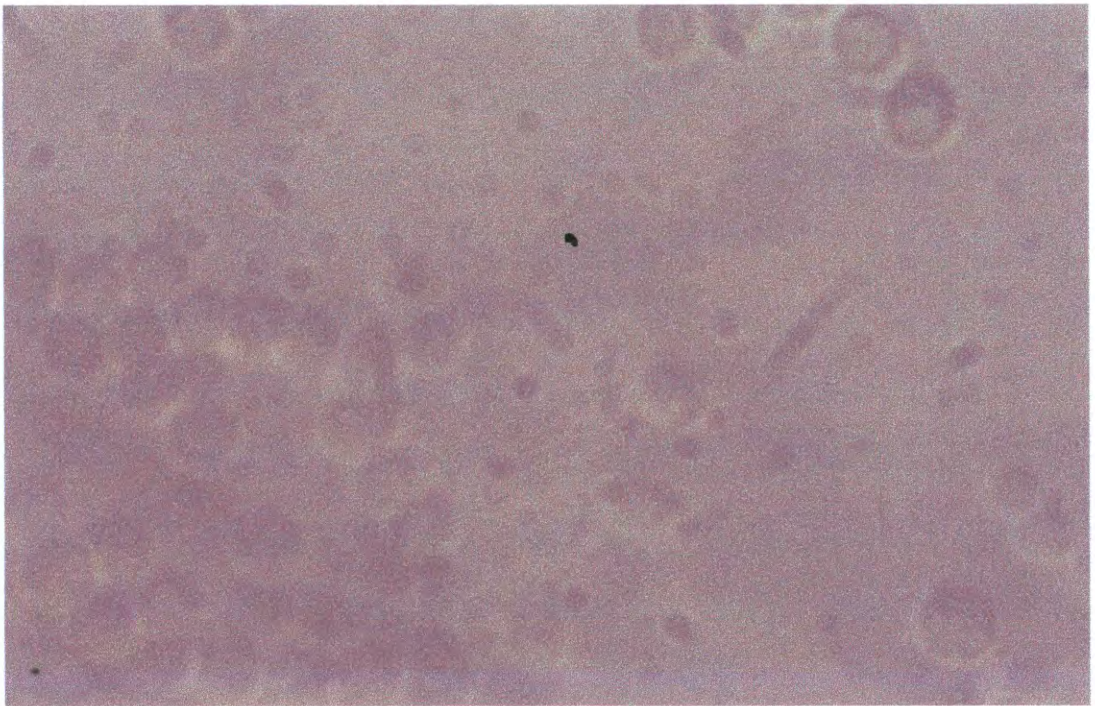


Figura 18. Esporas a 1000X de la cepa 49 QV (A. flavus variedad columnaris).

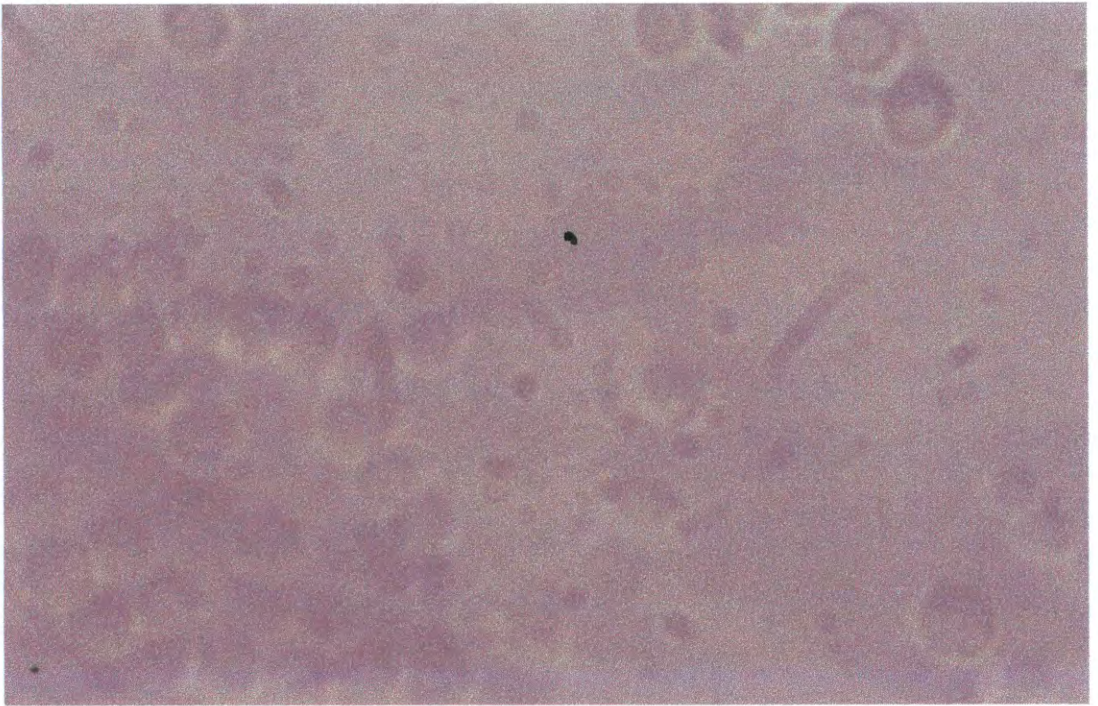


Figura 18. Esporas a 1000X de la cepa 49 QV (A. flavus variedad columnaris).



Figura 19. Cabezuela a 1000X de la cepa 63 EA (A.
parasiticus Speare).

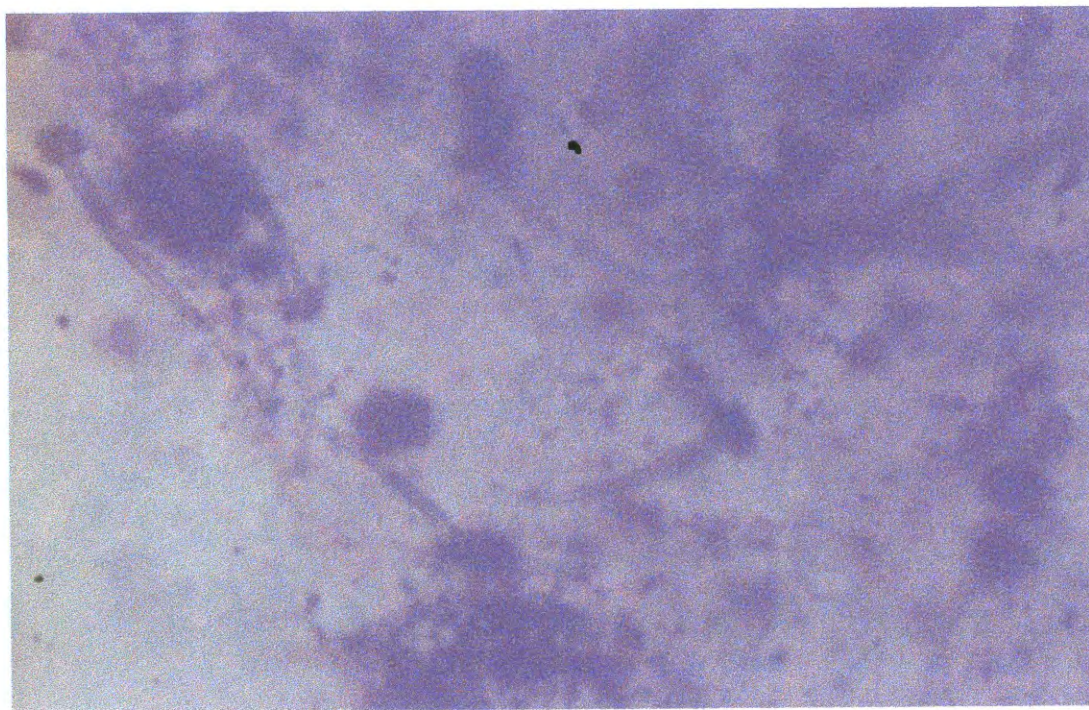


Figura 20. Conidióforos a 100X de la cepa 63 EA (A. parasiticus Speare).

Caracterización del Crecimiento y

Producción de Aflatoxinas

Crecimiento y Producción de Aflatoxinas en los Medios Experimentales

El análisis estadístico en los parámetros pH, micelio, aflatoxinas totales, aflatoxina G1, aflatoxina B1, aflatoxina G2, aflatoxina B2 y aflatoxinas totales sobre micelio se hizo con los datos a las 48, 72 y 96 horas, ya que antes no se observaron diferencias importantes (Tablas 10 y 11).

Cambios en pH. La Fig. 21 muestra la variación del pH en los cuatro medios de cultivo utilizados. Al realizar el análisis estadístico se observó que las diferencias fueron altamente significativas ($p < 0.01$). No se observaron diferencias significativas entre el medio con glucosa al 3% y el medio con glucosa al 3% sin zinc ($p > 0.05$). El medio con almidón al 3% y el medio con glucosa al 30% presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). El pH en el medio con glucosa al 3% cambió de 6 a 7 conforme transcurrió el tiempo. El aumento en el pH en el medio de cultivo sugiere que hubo catabolismo de aminoácidos (Wiseman y Buchanan, 1987). Por otra parte, se puede apreciar que la variación del pH en el medio con almidón

Tabla 10. Análisis de Varianza, Cuadrados Medios, para los Parámetros pH, Micelio, Aflatoxinas Totales, Aflatoxina G1, Aflatoxina B1, Aflatoxina G2, Aflatoxina B2, Aft/Mic en las Pruebas de Crecimiento y Producción de Aflatoxinas de la Cepa 43 QV.

	Cuadrado Medio	F
pH		
Error	0.32	35.96 **
Micelio		
Error	0.01	108.20 **
Af. Totales		
Error	876942.78	9.79 **
Af. G1		
Error	14.31	2.57 ns
Af.*B1		
Error	815828.88	9.44 **
Af. G2		
Error	7.89	5.81 *
Af. B2		
Error	2267.56	9.23 **
Aft/Mic		
Error	5126700.81	5.11 *

ns= No significativo; * = Significativo ($p < 0.05$);

**= Muy significativo ($p < 0.01$). Grados de Libertad del Error para todos los parámetros medidos fue de 20.

Tabla 11. Análisis de Varianza, Cuadrados Medios, para los Parámetros Velocidad de Crecimiento, Máxima Producción de Aflatoxinas y Producción Máxima de Biomasa en las Pruebas de Crecimiento y Producción de Aflatoxinas de la Cepa 43 QV.

	Cuadrado Medio	F
Velocidad de Crecimiento		
Error	1.9×10^{-7}	226.94 **
Máxima Producción de Aflatoxinas		
Error	500760.97	8.53 *
Producción Máxima de Biomasa		
Error	9.5×10^{-4}	255.25 **

Grados de Libertad del Error para todos los parámetros medidos fue de 4.

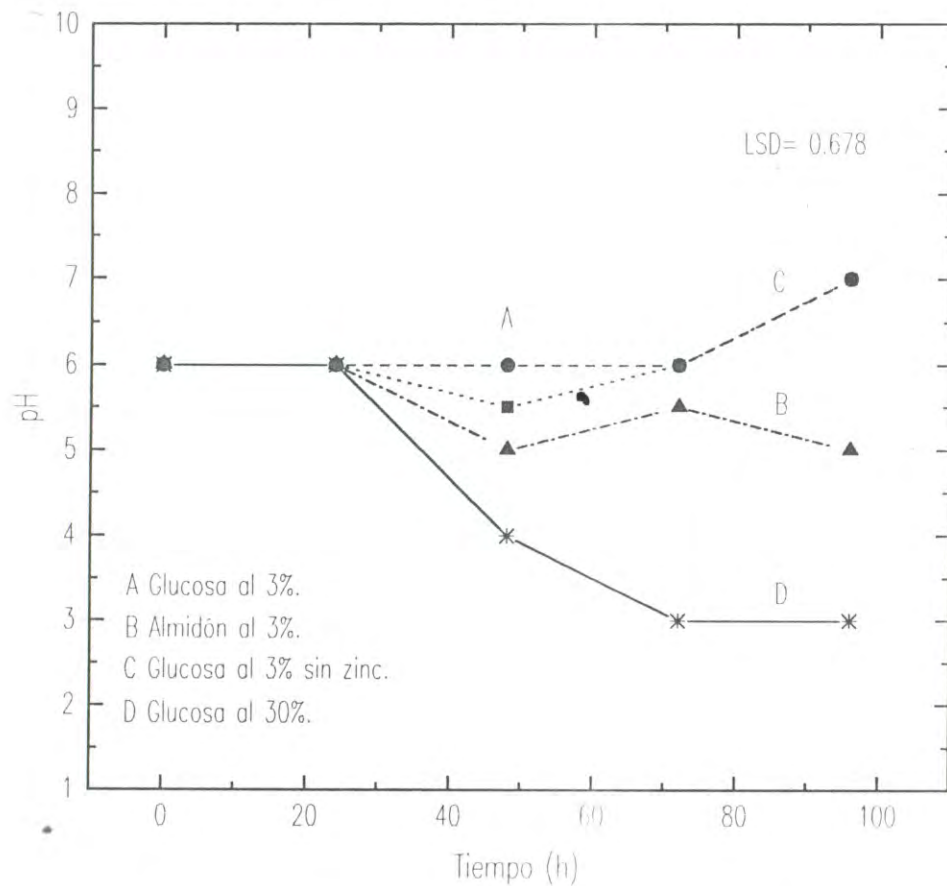


Figura 21. Variación del pH en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.

al 3% tiende a disminuir. Observandose ligeros cambios en este y fluctuando entre 6 y 5. La disminución del pH se puede explicar con el empleo de los iones amonio por el hongo. Al emplear estos se adicionan protones al medio, por lo que se presenta la disminución del pH (Wang y col., 1979). En cambio, en el medio con glucosa al 3% y sin zinc, el pH también estuvo fluctuando, pero en forma contraria al anterior; es decir entre 6 y 7.

La variación del pH de 5.5 a 7 sugiere que hubo catabolismo de aminoácidos (Wiseman y Buchanan, 1987). El empleo de aminoácidos indica que no se encontraba glucosa disponible para metabolizar. Posiblemente, los metabolitos formados para que el pH pasara de ácido a neutro son aminas (Arnaud y Guiraud, 1985). Por último, el medio con glucosa al 30%, cambió su pH de 6 a 3. Esta disminución sugiere que la glucosa se catabolizó a ácidos orgánicos en la glucólisis. Los ácidos orgánicos que se pueden haber formado son ácido acético y láctico (Wiseman y Buchanan, 1987; y Griffith, 1982).

Cuantificación del Crecimiento. En la Fig. 22 se muestra la variación del peso del micelio en los medios de cultivo. Al llevar a cabo el análisis estadístico se observaron diferencias altamente significativas ($p < 0.01$).

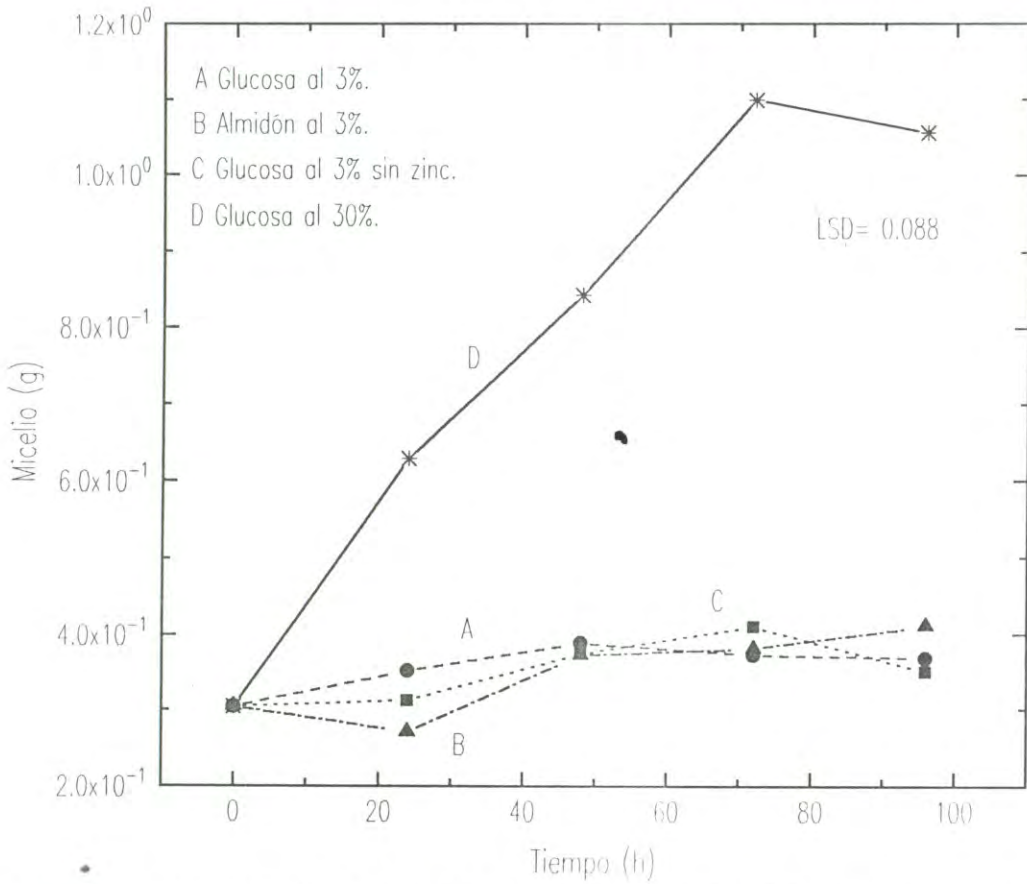


Figura 22. Variación del Peso del Micelio en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.

Los medios con glucosa al 3%, con almidón al 3% y el medio con glucosa al 3% sin zinc no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). El medio con glucosa al 30% presentó mayor producción de micelio que los otros 3 medios. Luchese y Harrigan (1993) mencionan que el máximo crecimiento de A. parasiticus se presenta cuando el medio empleado tiene 10% de glucosa. Por lo que, tal vez si se hubiera realizado el experimento con glucosa al 10% en lugar de 30% se hubiera tenido mayor crecimiento.

El peso del micelio en el medio con glucosa al 3% y el medio con glucosa al 3% sin zinc no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Por lo que se observó que la deficiencia del zinc no afectó en la producción de micelio. Marsh y col., (1975) observaron que el zinc añadido de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$ en el medio incrementa el peso del micelio en menos de 3 veces. En el presente experimento se observó que al añadir zinc de 0 a 1 $\mu\text{g/ml}$ en el medio, no se presentaron diferencias significativas en el incremento del peso.

El peso del micelio en el medio con glucosa al 3% y el medio con almidón al 3% no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). Por lo que se ve que las cadenas en el almidón afectaron poco en el peso del micelio. El peso del micelio en el medio con glucosa al

3% y el peso del micelio en el medio con glucosa al 30% presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). Por lo que se ve que la concentración mayor de glucosa favoreció el crecimiento del hongo. A mayor concentración de glucosa la tasa de crecimiento específico aumenta, pero hasta cierto límite.

De 400 a 500 gramos de glucosa sobre litro el crecimiento en la mayoría de los microorganismos no se realiza. La tasa de crecimiento específico es igual al cociente del diferencial de la concentración microbiana sobre la diferencial del tiempo multiplicada por el recíproco de la concentración microbiana (Leveau y Bouix, 1985).

Velocidad de Crecimiento. Se midió la velocidad de crecimiento en la etapa logarítmica, con excepción del experimento en el medio con almidón al 3%. En esta última no se hizo así, ya que la velocidad de crecimiento disminuyó a las 24 horas en lugar de aumentar como en los otros medios. La velocidad de crecimiento es la pendiente de la curva de crecimiento en ese período. Al hacer el análisis estadístico se tuvo que las diferencias fueron altamente significativas ($p < 0.01$). El medio con glucosa al 3%, almidón al 3% y glucosa al 3% sin zinc no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). La

velocidad en el medio con glucosa al 30% fue significativamente diferente ($p < 0.05$) (Tabla 12).

La velocidad de crecimiento en el medio con glucosa al 30% fue mayor que en los otros medios, esto se debió posiblemente en parte a que el hongo tenía mucha energía y se presentó la síntesis de glucógeno. Ya que cuando se tiene mucha energía en las células se produce glucosa-6-fosfato y el compuesto anterior promueve la síntesis de glucógeno (Changeux y Blangy, 1981). En los medios con glucosa al 3%, almidón al 3% y glucosa al 3% sin zinc la velocidad de crecimiento fue similar.

La velocidad de crecimiento depende de la concentración de los compuestos que son necesarios para el crecimiento del microorganismo. A medida que se aumenta la concentración de un substrato, en este caso glucosa, se aumenta la velocidad de crecimiento hasta que se llega a un valor máximo (Leveau y Bouix, 1985). Por ejemplo, el crecimiento máximo específico en A. nidulans a 30°C es 0.215h^{-1} (Crueger y Crueger, 1990). El medio con glucosa al 3% y el medio con glucosa al 3% con zinc dieron la velocidad similar. Por lo que se ve que la eliminación del zinc afecta poco en la velocidad de crecimiento.

Tabla 12. Valores de Velocidad de Crecimiento, Producción Máxima de Biomasa, Máxima Producción de Aflatoxinas y Máxima Producción de Aflatoxinas por g de Micelio en las Pruebas de Crecimiento y Producción de Aflatoxinas de la Cepa 43 QV.

Medio	Velocidad de Crecimiento	Producción Máxima de Biomasa	Máxima Producción de Aflatoxinas	Máxima Producción de Aflatoxinas por g de Micelio
	(g/h) x 10 ⁻²	(g)	(ng/ml)	(ng/ml/g)
Glucosa al 3%	0.18 b ¹	0.3883 b	3927.5 a	8479.7 a
Almidón al 3%	0.14 b	0.4109 b	1620.7 b	3879.2 b
Glucosa al 3% sin zinc	0.16 b	0.4100 b	1187.0 b	3174.6 b
Glucosa al 30%	1.08 a	1.0991 a	3905.9 a	4636.0 b

¹ Valores con la misma letra no son diferentes significativamente.

El medio con almidón al 3% presentó parecida la velocidad de crecimiento al medio con glucosa al 3%. Pero el micelio en el medio con el almidón al 3% a las 24 horas presentó disminución en el peso del micelio, pero de las 24 a las 48 horas aumentó el peso del micelio. Además, tuvo el peso casi igual al micelio que creció en el medio con glucosa al 3% y glucosa al 3% sin zinc. Crueger y Crueger (1990), mencionan que la tasa de crecimiento específico de microorganismos para compuestos simples por ejemplo glucosa, es mayor que para compuestos poliméricos.

Producción Máxima de Biomasa. Al hacer el análisis estadístico, se observó que las diferencias fueron altamente significativas ($p < 0.01$). El medio con glucosa al 3%, almidón al 3% y glucosa al 3% sin zinc no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). En tanto que el medio con glucosa al 30% presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto a los otros (Tabla 12).

En el medio con glucosa al 30% se presentó la mayor producción de biomasa, ya que la velocidad de crecimiento del hongo en este medio fue más elevado que en los otros medios. También se debió posiblemente, a que cuando se elevó la concentración de glucosa en el medio, se tuvieron más intermediarios provenientes de la glucólisis y la vía

de la pentosa fosfato. Al haber más intermediarios, el hongo pudo crecer y aumentar de peso con mayor facilidad (McCullough, Payton y Roberts, 1977).

La producción máxima de biomasa en el medio con glucosa al 3% se tuvo a las 48 horas tal vez por que el hongo utilizó más rápido el compuesto. El medio con glucosa al 3% sin zinc la presentó a las 72 horas tal vez el hongo empleó lentamente el carbohidrato. El medio con glucosa al 30% presentó la producción máxima de biomasa a las 72 horas tal vez por que era más glucosa que el primer medio mencionado y se tardo más el hongo en emplearla. En tanto que el medio con almidón al 3% la presentó a las 96 horas, esto posiblemente se deba a que el hongo tardo más en metabolizar el compuesto.

Producción de Aflatoxinas Totales. La Fig. 23 muestra la producción de las aflatoxinas totales en los medios de cultivo. Al hacer el análisis estadístico se observó que las diferencias fueron altamente significativas ($p < 0.01$). El medio con glucosa al 3% y el medio con glucosa al 30% no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). El medio con almidón al 3% y el medio con glucosa al 3% sin zinc no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

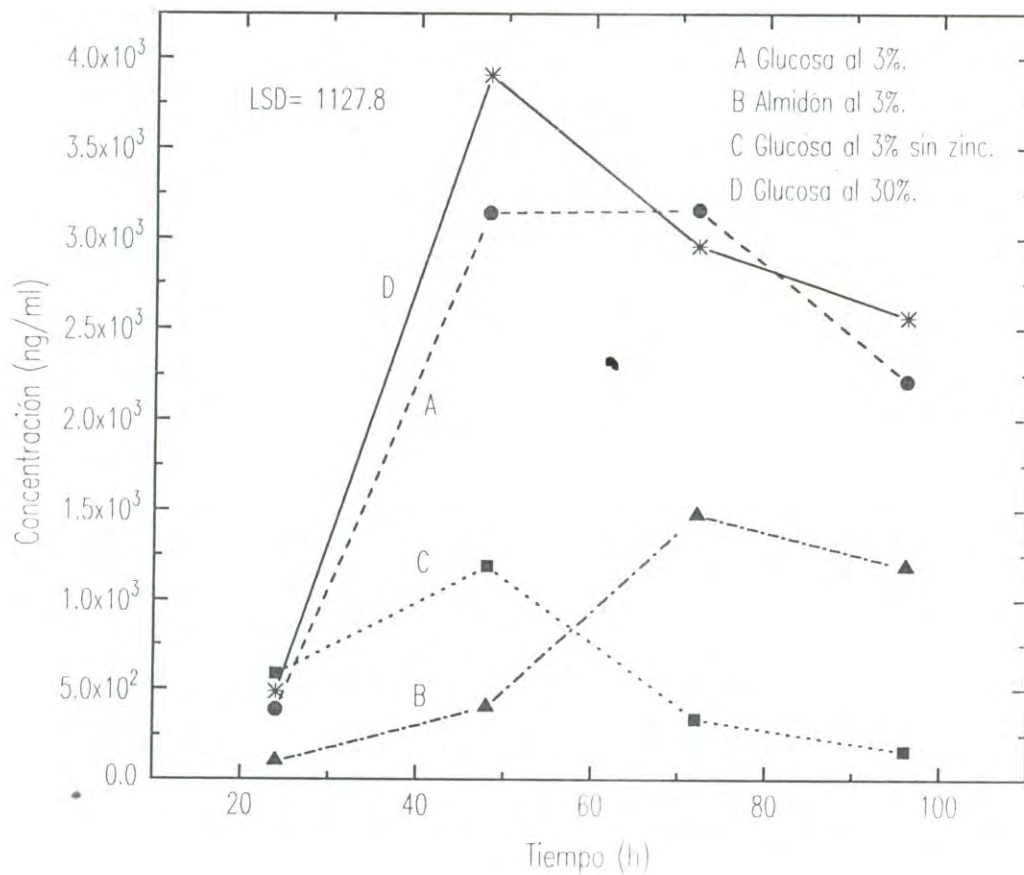


Figura 23. Producción de las Aflatoxinas Totales en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.

El medio con glucosa al 3% y el medio con glucosa al 30% presentaron mayor producción de aflatoxinas totales que el medio con almidón al 3% y el medio con glucosa al 3% sin zinc. Luchese y Harrigan (1993) citan que grandes producciones de aflatoxinas requieren de altos niveles de azúcar. Así como que la máxima producción de aflatoxinas en A. parasiticus se presenta cuando el medio empleado tenía 30% de glucosa. En tanto que Crueger y Crueger (1984) enuncian que la producción de los metabolitos secundarios se inhiben con fuentes de carbono que se emplean en forma rápida, especialmente glucosa. Applebaum y Buchanan (1979) observaron en A. parasiticus una máxima acumulación de aflatoxina en el punto de máxima producción de micelio y que la producción de aflatoxina se da cuando se tiene un acelerado uso de glucosa.

Existe la posibilidad de que se produjeron más aflatoxinas totales en el medio con glucosa al 30%, pero que se transformaron en mayor cantidad a las aflatoxinas del tipo M que los otros medios. Lo anterior se presentó posiblemente por el cambio del pH a 3 en el medio.

Las aflatoxinas totales en el medio con glucosa al 3% fue mayor que las aflatoxinas totales en el medio con glucosa al 3% sin zinc, por lo que se observa que con la ausencia de zinc disminuye la producción de estas.

Rao y col., (1980) citan que en A. parasiticus la deficiencia de zinc hace que disminuyan los niveles de las aflatoxinas en forma marcada, cuando estos se desarrollan en el medio con sacarosa bajo en sales. Además, Marsh y col., (1975) mencionan que el zinc añadido de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$ en el medio incrementa la producción de aflatoxinas de 30 a 1000 en A. parasiticus y que el zinc en cantidades de 25 $\mu\text{g/ml}$ disminuye la producción de aflatoxinas.

El zinc es importante en la síntesis de aflatoxinas ya que éste metal en forma de Zn^{2+} se necesita como cofactor en la enzima ácido norsolorínico deshidrogenasa. Esta enzima transforma el ácido norsolorínico a averantin. El averantin es un compuesto intermediario en la síntesis de la aflatoxina B1 (Dutton, 1988).

En los medios con glucosa al 3% y almidón al 3% se observó que el peso del micelio fue similar, pero la producción de aflatoxina total fue mayor en el primer medio. La diferencia en la producción de aflatoxinas puede ser debido a que la primera cepa empleó glucosa desde el principio, y después de las 72 horas utilizó aminoácidos de el propio hongo. Al emplear glucosa se llega en forma casi directa a la producción del acetyl-CoA, precursor en la síntesis de las aflatoxinas (Mathews y van Holde, 1990; y Steyn y col., 1980). El aumento del

pH a 7 puede explicarse por la formación de aminos a partir de los aminoácidos. En tanto que la segunda cepa posiblemente empleó tanto almidón como sulfato de amonio para crecer y producir aflatoxinas. La variación del pH de 6 a 5 se puede explicar con el empleo de los iones amonio por el hongo (Wang y col., 1979).

El ión amonio no llega a la producción del acetil-CoA en la forma tan directa como la glucosa. Además el camino metabólico para llegar al acetil-CoA tiene muchas ramificaciones al emplear el ión amonio (Kinghorn y Pateman, 1977; y McCullough y col., 1977).

Máxima Producción de Aflatoxinas. Al realizar el análisis estadístico se observó que las diferencias en la máxima producción de aflatoxinas fueron significativas ($p < 0.05$). El medio con glucosa al 3% y el medio con glucosa al 30% no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). El medio con almidón al 3% y el medio con glucosa al 3% sin zinc no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) (Tabla 12).

El medio con glucosa al 3% y el medio con glucosa al 30% presentaron mayor producción de aflatoxinas que los otros dos medios. En el medio con glucosa al 3% y en el

medio con almidón al 3% se presentó la máxima producción de aflatoxinas a las 72 horas.

Por otro lado en el medio con glucosa al 3% sin zinc y el medio con glucosa al 30% se presentó la máxima producción de aflatoxinas a las 48 horas. La máxima producción de aflatoxinas en los cuatro medios se presentó a las 48 o 72 horas. Se podría esperar que a medida que pasa el tiempo la cantidad de aflatoxinas fuera mayor. Lillehoj (1987), cita que *Aspergillus* spp. puede presentar síntesis y degradación de aflatoxinas. Lo anterior puede dar idea de por que la máxima producción de aflatoxinas no se presentó a las 96 horas. La disminución de las aflatoxinas totales después de llegar al máximo en los 4 medios tal vez se debió a que el hongo transformó a estas a compuestos diferentes o a aflatoxinas del tipo M.

Producción de Aflatoxina G1. La Fig. 24 muestra la producción de la aflatoxina G1 en los medios de cultivo. Al hacer el análisis estadístico se observó que las diferencias no fueron significativas ($p > 0.05$). En los medios con almidón al 3%, glucosa al 3% sin zinc y glucosa al 30% el patrón que se tuvo fue de aumento en la aflatoxina G1. Este aumento tal vez se debió a la transformación de la aflatoxina B1 a la G1. En el medio con glucosa al 3% la cantidad de la aflatoxina G1 no

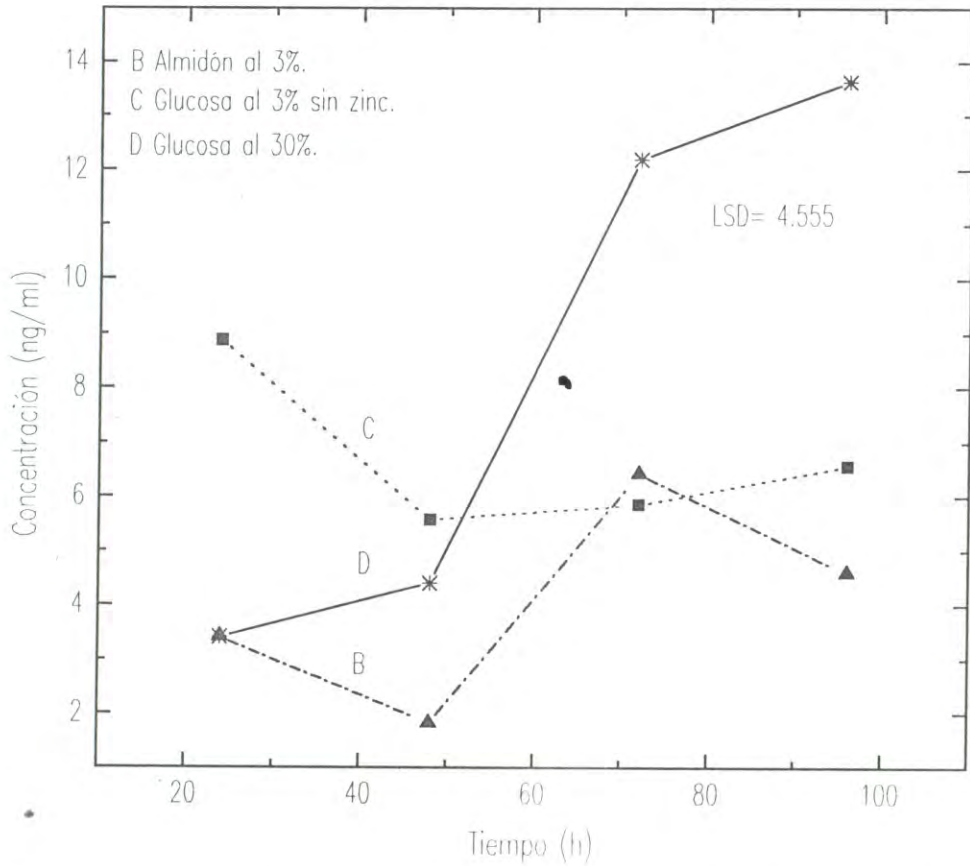


Figura 24. Producción de la Aflatoxina G1 en Tres Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.

presentó un patrón en el comportamiento. Esto tal vez se debió a que la resolución del HPLC no fue suficiente.

Producción de Aflatoxina B1. La producción de la aflatoxina B1 en los medios de cultivo utilizados se muestra en la Fig. 25. Al realizar el análisis estadístico se observó que las diferencias en la producción de la aflatoxina B1 fueron altamente significativas ($p < 0.01$). El medio con glucosa al 3% y el medio con glucosa al 30% no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre si. El medio con almidón al 3% y el medio con glucosa al 3% sin zinc tampoco presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

El medio con glucosa al 3% y el medio con glucosa al 30% presentaron mayor producción de la aflatoxina B1 que los otros dos medios. En el medio con glucosa al 3% y en el medio con almidón al 3% se tuvo la mayor cantidad de la aflatoxina B1 a las 72 horas. En tanto que en el medio con glucosa al 3% sin zinc y en el medio con glucosa al 30% se tuvo la mayor cantidad de la aflatoxina B1 a las 48 horas.

Tal vez el máximo en la producción de la aflatoxina B1 en los 4 medios se presentó cuando se tenía el óptimo de la carga energética para la síntesis de la aflatoxina.

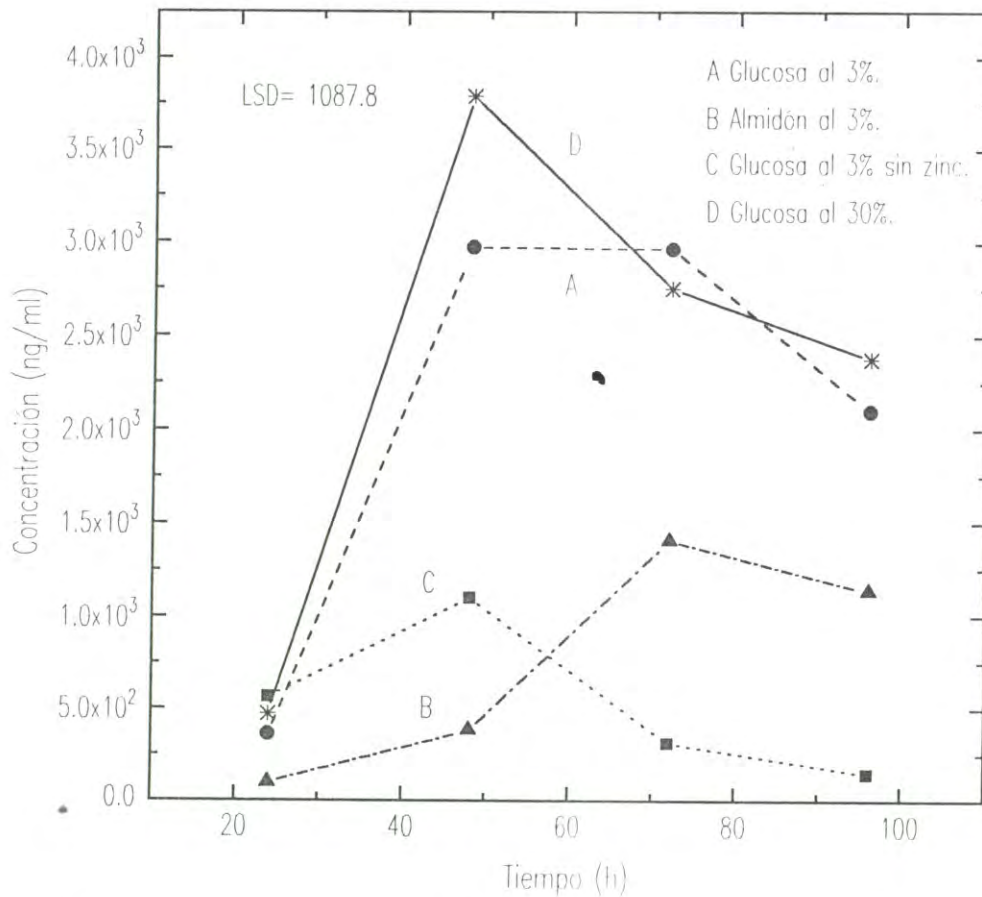
**BIBLIOTECA
D. I. P. A.**

Figura 25. Producción de la Aflatoxina B1 en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.

La carga energética es igual a la suma del ATP (trifosfato de adenosina) más un medio del ADP (difosfato de adenosina) sobre la suma de ATP más ADP más AMP (monofosfato de adenosina) (Mathews y van Holde, 1990). La disminución en el contenido de la aflatoxina B1 se podría explicar con la transformación de esta en las aflatoxinas B2, G1, G2 y del tipo M. La mayor disminución de la aflatoxina B1 en el medio con glucosa al 30% que los otros medios se podría explicar con la mayor transformación de aflatoxinas del tipo M debido a la disminución del pH.

Producción de Aflatoxina G2. La Fig. 26 muestra la producción de la aflatoxina G2 en los medios de cultivo. Al hacer el análisis estadístico se observó que las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$). El medio con glucosa al 3%, el medio con almidón al 3% y el medio con glucosa al 3% sin zinc no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). En tanto que el medio con glucosa al 30% fue significativamente diferente ($p < 0.05$). El medio con glucosa al 30% presentó mayor producción de la aflatoxina G2 que los otros medios.

En el medio con glucosa al 3% se tuvo la mayor cantidad de la aflatoxina G2 a las 24 horas. En el medio con almidón al 3% y en el medio con glucosa al 3% sin zinc

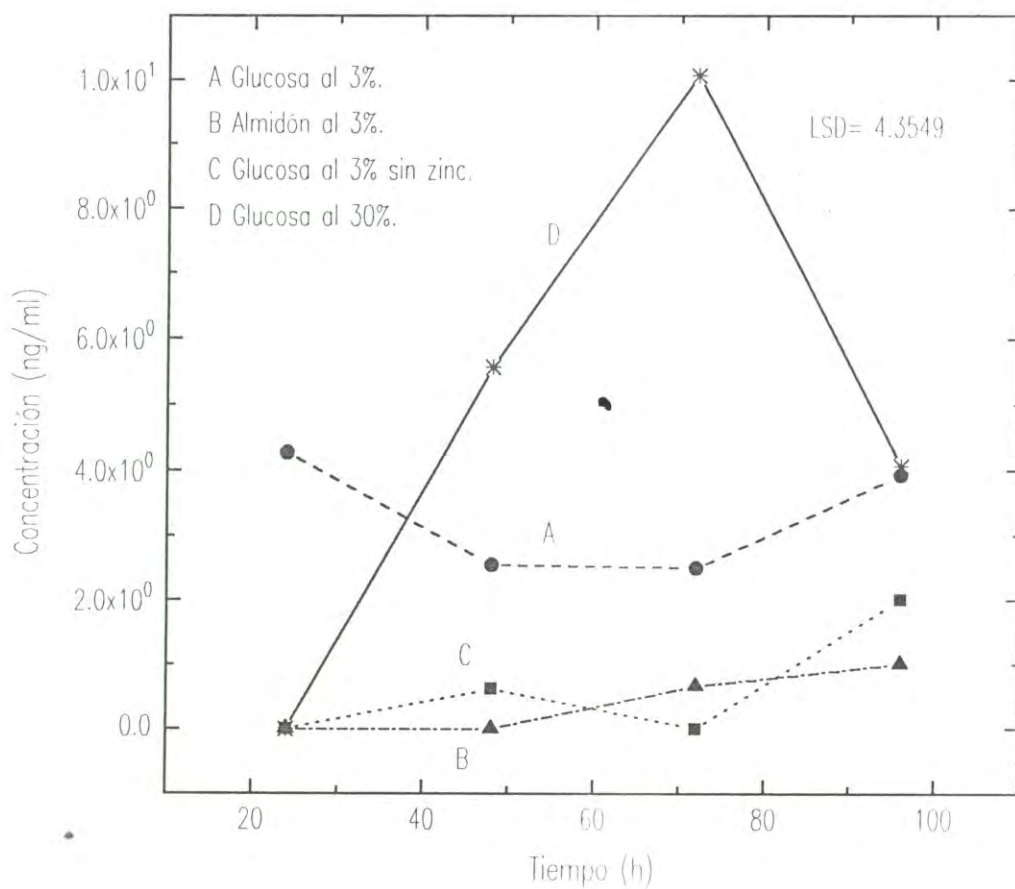


Figura 26. Producción de la Aflatoxina G2 en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.

se tuvo la mayor cantidad de la aflatoxina G2 a las 96 horas. En tanto que en el medio con glucosa al 30% se tuvo la mayor cantidad de la aflatoxina G2 a las 72 horas.

Se presentó poca variación en el contenido de la aflatoxina B2 en los medios con excepción del medio con glucosa al 30%. Lo anterior tal vez se debió a la variación en el pH a 3 en el último medio, lo cual tal vez hizo que se formaran otras aflatoxinas.

Producción de Aflatoxina B2. La Fig. 27 muestra la producción de la aflatoxina B2 en los medios de cultivo. Al realizar el análisis estadístico se observó que las diferencias fueron altamente significativas ($p < 0.01$). El medio con glucosa al 3% y el medio con glucosa al 30% no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). El medio con almidón al 3% y el medio con glucosa al 3% sin zinc no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$). El medio con glucosa al 3% y el medio con glucosa al 30% presentaron mayor producción de aflatoxina B2 que los otros medios.

En los medios con glucosa al 3%, almidón al 3% y glucosa al 30% se tuvo la mayor cantidad de aflatoxina B2 a las 72 horas. En tanto que en el medio con glucosa al 3% sin zinc se tuvo la mayor cantidad de la aflatoxina B2

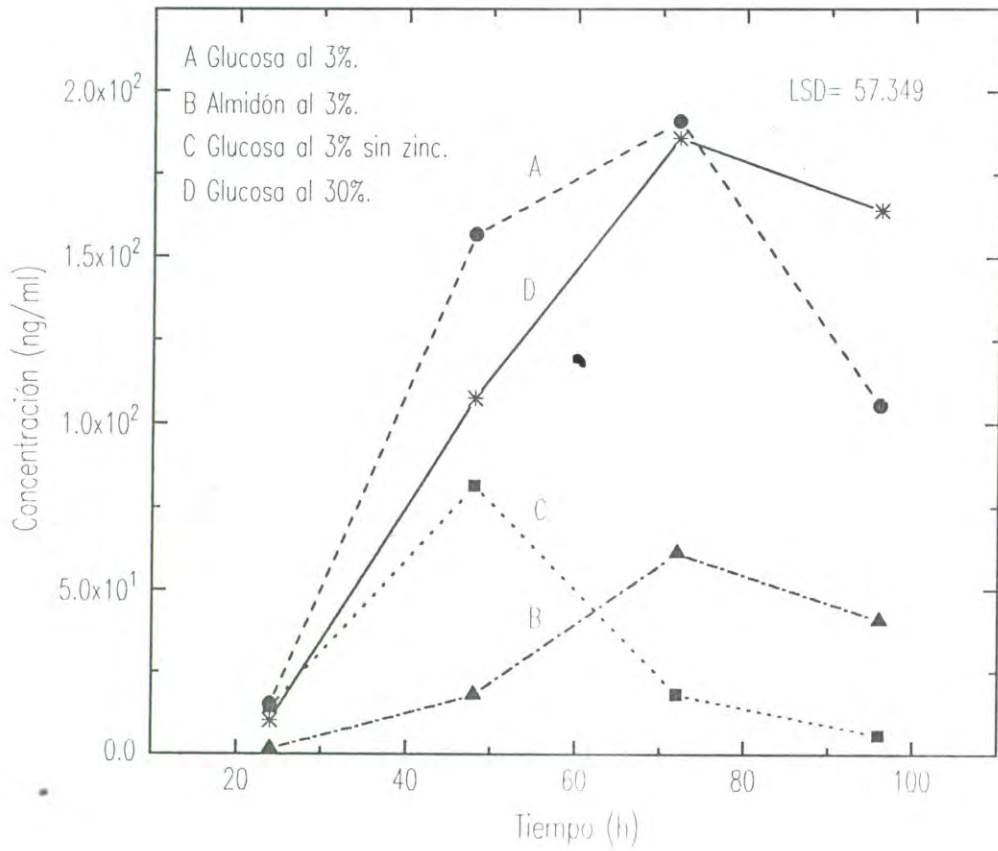


Figura 27. Producción de la Aflatoxina B2 en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.

a las 48 horas. Se sugiere que la aflatoxina B2 se sintetiza de las aflatoxinas B1 y G2 (Dutton, 1988). Se puede observar que la gráfica de la producción de la aflatoxina B2 es parecida a la gráfica de la aflatoxina B1. Pero se tiene la diferencia en los niveles en la producción de aflatoxina, las primeras tienen 10^1-10^2 ng, en tanto que los segundos están en los niveles de 10^2-10^3 ng.

Producción Específica. La Fig. 28 muestra la producción específica (ng de aflatoxinas totales por g de micelio) en los medios de cultivo. Al hacer el análisis estadístico se observó que las diferencias fueron significativas ($p < 0.05$). El medio con almidón al 3%, glucosa al 3% sin zinc y glucosa al 30% no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$).

* El medio con glucosa al 3% fue significativamente diferente ($p < 0.05$). En el medio con glucosa al 3% fue mayor la producción específica. En el medio con glucosa al 3% y en el medio con almidón al 3% se tuvo la máxima producción a las 72 horas. En tanto que en el medio con glucosa al 3% sin zinc y el medio con glucosa al 30% se tuvo el valor máximo a las 48 horas.

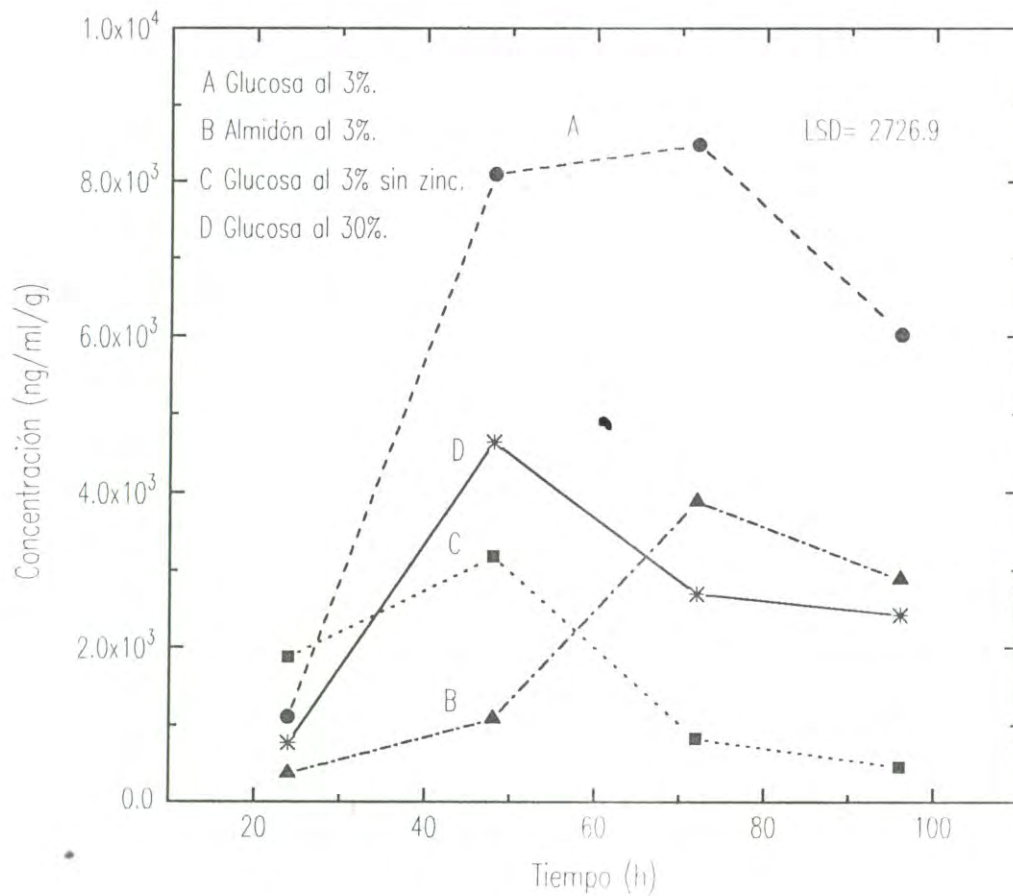


Figura 28. Producción Específica en los Medios de Cultivo Utilizados en el Estudio.

En el medio con glucosa al 3% se tuvo mayor cantidad de aflatoxinas totales por g de micelio. Por lo que se ve que la glucosa actuó como represor en la síntesis de aflatoxinas. Se conocen varios mecanismos de la regulación del catabolito carbono. Uno de ellos es la Represión del catabolito carbono. En éste mecanismo un compuesto denominado proteína activadora del catabolito (CAP) se tiene que combinar al sitio promotor antes que se una la RNA polimerasa. El compuesto CAP se puede unir solo si esta presente cAMP(monofosfato de adenosina cíclico). Fuentes de carbono que se utilizan rápido como la glucosa hacen que una enzima rompa al cAMP, por lo que no se puede producir la enzima que requiera CAP.

Otro mecanismo es la inhibición del catabolito carbono. En éste un metabolito como la glucosa inhibe la actividad de una enzima que ya existe (Crueger y Crueger, 1984). Los dos mecanismos mencionados anteriormente podrían ser responsables en parte en la disminución de la síntesis de aflatoxinas.

CONCLUSIONES

1. Cepas diferentes de Aspergillus flavus Link fueron la más productora y la más frecuentemente encontrada en los aislados de Aspergillus flavus de maíz contaminado con aflatoxinas. Una característica distintiva es la presencia de esclerocios en ambas cepas, pero desarrollados a diferentes tiempos.
2. El medio con glucosa al 30% sostuvo una velocidad de crecimiento mayor, reflejado en una mayor producción de biomasa, comparado con glucosa al 3% y almidón al 3%. La ausencia de zinc no afectó el crecimiento del hongo.
3. Los medios que contenían glucosa al 3 y 30% fueron los que permitieron mayor producción de aflatoxinas totales. Observándose el mismo patrón para la producción de aflatoxina B1. Por la producción tan alta de esta toxina con relación a las otras, es ésta la que define la cantidad de aflatoxinas totales. Sin embargo, el medio con glucosa al 3% es el que sostuvo mayor producción específica (ng de aflatoxinas totales por g de micelio). La ausencia de zinc en el medio de cultivo afectó negativamente la producción de aflatoxinas.

RECOMENDACIONES

1. Cuando se realicen experimentos de este tipo, controlar el pH para evitar la conversión de una aflatoxina a otra.
2. Además de determinar las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, considerar también la presencia de aflatoxinas hidroxiladas (tipo M).
3. Se continúe con estudios básicos de microbiología para ayudar a la solución del problema de contaminación de alimentos con micotoxinas. Especialmente presencia de aflatoxinas en maíz.
4. Estudio del posible uso de cepas no productoras, de crecimiento rápido, como competidor de cepas productoras en agronomía.

BIBLIOGRAFIA

- Abdollahi, A. and R.L. Buchanan (1981). Regulation of Aflatoxin Biosynthesis: Characterization of Glucose as an Apparent Inducer of Aflatoxin Production. *Journal of Food Science*. 46:143.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15 Edition. U.S.A.. 2:1188-1190.
- Applebaum, R.S. and R.L. Buchanan (1979). Intracellular Concentrations of cAMP and cGMP in an Aflatoxigenic Strain of Aspergillus parasiticus. *Journal of Food Science*. 44:116-117.
- Arnaud, A y J.P. Guiraud (1985). Bioquímica Microbiana. En: Biotecnología. Scriban, R. Ed. Editorial El Manual Moderno. México. pp. 61- 89.
- Bender, M.I. y L.J. Brubacher (1977). Catálisis y Acción Enzimática. Ed. Reverté. España. pp. 182.
- Betina, V. (1989). Mycotoxins: Chemical, biological, and environmental aspects. Ed. Elsevier. Czechoslovakia. pp. 42-131.
- Boyer, C.D. and J.C. Shannon (1986). Carbohydrate Utilization in Maize Kernels. In: Regulation of Carbon and Nitrogen Reduction and Utilization in Maize. Shannon J.C., D.P. Knievel and C.D. Boyer Eds. The American Society of Plant Physiologists. pp. 149-156.

- Buchanan, R.L. and D.F. Lewis (1984). Regulation of Aflatoxin Biosynthesis: Effect of Glucose on Activities of Various Glycolytic Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*. 48 (2):306-310.
- Bu'Lock, J.D. (1980). Micotoxins as Secondary Metabolites. In: *The Biosynthesis of Mycotoxins*. Steyn, S.P. Ed. Academic Press. U.S.A.. pp. 1-2.
- Burdon, K.L. y R.P. Williams (1980). *Microbiología*. Quinta reimpresión. Ed. Publicaciones Cultural S.A.. México. pp. 260.
- Chang, P., J.W. Cary, D. Bhatnagar, T.E. Cleveland, J.W. Bennett, J.E. Linz, Ch.P. Woloshuk, and G.A. Payne (1993). Cloning of the Aspergillus parasiticus apa-2 Gene Associated with the Regulation of Aflatoxin Biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 59 (10):3273.
- Changeux, J.P. y D. Blangy (1981). Un Mecanismo Molecular que Regula la Vida: Las Interacciones Alostéricas. En: *Biología Molecular*. J., Monod y otros. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México. pp. 76.
- Christensen, C.M. and R.A. Meronuck (1986). *Quality Maintenance in Stored Grain & Seeds*. University of Minnesota Press. U.S.A.. pp. 77-81.

- Coker, R.D. (1984). High Performance Liquid Chromatography and Other Chemical Quantification Methods Used in the Analysis of Mycotoxins in Foods. In: Analysis of Food Contaminants. Gilbert, J. Ed. Elsevier Applied Science Publishers. Northern Ireland. pp. 250-256.
- Crueger, W. and A. Crueger (1984). Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology. Sinauer Associates. Science Tech. Inc. U.S.A.. pp. 34-35.
- Crueger, W and A. Crueger (1990). Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology. Second Edition. Sinauer Associates, Inc. U.S.A.. pp. 64-66.
- Davis, N.D. and U.L. Diener (1983). Biology of A. flavus and A. parasiticus. In: Aflatoxin and Aspergillus flavus in Corn. Diener, U.L., R.L. Asquith and U.W. Dickens Ed. Southern Cooperative Series. Bulletin 279. Alabama Agricultural Experiment Station. U.S.A.. pp. 1-3.
- Diener, U.L. and N.D. Davis (1969). Aflatoxin Formation by Aspergillus flavus. In: Aflatoxin. Academic Press. U.S.A.. pp. 16.
- Diener, U.L. and N.D. Davis (1987). Biology of Aspergillus flavus and A. parasiticus. In: Aflatoxin in Maize. Zuber, M.S., E.B. Lillehoj and B.L. Renfro Ed. CIMMYT. México. pp. 33-34.

- Dutton, M.F. (1988). Enzymes and Aflatoxin Biosynthesis. *Microbiological Reviews*. 52:274-290.
- Failla, L.J., D. Lynn, and W.G. Niehaus (1986). Correlation of Zn ²⁺ Content with Aflatoxin Content of Corn. *Applied and Environmental Microbiology*. 52(1): 73.
- García, G.A. (1989). Manual de Métodos para el Análisis de Micotoxinas en Granos. U.N.A.M.. México. pp. 14-22.
- García de Marina, A. y B. del Castillo (1988). Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Primera Edición. Ed.Limusa. México. pp. 26-51.
- Goldblatt, L.A. (1969). Aflatoxin. Ed. Academic Press. U.S.A.. pp. 1.
- Griffith, C.J. (1982). Environment and Variation in Streptococcal Carbohydrate Metabolism. In: Sourcebook of Experiments for the Teaching of Microbiology. Primrose, S.B. and A.C. Wardlaw Eds. Academic Press. U.S.A.. pp. 282-287.
- Guzmán, O.M. y D.A. Estrada (1994). Evaluación de la Contaminación por Aflatoxinas durante la Recepción de Maíz ciclo Primavera-Verano 91 en la Zona Agrícola de Valle Hermoso, Tamaulipas. Tesis. Universidad de Sonora. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. pp. 32-46.

- Henry, J.B. (1991). Todd-Sanford-Davidsohn: Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. 8a. Edición. Ed. Salvat. México. Tomo II. pp. 1059-1205.
- Hesseltine, C.W., O.L. Shotwell, M. Smith, J.J. Ellis, E. Vandegrift, and G. Shannon (1970). Production of Various Aflatoxins by Strains of the *Aspergillus Flavus* Series. In: Toxic Micro-Organisms. Herzberg, M. Ed. U.S. Government Printing Office. Washington D.C. pp. 202-209.
- Holcomb, M., D.M. Wilson, M.W. Trucksess, y H.C. Thompson (1992). Determination of aflatoxins in food products by chromatography. *Journal of Chromatography* 624:343-345.
- Hunt, D.C. (1982). Determination of Mycotoxins. In: HPLC in Food Analysis. Macrae, R. Ed. Academic Press. U.S.A. pp. 272-274.
- Jamieson, M. y P. Jobber (1987). Manejo de los Alimentos. Primera Reimpresión. Ed. Pax-México. México. pp. 51.
- Kinghorn, J.R. and J.A. Pateman (1977). Nitrogen Metabolism. In: Genetics and Physiology of *Aspergillus*. Smith, J.E. and J.A. Pateman Eds. Academic Press. U.S.A.. pp. 147-156.
- Leveau, J. y M. Bouix (1985). Cinéticas Microbianas. En: Biotecnología. Scriban, R. Ed. Ed. El Manual Moderno. México. pp. 132-148.

- Lillehoj, E.B. (1983). Effect of environmental and cultural factors on aflatoxin contamination of developing corn kernels. In: Aflatoxin and Aspergillus flavus in Corn. Diener U.L., R.L. Asquith and J.W. Dickens, Eds. Southern Cooperative Series Bulletin 279. Alabama Agricultural Experiment Station. U.S.A.. pp. 27-29.
- Lillehoj, E.B. (1987). The Aflatoxin -In- Maize Problem: The Historical Perspective. In: Aflatoxin in Maize. Zuber, M.S., E.B. Lillehoj and B.L. Renfro Ed. CIMMYT. México. pp. 18.
- Luchese, R.H. and W.F. Harrigan (1993). Biosynthesis of aflatoxin -the role of nutritional factors. Journal of Applied Bacteriology 74:5-14.
- Macrae, R. (1982). Theory of Liquid Column Chromatography. In: HPLC in Food Analysis. Macrae, R. Ed. Academic Press. U.S.A.. pp. 25.
- Manual de Aflatest. (1989). Mycotoxin Testing System.
- Marsh, P.B., M.E. Simpson, and M.W. Trucksess (1975). Effects of Trace Metals on the Production of Aflatoxins by Aspergillus parasiticus. Applied Microbiology. 30 (1):52-57.
- Mathews, Ch.K. and K.E. van Holde (1990). Biochemistry. The Benjamin/Cummings Publishing Company. U.S.A.. pp. 85-434.

- McCullough, W., M.A. Payton and C.F. Roberts (1977). Carbon Metabolism in Aspergillus nidulans. In: Genetics and Physiology of Aspergillus. Smith, J.E. and J.A. Pateman Eds. Academic Press. U.S.A.. pp. 97-106.
- Moreno, M.E. (1988). Manual para la Identificación de Hongos en Granos y sus Derivados. Primera Edición. U.N.A.M.. México. pp. 17-28.
- Moss, M.O. (1987). Food Mycology. In: Mycotoxins in Food. Krogh, P. Ed., Academic Press, Great Britain, pp. 32-33.
- Palmgren, M.S. and A.H. Wallace (1987). Aflatoxins in Food. In: Mycotoxins in Food. Krogh, P. Ed., Academic Press, Great Britain, pp. 90-92.
- Park, D.L., S. Nesheim, M.W. Trucksess, M.E. Stack, and R.F. Newell (1990). Liquid Chromatographic Method for Determination of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Corn and Peanut Products: Collaborative Study. J. Assoc. off Anal. Chem. 73 (2):260-262.
- Payne, G.A. (1983). Epidemiology of Aflatoxin Formation by A. flavus. In: Aflatoxin and Aspergillus flavus in Corn. Diener U.L., R.L. Asquith and J.W. Dickens, Eds. Southern Cooperative Series Bulletin 279. Alabama Agricultural Experiment Station. U.S.A.. pp. 16.
- Payne, G.A. (1992). Aflatoxin in Maize. Critical Reviews in Plant Sciences. 10(5):423-425.

- Rao, V.M., S. Saraswathy, K.K. Maggon and T.A. Venkitasubramanian* (1980). Bioenergetics of Aflatoxin Biosynthesis in Aspergillus parasiticus. Journal of Food Science. 45:1031-1032.
- Raper, K.B. and D.I. Fennell (1965). The Genus Aspergillus. Ed. The Williams & Wilkins Co. U.S.A..
- SAS (1988). Introductory Guide for Personal Computers. 6.03 Edition. SAS Institute Inc. U.S.A..
- Sauer, D.B. (1987). Conditions that Affect Growth of Aspergillus flavus and Production of Aflatoxin in Stored Maize. In: Aflatoxin in Maize. Zuber, M.S., E.B. Lillehoj, and B.L. Renfro Ed. CIMMYT. México. pp. 41-46.
- Steyn, P.S., R. Vleggaar, and P.L. Wessels (1980). The Biosynthesis of Aflatoxin and Its Congeners. In: The Biosynthesis of Mycotoxins. Steyn, S.P. Ed. Academic Press. U.S.A.. pp. 105-149.
- Trucksess, M.W., L. Stoloff, and P.B. Mislivec (1988). Effect of Temperature, Water Activity and Other Toxigenic Mold Species on Growth of Aspergillus flavus and Aflatoxin Production on Corn, Pinto Beans and Soybeans. Journal of Food Protection. 51 (5):361-362.
- Vidhyasekaran, P. (1988). Physiology of Disease Resistance in Plants. CRC Press. U.S.A.. 1:1-87.

- Wang, D.C., C.L. Cooney, A.L. Demain, P. Dunnill, A.E. Humprey, and M.D. Lilly (1979). Fermentation and Enzyme Technology. Ed. John Wiley & Sons. U.S.A.. pp. 14-90.
- Wilson, D.M. (1987). Detection and Determination of Aflatoxins in Maize. In: Aflatoxin in Maize. Zuber, M.S., E.B. Lillehoj and B.L. Renfro Eds. CIMMYT, México, pp. 105.
- Wiseman, D.W. and R.L. Buchanan (1987). Determination of glucose level needed to induce aflatoxin production in Aspergillus parasiticus. Can. J. Microbiol. 33:828-830.
- Yeomans, R.M.E. (1977). Regulación Metabólica en Microorganismos. Disertación. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad de Sonora. pp. 2-44.

ANEXO I

Claves para Grupo y Especie de Raper y Fennell

Clave del Grupo

- I. Cabezas conidiales* amarillas pálidas a intensas o matices amarillo verde cuando juvenes.
- A. Colonias no cambian a café en agar de Czapek; conidio definitivamente equinulado
1. Esterigma sencillo o doble con el posterior predominante; cabezas radiadas o muy libremente columnares.....A. flavus Link
 2. Esterigma típicamente en series sencillas
 - a. Cabezas columnares; esterigma usualmente uniseriado.....A. flavus var. columnaris
 - b. Cabezas radiadas; esterigma uniseriado.....
.....A. parasiticus Speare

Clave de Especie

Aspergillus flavus Link. Colonias variables en agar Czapek, variando de un crecimiento rápido 6-7 cm en diámetro a un crecimiento más despacio 3-4 cm en diámetro en 10 días a temperatura de 24-26⁰C, consiste usualmente más bien de micelio delgado el cual en algunas cepas permanece sumergido en los margenes de 1-1.5 cm, comunmente plano pero ocasionalmente radial estriada o plegada en un patrón de forma de cerebro, en más cepas produciendo abundantes estructuras conidiales directamente del micelio del substrato, cabezas conidiales juvenes frecuentemente en matices amarillos cercano al amarillo

estroncio o amarillo limón, rápidamente sombreado de amarillo-verde brillante a amarillo-verde oscuro cerca del reseda o verde brillante olmo y finalmente volverse verde uva intenso a verde jade o verde berro con la edad; invirtiéndose comunmente sin color a rosa pardo, en cepas extremadamente esclerótiales rojo-café oscuro; exudado inconspicuo excepto en cepas extremadamente esclerótiales, después rojo-café; olor ausente o cuando está presente desagradable. Esclerocios producidos en muchas cepas, particularmente en aislados frescos, algunas veces dominando la apariencia de la colonia, variable en forma, dimensiones, y pigmentación, subiendo mechones de micelio blanco, característicamente globoso a subgloboso y gradualmente cambiando de blanco a rojo café oscuro a cercano al negro, comunmente alrededor de 400 a 700 μ y raramente excediendo 1 mm en diámetro, pero uniformemente más pequeña en algunas cepas, menos profundamente pigmentado en otras, y elongado verticalmente o de crecimiento apical indeterminado aún en otras. Las cabezas conidiales son típicamente radiadas, divididas en diversas columnas pobremente definidas, raramente exceden 500 a 600 μ en diámetro, más comunmente 300 a 400 μ , las cabezas más pequeñas ocasionalmente columnares arriba a 300 μ por 50 μ ; conidióforos extremadamente con pared, sin color, ordinariamente áspero, usualmente menos que 1 mm en longitud pero en cepas ocasionales (particularmente

aquellas mantenidas grandemente en cultivos de laboratorio) arriba a 2 a 2.5 mm con diámetro del tallo, inmediatamente abajo a las vesículas variando de 10 a 20 μ ; vesículas elongadas cuando juvenes, posteriormente volviéndose subglobosa o globosa, variando de 10 a 65 μ en diámetro pero más comunmente 25 a 45 μ ; esterigmas en vesículas normales uniseriada o biseriada con las dos condiciones raramente ocurriendo en la misma cabeza, las primarias usualmente de 6 a 10 μ por 4 a 5.5 μ pero algunas veces arriba a 15 o 16 μ de longitud e infrecuentemente inchadas a 8 o 9 μ en diámetro, las secundarias de 6.5 a 10 μ por 3 a 5 μ , los esterigmas uniseriados variables en tamaño de 6.5 a 14 μ por 3 a 5.5 μ , consistentemente producidas en vesículas pequeñas, los conidios forman puntas usualmente en forma de vía; los conidios típicamente globosos o subglobosos, conspicuamente equinulados, variable de 3 a 6 μ en diámetro pero la mayoría de 3.5 a 4.5 μ , algunas veces elípticas cuando se forman, infrecuentemente quedan así y después miden alrededor de 4.5 a 5.5 μ por 3.5 a 4.5.

Aspergillus flavus Link var. columnaris. Colonias en solución de agar Czapek a temperatura de 24-26⁰C difieren de aquellas de las especies en ser uniformemente parejo en la textura y aterciopelado y en sus colores amarillo-verde más brillantes. Las cabezas conidiales predominantemente

columnares y arriba de 400 a 500 μ de longitud por 50 a 75 μ en diámetro pero con las cabezas radiales llegando a 350 μ en diámetro también se producen; los conidióforos algo más delgados en las paredes y menos rugosos que aquellas especies, raramente más de 500 μ en longitud; las vesículas clavadas cuando jóvenes volviéndose subglobosas, la mayoría de 15 a 25 μ en diámetro, raramente llegando a 40 μ , más comunmente fértiles sobre la superficie más superior (la mitad); el esterigma casi enteramente en una sola serie, 7 a 12 μ por 3.3 a 4.4 μ o raramente 15 a 16 μ de longitud, cabezas biseriadas raramente producidas y después con vesículas fértiles sobre 3/4 de su superficie y soportando primarias de 7 a 9 μ por 3.5 a 4.5 μ ; los conidios mostrando el mismo arreglo de variación como aquellas especies.

Aspergillus parasiticus Speare. Colonias en solución de agar Czapek crecen bien a temperatura de 24-26⁰C, alcanzando un diámetro de 2.5 a 4 cm en 8 a 10 días, consistiendo de un micelio basal compacto con amplio, blanco, casi, margenes no esporulando en algunas cepas, en otras sumergidas recortado, plana o algo radial estriada, sustentando cabezas conidiales numerosas a abundantes las cuales varían en color con la cepa y su grado de madurez de amarillo claramente brillante cercano al amarillo cera cuando jóvenes a través de cesped o verde cedro a

amarillo-verde oscuro cerca al verde hiedra al amarillo-verde oscuro apagado con la edad; regresando al color crema a matices muy claros pardos; exudados que se pueden desatender; olor no distintivo. Cabezas conidiales consistentes y libremente radiadas, arriba a 400 a 500 μ de diámetro; conidióforos variables en longitud, de 200 μ a raramente más que 1 mm, la mayoría de 300 a 700 μ de longitud, con paredes sin color, lisas o cercanamente así en algunas cepas, en otras lisas abajo y definidamente rugoso arriba, agrandandose de una base angosta arriba a 10 a 12 μ y pasando dentro subglobosa a vesículas matraz o matiz mano de mortero de 20 a 35 μ de diámetro; esterigmas en una serie, 7 a 9 μ por 3 a 4 μ , cerradamente empaquetadas sobre la superficie vesicular, sin color o en matices amarillo pálido-verde; conidio globoso, ordinariamente equinulado, 3.5 a 5.5 μ de diámetro, amarillo-verde claro. No reportados esclerocios o cleistotecios.

ANEXO II

Cromatogramas

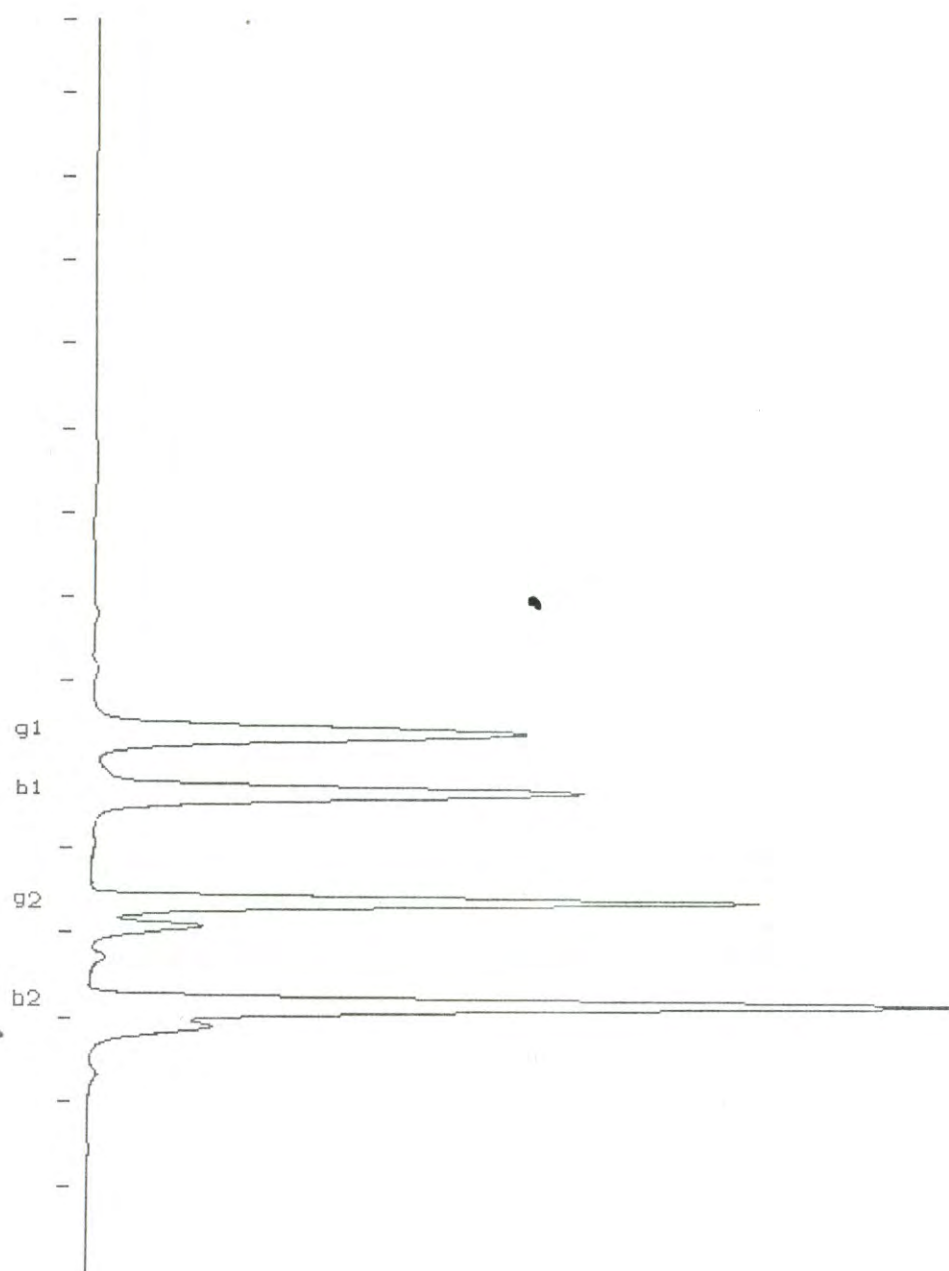


Figura II-1. Cromatograma del Estándar.

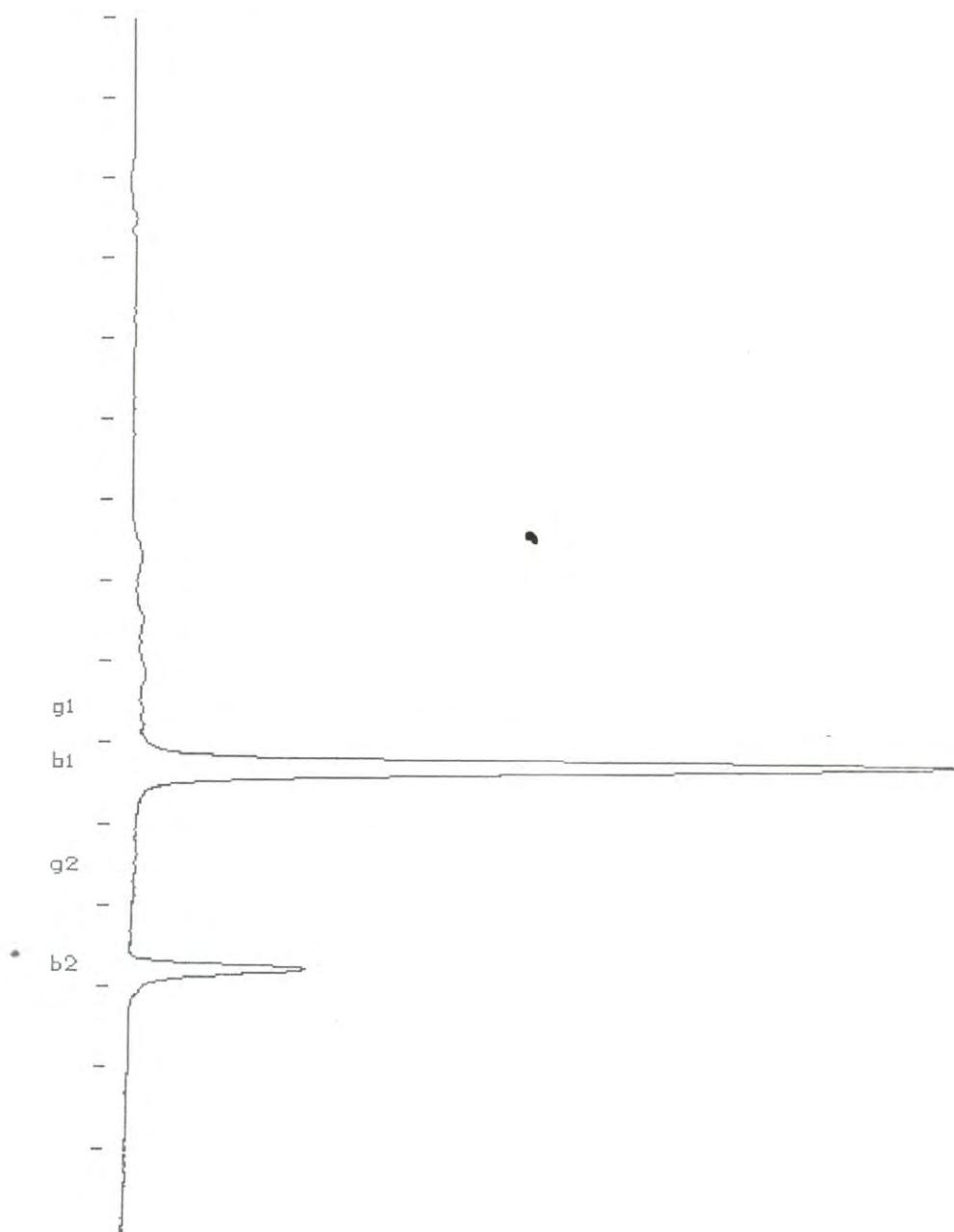


Figura II-2. Cromatograma de A₁72.

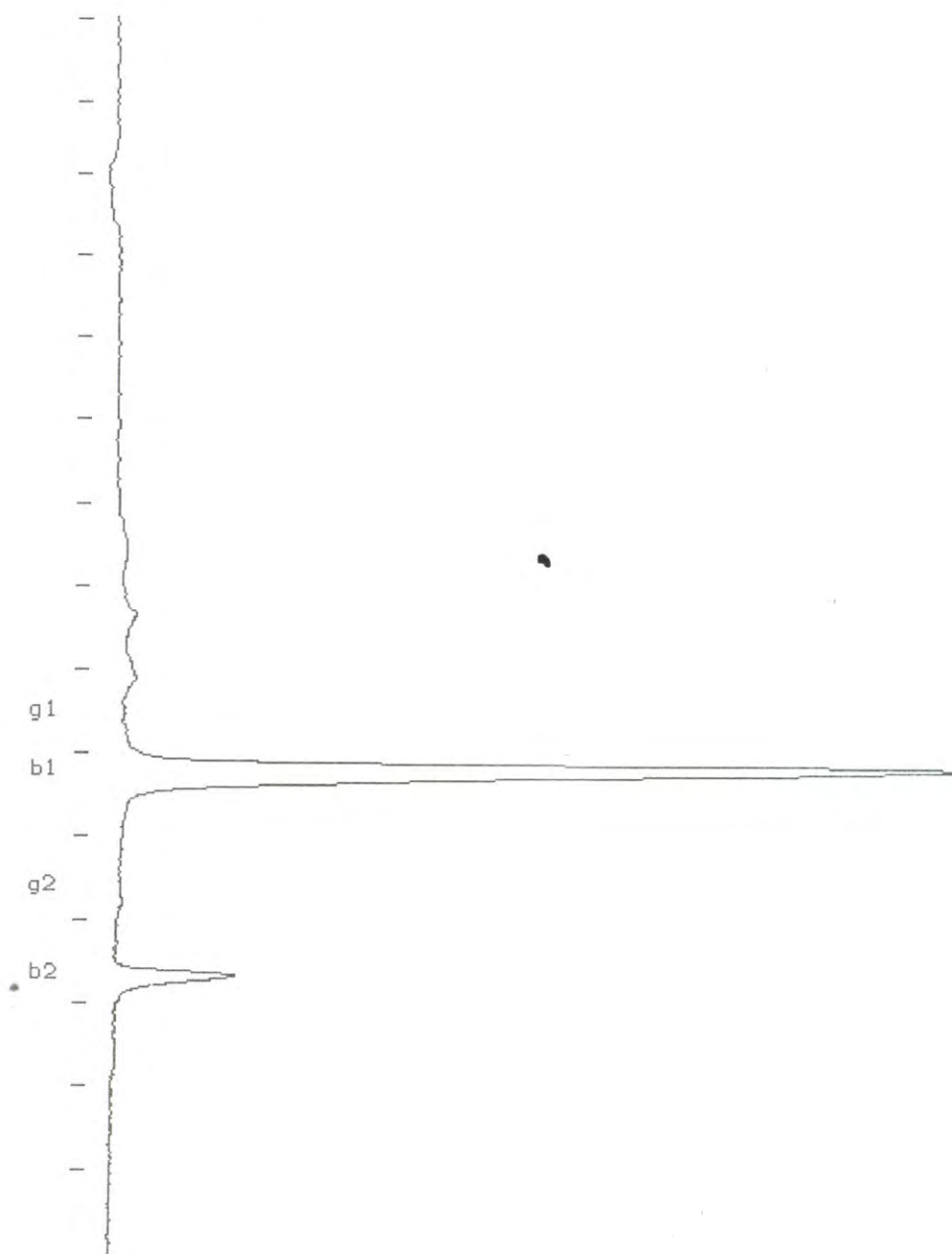


Figura II-3. Cromatograma de B₁72.

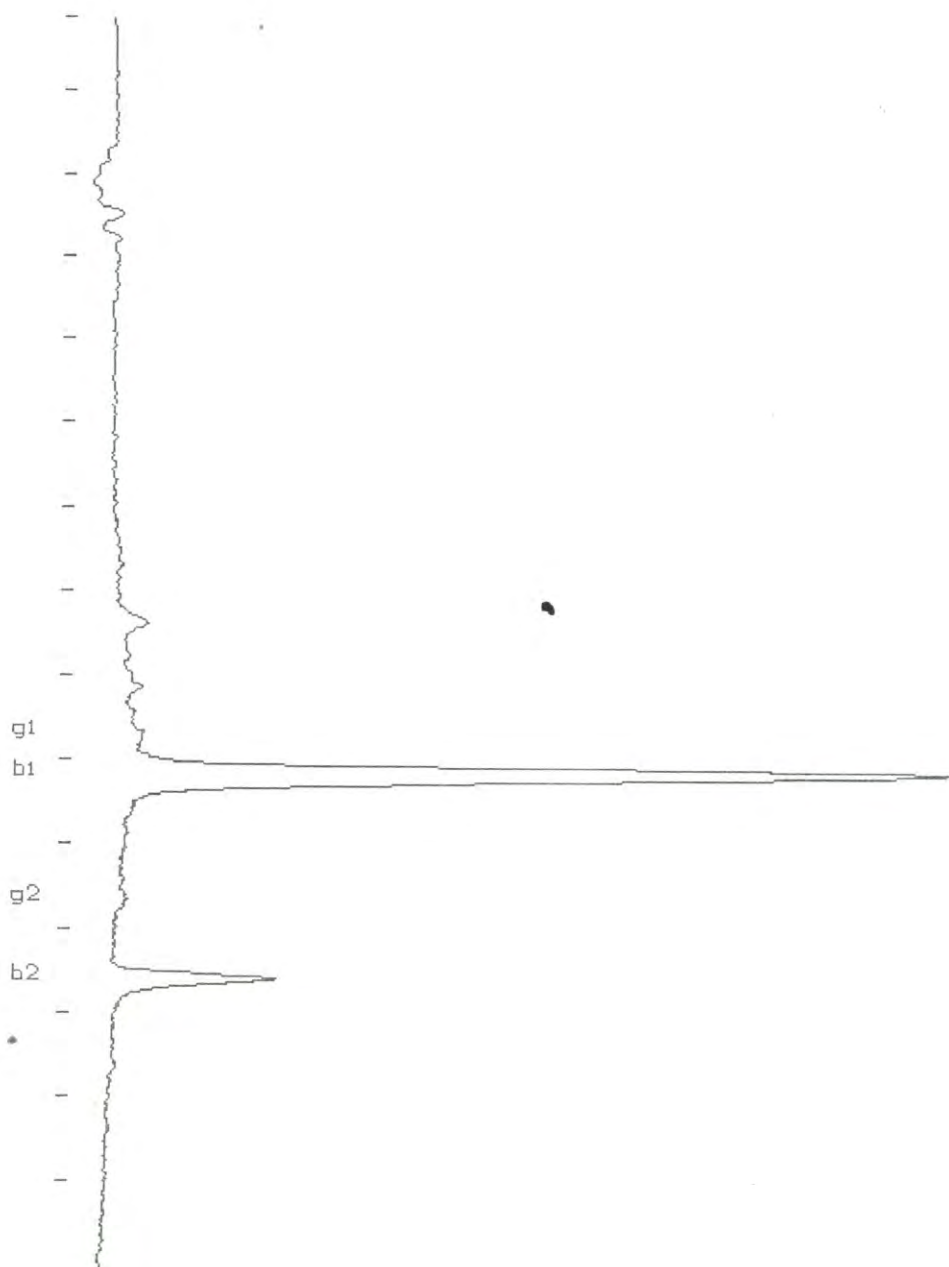


Figura II-4. Cromatograma de C₂₄₈.

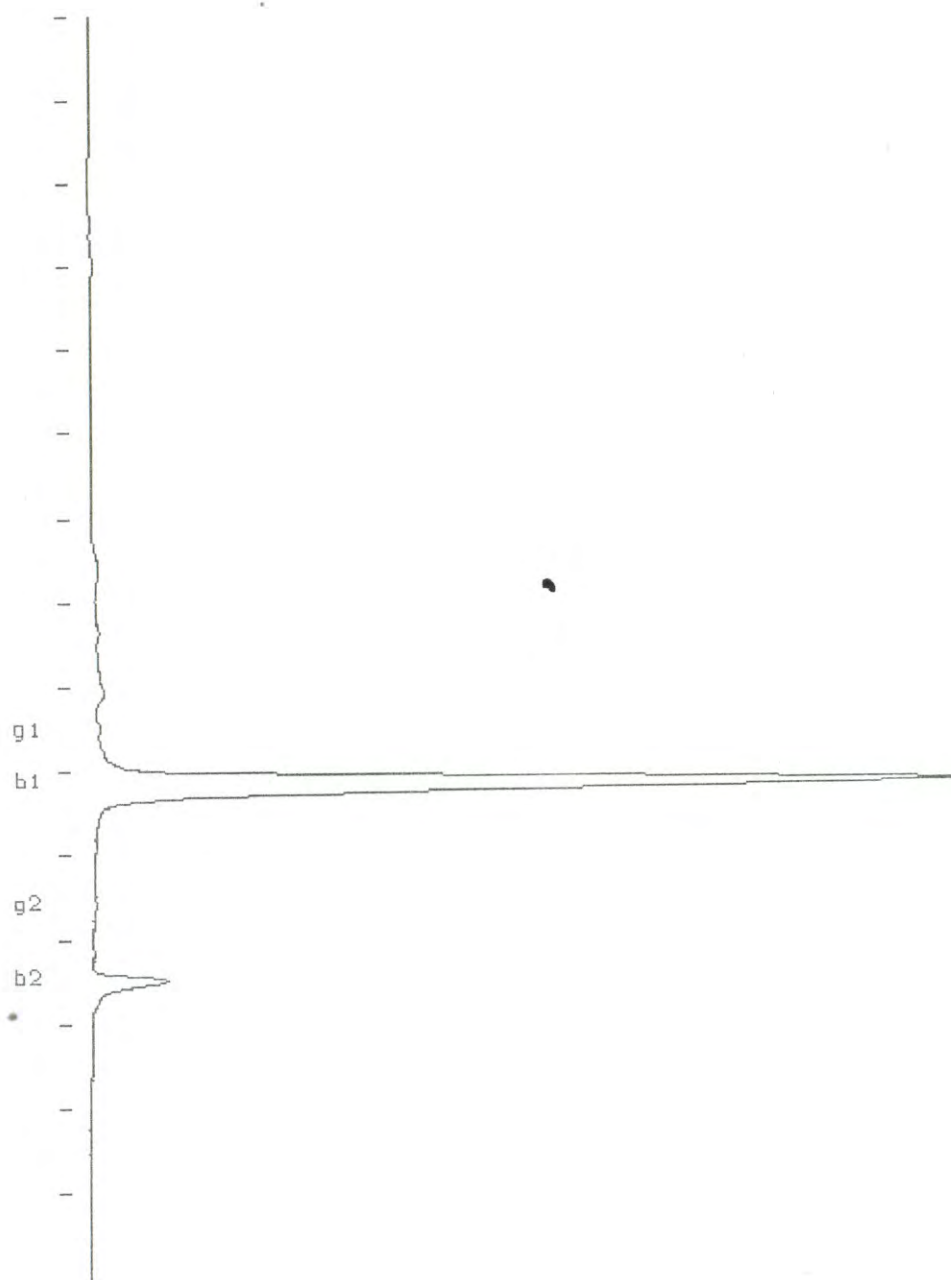


Figura II-5. Cromatograma de D₂48.

ANEXO III

Curvas de Calibración

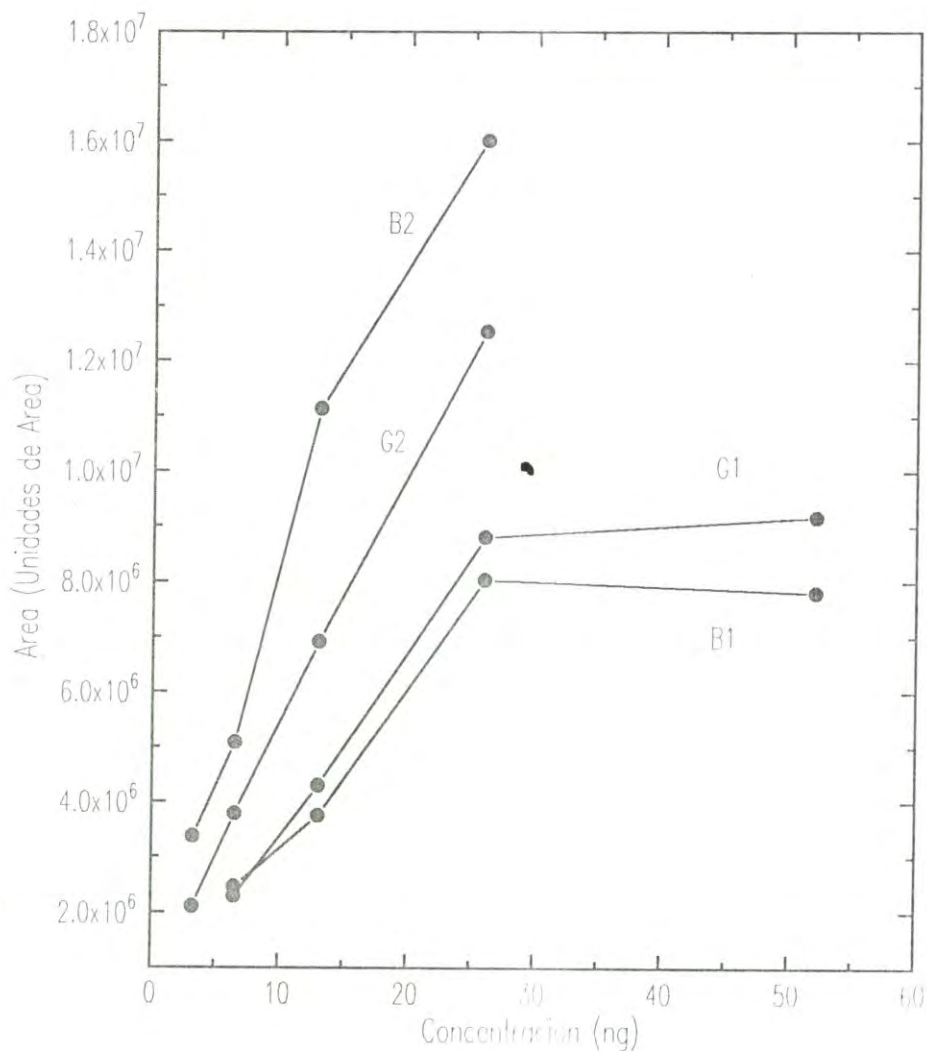


Figura III-1. Curva de Calibración de Estándar Externo para las Aflatoxinas B1, B2, G1 y G2.

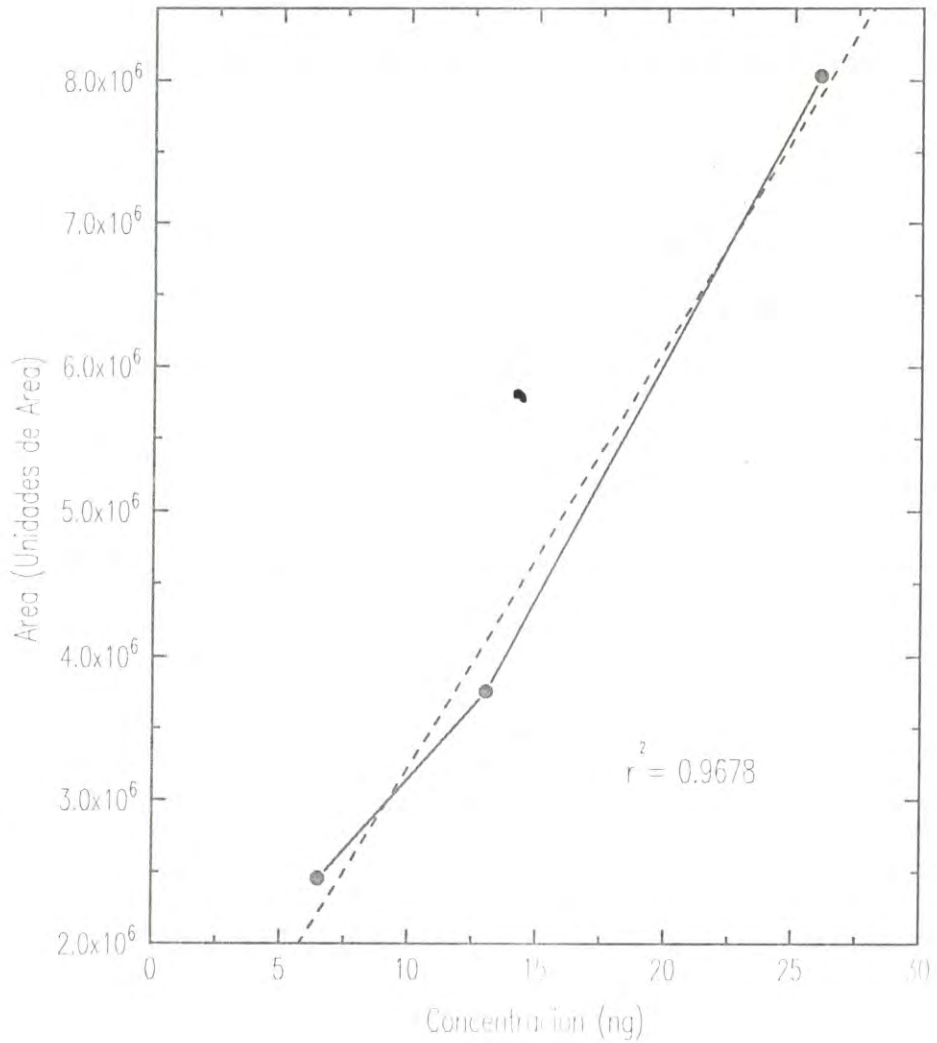


Figura III-2. Curva de Calibración de Estándar Externo para la Aflatoxina B1.

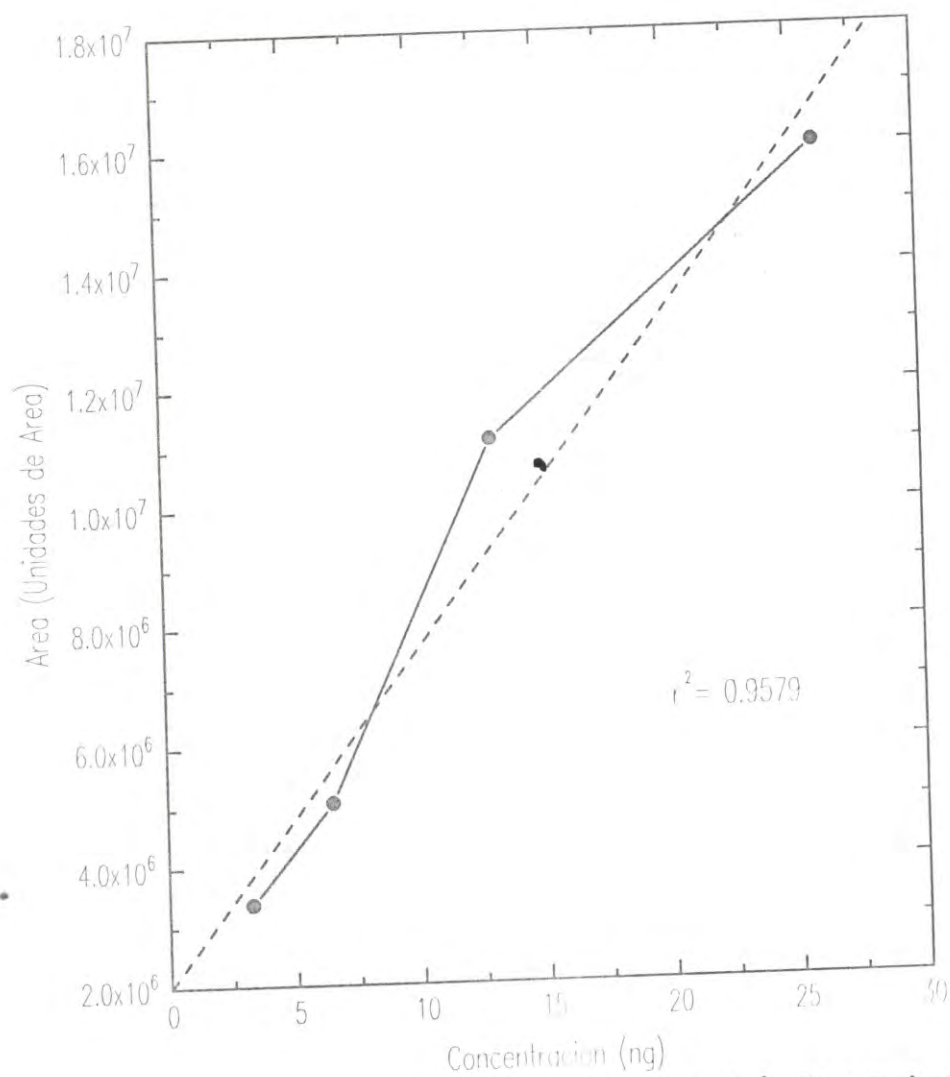


Figura III-3. Curva de Calibración de Estándar Externo para la Aflatoxina B2.

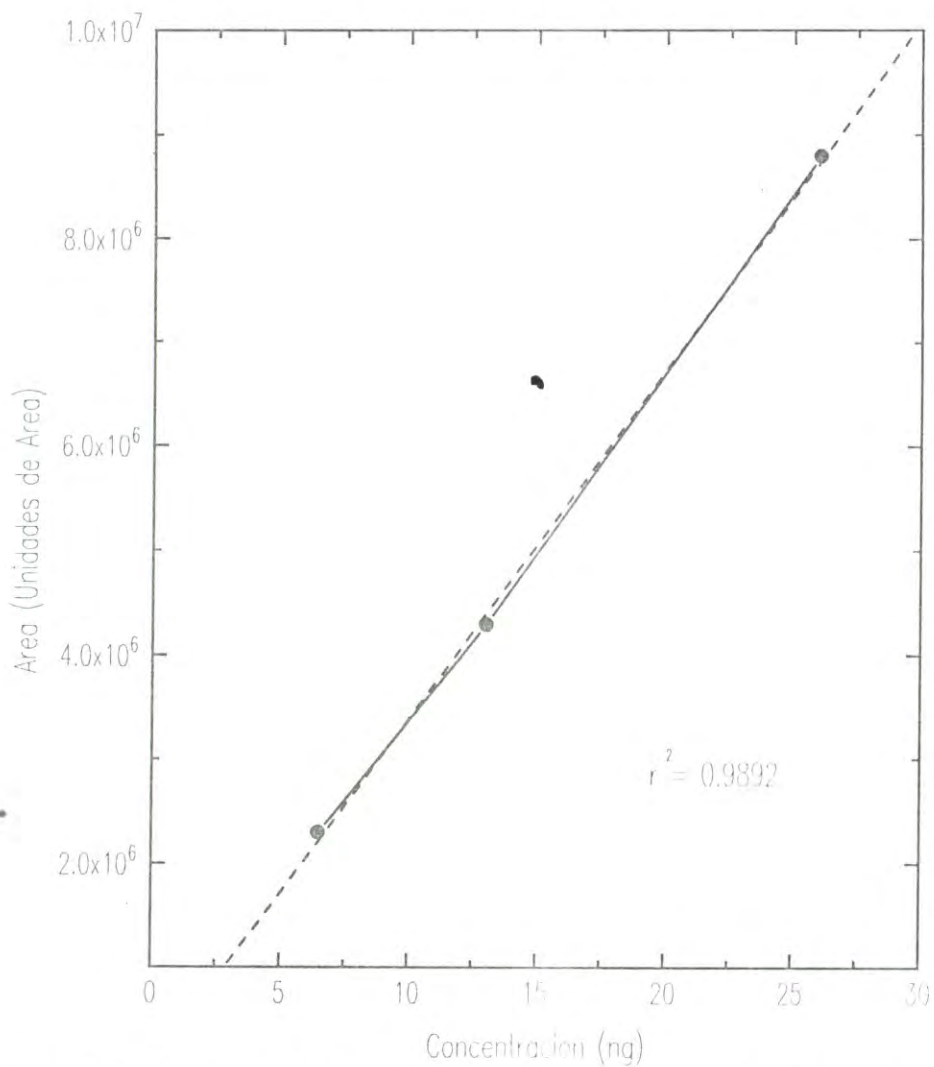


Figura III-4. Curva de Calibración de Estándar Externo para la Aflatoxina G1.

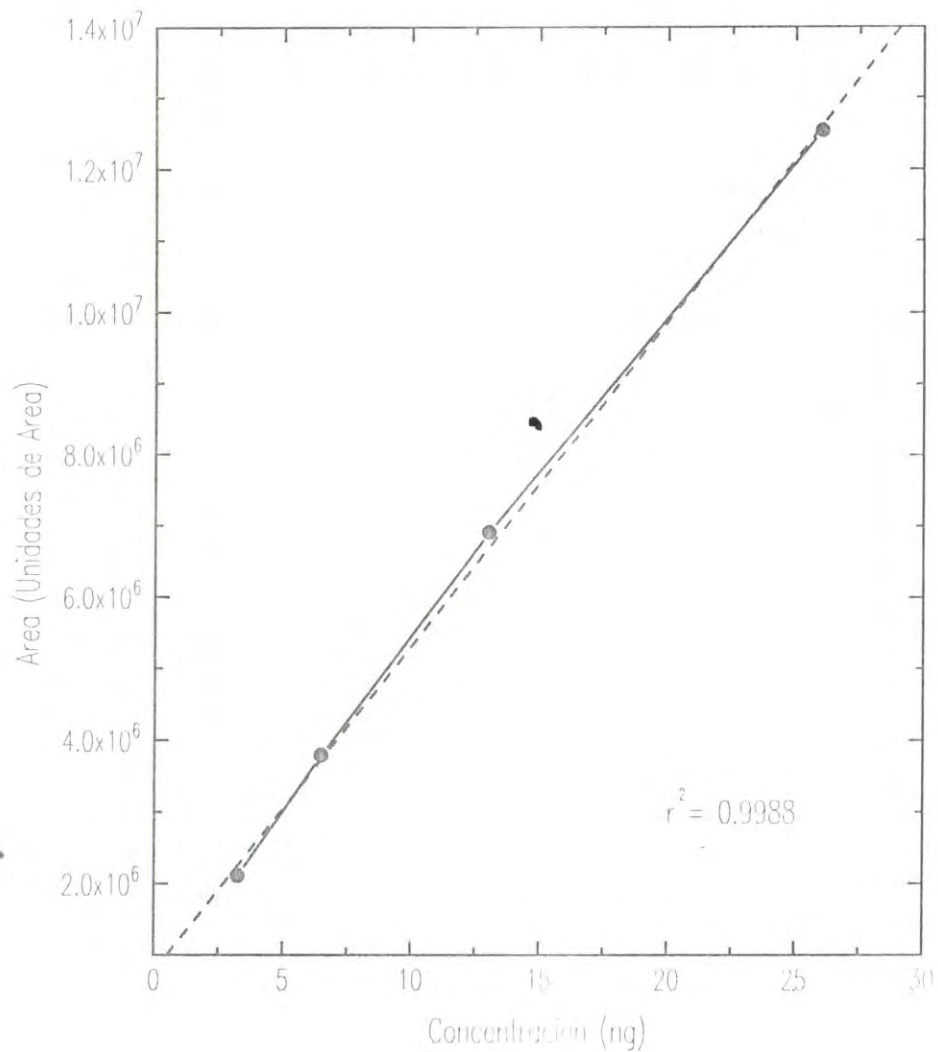


Figura III-5. Curva de Calibración de Estándar Externo para la Aflatoxina G2.

ANEXO IV

Efecto de la Concentración de Aflatoxinas en el Factor
de Respuesta del Detector de Fluorescencia

