

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y TOXIGÉNICA DE CEPAS DE  
*Aspergillus flavus* Link Fr. Y DE *Aspergillus parasiticus* Speare, AISLADAS DE  
GRANO DE MAÍZ PROVENIENTE DE 14 ESTADOS DE LA REPÚBLICA  
MEXICANA**

**ANDREA ALEJANDRA ARRÚA ALVARENGA**

**TESIS**

**Presentada como requisito parcial para  
obtener el grado de:**

**Maestro en Ciencias  
en Parasitología Agrícola**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
“ANTONIO NARRO”  
PROGRAMA DE GRADUADOS**

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México**

**Junio de 2009**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Gobierno Mexicano; por otorgarme la oportunidad de realizar mi Maestría y desarrollarme como profesional y ser humano.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por haberme recibido y brindado la oportunidad de crecer.

A mi Comité de Asesoría; a mis Maestros; a los Técnicos; a mis Compañeros, a todos los que me transmitieron sus conocimientos y apoyaron en mi formación.

A la M en C Martha Quezada por orientarme y capacitarme en todo lo referente a aflatoxinas, por su paciencia y amistad.

A la QFB Blanca Mares Fermín, del Laboratorio de Parasitología Molecular de la UAAAN, por su apoyo técnico durante el desarrollo de la tesis.

A la M. en C. Josefina Moreno Lara, por la capacitación en la extracción y cuantificación de aflatoxinas, a las M en C, Cristina Pérez y Gabriela Sánchez técnicos académicos de UNIGRAS-UNAM, por su apoyo durante la cuantificación de aflatoxinas.

Al Dr. Ernesto Moreno Martínez, por la donación de materiales y reactivos, y las facilidades para el uso del laboratorio y equipos a su cargo.

## **DEDICATORIA**

Por todo el tiempo que dejamos de compartir, dedico este trabajo a...

A mis papás: VIDAL Y MARÍA YNÉS

A mis hermanos: PATRICIA Y PABLO

A mis amores: ÁMBAR Y ZÓE

A los microorganismos fitopatógenos infinita fuente de conocimiento y trabajo...

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	4
REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
<i>Aspergillus</i> en maíz.....	7
Métodos para detectar aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos.....	7
Métodos basados en la utilización de medios de cultivo diferenciales.....	7
Métodos basados en técnicas cromatográficas.....	8
Métodos basados en técnicas inmunológicas.....	8
Métodos basados en técnicas moleculares.....	8
Micotoxinas.....	11
Aflatoxinas.....	12
Estructura molecular del compuesto y propiedades.....	13
Biosíntesis de aflatoxinas.....	14
Mecanismo de acción de las aflatoxinas.....	17
Toxicidad.....	19
Toxicidad aguda.....	19
Toxicidad crónica.....	20
Ingesta diaria.....	20
Condiciones para la producción de aflatoxinas.....	21
Factores implicados en la producción de aflatoxinas.....	21
En hongo.....	21

	<b>Pág.</b>
Micobiota asociada.....	22
Cantidad de inóculo.....	23
Sustrato.....	23
Agentes antifúngicos.....	24
Temperatura.....	24
Humedad.....	25
Gases.....	25
pH.....	25
Luz.....	26
Aflatoxinas en maíz.....	26
Aflatoxinas en maíz en México.....	27
Métodos de análisis.....	28
Control de la contaminación con aflatoxinas.....	30
Destoxificación.....	31
Tratamientos físicos.....	31
Tratamientos químicos.....	32
Tratamientos biológicos.....	32
Legislación.....	33
LITERATURA CITADA.....	35
ARTÍCULO I.....	59
ARTÍCULO II.....	68
	<b>Pág.</b>

ARTÍCULO III.....	87
CONCLUSIONES.....	104
APÉNDICE .....	106

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Producción de aflatoxinas totales y comportamiento de cepas aisladas en medios diferenciales.....	106
Tabla 2. Resultados de TLC para cepas de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> analizadas.....	109
Tabla 3. Características morfológicas y toxicológicas de las cepas de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> aisladas.....	111

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Maíces colectados a campo de los estados de Zacatecas, Nuevo León, Coahuila y Michoacán.....	117
<b>Figura 2.</b> Micobiotas de los estados de Oaxaca, Jalisco, Guanajuato.....	117
<b>Figura 3.</b> Cabezuelas monoseriadas de <i>A. parasiticus</i> .....	117
<b>Figura 4.</b> Cabezuelas, izquierda, monoseriada, centro y derecha, biseriadas de <i>Aspergillus flavus</i> .....	117
<b>Figura 5.</b> Coloración naranja, indicativa de la presencia de <i>A. flavus</i> y <i>A. parasiticus</i> en AFPA y fluorescencia en ACY, indicando presencia de aflatoxinas.....	118
<b>Figura 6.</b> Características de micelio de cepas de <i>A. flavus</i> aisladas a la izquierda, profundo y escaso, al centro, superficial y escaso y a la derecha, superficial y abundante.....	118

**COMPENDIO**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y TOXIGÉNICA DE CEPAS DE  
*Aspergillus flavus* Link Fr. Y DE *Aspergillus parasiticus* Speare, AISLADAS DE  
GRANO DE MAÍZ PROVENIENTE DE 14 ESTADOS DE LA REPÚBLICA  
MEXICANA**

**POR**

**ANDREA ALEJANDRA ARRÚA ALVARENGA**

MAESTRIA EN CIENCIAS

EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, JUNIO DE 2009.

Dr. Alberto Flores Olivas-Asesor-

**Palabras clave:** *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, aflatoxinas, caracterización morfológica, caracterización toxicológica, hongos toxigénicos, maíz.

El cultivo del maíz es de importancia fundamental en México, no solo desde el punto de vista económico, sino también industrial, político y social. Debido a condiciones adversas durante su cultivo, puede ser susceptible al ataque de hongos productores de micotoxinas como *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare, pueden contaminar el grano de maíz con aflatoxinas, las cuales, en concentraciones muy bajas, inferiores a partes por billón tienen efectos oncogénicos y teratogénicos en el hombre y en los animales. El control del problema radica en la prevención del desarrollo de los mismos en sustratos susceptibles. Se ha sugerido que la severidad de la contaminación de un determinado cultivo en una región puede estar en parte determinada por el potencial toxigénico de las cepas presentes. Otra característica importante dentro de estas especies, relacionada con la capacidad de supervivencia y dispersión en el medio ambiente, es la capacidad de producir esclerocios. Se han tipificado dos tipos de cepas. Las S productoras de alto número de esclerocios pequeños y generalmente grandes cantidades de aflatoxinas Las L productoras de esclerocios grandes en bajo número, y en promedio menor concentración de aflatoxinas. Para realizar un estudio de la presencia de estos hongos y de sus toxinas en México, se obtuvieron muestras compuestas de maíces de 14 estados de la república mexicana. En los granos se detectó la presencia de  $62 \pm 2.68$  (11.72%) cepas de *Aspergillus flavus*,  $3 \pm 0.58$  (0.57%) de *Aspergillus parasiticus*,  $405 \pm 34.16$  (76.99%) de *Fusarium*,  $51 \pm 3.97$  (9.69%) y de *Penicillium*,  $3 \pm 0.58$  (0.53%). Se realizó la caracterización morfológica de los *Aspergillus* aislados de las muestras por medio de técnicas microscópicas, y siguiendo claves taxonómicas para su identificación. Para la identificación química de las toxinas, se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC). La caracterización toxicológica de las cepas se desarrolló por medio de la

evaluación de su potencial toxigénico en medio de cultivo in vitro; con el uso de columnas de anticuerpos monoclonales para la purificación de las aflatoxinas totales del medio. Las poblaciones fúngicas analizadas resultaron ser potencialmente aflatoxigénicas en su totalidad. La cepa con mayor producción de aflatoxinas fue la AF01, proveniente de Coahuila y la de menor producción la cepa AF56, de Chiapas. El 100% de las cepas aisladas produjeron aflatoxinas in vitro: un 96.92% presentó AFB y un 3.07% AFB y AFG. Las concentraciones de aflatoxinas variaron de entre 22 y 2250 ppb. El estado con mayor producción de aflatoxinas en media fue Veracruz y el de menor producción de aflatoxinas en media, Zacatecas. Del total estudiado 54 cepas produjeron esclerocios a los 10 días de crecimiento. El número de esclerocios producidos y la cantidad aflatoxinas están positivamente correlacionados.

**ABSTRACT**

**MORPHOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL CHARACTERIZATION OF  
*Aspergillus flavus* Link AND *Aspergillus parasiticus* Fr. Speare STRAINS, ISOLATED  
FROM CORN GRAIN FROM 14 STATES OF THE MEXICAN REPUBLIC**

**BY**

**ANDREA ALEJANDRA ARRUA ALVARENGA**

MASTER IN SCIENCES

AGRICULTURAL PARASITHOLOGY

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, JUNE 2009.

Dr. Alberto Flores-Olivas-Advisor

**Keywords:** *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, aflatoxin, morphological characterization, toxicological characterization, toxigenic fungi.

The cultivation of corn has vital importance in Mexico, not only from an economic standpoint, but also industrial, political and social. Due to adverse conditions during its cultivation, can be susceptible to attack by micotoxigenic fungi, such as *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*. *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare, can contaminate the grain with aflatoxins in corn, which in very low concentrations, less than parts per billion are oncogenic and teratogenic effects in humans and animals. The control of the problem lies in preventing the development of these substrates susceptible. It has been suggested that the severity of the pollution of a particular crop in one region may be partly determined by the toxigenic potential of strains present. Another important characteristic of these species, related to the ability of survival and dispersal in the environment is the ability to produce sclerotia. Have defined two types of strains. S producing the large number of small sclerotia and usually large amounts of aflatoxin-producing sclerotia L The big low, and lower average concentration of aflatoxins. To make a study of the presence of these fungi and their toxins in Mexico, were composed of maize samples from 14 states. Grains were detected in the presence of  $62 \pm 2.68$  (11.72%) strains of *Aspergillus flavus*,  $3 \pm 0.58$  (0.57%) from *Aspergillus parasiticus*,  $405 \pm 34.16$  (76.99%) of *Fusarium*,  $51 \pm 3.97$  (9.69%) and *Penicillium*,  $3 \pm 0.58$  (0.53%). A characterization of the morphology of *Aspergillus* isolated samples by microscopy, following taxonomic key for identification. For the identification of chemical toxins, the technique of thin layer chromatography (TLC). Toxicological characterization of the strains developed by the evaluation of their potential toxigenicity in culture medium in vitro, using monoclonal antibody columns for purification of total aflatoxins. Fungal populations were analyzed potentially aflatoxigénicas in its entirety in all the maize seeds. The strain with increased production of aflatoxins was the AF01,

from Coahuila, and the lowest strain AF56 in Chiapas. 100% of the isolates produced aflatoxins in vitro: a 96.92% had a 3.07% and AFB AFB and AFG. Aflatoxin concentrations ranged between 22 and 2250 ppb. The state with increased production of aflatoxins in Veracruz average and the lowest production of aflatoxins in half, Zacatecas. Of the total studied 54 strains produced sclerotia to 10 days of growth. The number of sclerotia produced for the strain and the aflatoxins quantity are positively correlated.

## INTRODUCCIÓN

La contaminación de los alimentos, puede tener como consecuencia su deterioro al originar una serie de cambios físicos y químicos acompañados de olores y sabores anormales. De mayor importancia aún, es la capacidad de ciertos hongos de producir metabolitos tóxicos para el hombre y los animales utilizando como sustrato dichos alimentos (Pascual, 2005).

Actualmente se conocen unos 200 hongos productores de toxinas, que ejercen su poder con cantidades extremadamente bajas, inclusive en partes por billón (Pascual, 2005). Los mismos, además de actuar como patógenos oportunistas, son capaces de causar enfermedades y síndromes clínicos en el ser humano y los animales. Estas enfermedades son conocidas en forma global como micotoxicosis (Murray *et al.*, 2006).

Dentro de las micotoxinas, las aflatoxinas producidas por los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* (Kurtzman *et al.*) son consideradas las sustancias con el potencial más elevado de inducir cáncer en animales y humanos luego de las sustancias radioactivas. El principal órgano diana de los efectos tóxicos y carcinogénicos de las aflatoxinas es el hígado. También inducen tumores en el riñón, colon y pulmón. Los alimentos más susceptibles a la contaminación fúngica y la posterior producción de aflatoxinas son los granos y cereales, oleaginosas, leche y

productos lácteos, hierbas, te, yerba mate, especias, cacao, piensos, aceites vegetales entre otros. La capacidad de producción de las aflatoxinas está condicionada por factores como: el tipo de hongo, las características del sustrato y las condiciones externas (Soriano, 2007).

Durante el año 2007, en el mundo se produjeron más de 790 mil de toneladas de maíz. En México, este cultivo representa el 65 % de la producción nacional de cereales (SIACON-SIAP, 2007). Este cultivo, básico para la alimentación, se ve afectado por *A. flavus* y *A. parasiticus*. No existe una estadística nacional acerca de las pérdidas ocasionadas por estos patógenos no solo a nivel de campo, sino también en silos o los efectos de las toxinas sobre humanos y animales, pero se han documentado en años anteriores pérdidas en los estados de Tamaulipas, Chiapas, Michoacán, Nuevo León y Sonora. Mucho se ha estudiado acerca de los mecanismos de infección de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas en maíz. Enzimas de *Aspergillus* sp. capaces de degradar la cutícula del maíz como un posible factor de infección del grano. Se han purificado por medio de geles de electroforesis, proteínas de *Aspergillus*, llamadas C1 y Ccon de 1KDaa y 22-23KD, asociadas a la producción de aflatoxinas (Guo *et al.*, 1996).

En Canadá, Bayman *et al.* (1993) realizaron la caracterización morfológica y genética de grupos de compatibilidad vegetativa, en cuanto a la producción de aflatoxinas in vitro. En 1999, Tran-Dinh *et al.* realizaron la caracterización de genotipos de cepas toxigénicas y no toxigénicas de *A. flavus*. En la Argentina, Pildain *et al.* (2005) caracterizaron morfológica y toxicológicamente cepas de *A. flavus* provenientes de

diferentes regiones productoras de maní. En México, Moreno (2004) caracterizó morfológica y toxicológicamente cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* aisladas de diferentes sustratos alimenticios. También, mucho se ha estudiado sobre la relación entre las características morfológicas de estos hongos y su relación con la producción de aflatoxinas. La asociación positiva entre la producción de esclerocios y aflatoxinas ha sido observada por Wicklow y Shotwell (1983) y confirmada por los estudios de compatibilidad vegetativa, en los cuales los aislamientos que conforman un grupo de compatibilidad determinado comparten el mismo fenotipo en cuanto a la producción de esclerocios y aflatoxinas (Pildain *et al.*, 2005; Bayman y Cotty, 1993; Horn *et al.*, 1999; Pildain *et al.*, 2004).

En este trabajo se estudiaron las características morfológicas, bioquímicas, toxicológicas de 65 cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* aisladas de 14 estados de la república. El conocimiento de diferencias regionales en cuanto a las características morfológicas y toxigenicidad de las poblaciones de *A. flavus* y *A. parasiticus* puede ayudar a entender la dinámica poblacional y brindar importante información que podría ser utilizada en la implementación de medidas de control efectivas para reducir la contaminación de aflatoxinas en el campo.

El presente trabajo contribuye al conocimiento de la biodiversidad poblacional de *A. flavus* y *A. parasiticus* en México, presentando una caracterización toxigénica y morfológica de los aislamientos de este patógeno a partir de semillas de maíz procedentes de diferentes regiones agroecológicas.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

- Caracterizar morfológica y toxicológicamente cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* provenientes de maíces sembrados en 14 estados de México.

### Objetivos específicos

- Determinar la incidencia de hongos potencialmente toxigénicos en granos de maíz colectados en diferentes regiones de la república mexicana.
- Caracterizar la morfología de los hongos, tanto de las colonias como de estructuras específicas de importancia taxonómica.
- Caracterizar el potencial toxigénico de las cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* para producir aflatoxinas.
- Determinar la naturaleza química de las aflatoxinas producidas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

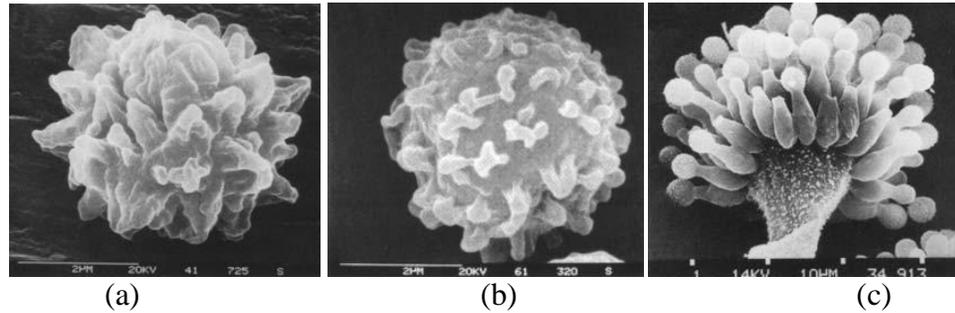
El género *Aspergillus* es uno de los más estudiados hasta la actualidad, debido a sus propiedades industriales y efectos en la salud humana. Es un género grande compuesto por más de 180 especies anamórficas aceptadas que presentan sus telomormos en 9 géneros diferentes. Se subdivide en 7 subgéneros que a su vez se dividen en grupos (Rodríguez *et al.*, 2007; Samsom & Pitt, 2000).

Algunas especies de *Aspergillus*, son mitospóricas, entre ellas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*, considerados como los principales productores de aflatoxinas (Kurtzman *et al.*, 1987). Se citan también como productores de aflatoxinas a *Aspergillus pseudotamarii* (Ito *et al.*) y a *Aspergillus bombycis* (Peterson *et al.*) pero esto no ha podido ser confirmado siempre a nivel laboratorial (Cabañes *et al.*, 2007; Ito *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001).

La identificación a nivel de género es sencilla, debido a las características de los conidióforos, pero a nivel especie es compleja debido a las similitudes presentes entre estos hongos. Para clasificarlos son utilizadas características macro y microscópicas como: *macroscópicas*: diámetro de las colonias; coloración del anverso y del reverso de las colonias; presencia de esclerocios; presencia de gotas de exudado; presencia de

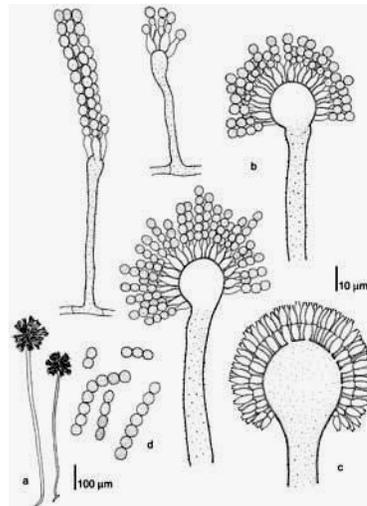
pigmento difusible; textura de las colonias y *microscópicas*: disposición de las métulas o fiálides sobre la vesícula; longitud y anchura de los estipes; forma y diámetro de las vesículas; longitud y anchura de las métulas y fiálides; forma, diámetro, ornamentación y color de las conidias; forma, tamaño y color de las células de Hülle; forma, tamaño y color de las ascosporas (Rodríguez *et al.*, 2007; Abarca, 2000). *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, se encuentran dentro del subgénero Circundati, en la sección Flavi, que incluye a los hongos no toxigénicos *A. tamaritii*, *A. sojae* y *A. orizae*. Pertenecen a los Hyphomycetes, División-Forma Deuteromycota (Rodríguez *et al.*, 2007; Kurtzman *et al.*, 1987).

La separación de las especies de *A. flavus* y *A. parasiticus* se realiza por la presencia de métulas y fiálides. *A. parasiticus* presenta fiálides uniseriadas mientras que *A. flavus* presenta fiálides uni y biseriadas. Debido a que estas características se presentan muy variables dentro de las especies, actualmente se considera la ornamentación de la conidia como punto principal en la separación (Figura 2.1). Las conidias de *A. flavus* tienen cabezuelas esféricas a elípticas y son finas a moderadamente ásperas, mientras que *A. parasiticus* presenta cabezuelas más esféricas y equinuladas a espinosas. La separación de *A. nomius* se complica, porque presenta características morfológicas similares a *A. flavus*, excepto que difiere en la producción de pequeños esclerocios en forma de bala, mientras que los de *A. flavus* son más globosos. Sin embargo no está claro si las cepas de *A. nomius* frescas produzcan esclerocios. La diferencia fundamental entre las tres especies se da en la producción de aflatoxinas B, G y ácido ciclopiazónico (Rodríguez *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Fotografía al microscopio electrónico donde se muestra la ornamentación de las esporas de (a), *Aspergillus parasiticus*, (b), *Aspergillus flavus*, (c) y la cabezuela conidial de *Aspergillus parasiticus* (Rodríguez *et al.*, 2007).

El conidióforo característico de *Aspergillus*, posee tres partes bien diferenciadas: vesícula, estipe y célula pie. Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas, biseriadas (figura 2) (Rodríguez *et al.*, 2007; Abarca, 2000; Rapper y Fennell, 1965).



**Figura 2** Características morfológicas de *Aspergillus*. (a) Célula pie, vesícula y estipe; (b) Conidióforo monoseriado; (c) Conidióforo biseriado; (d) conidias en cadenas. <http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx>

### ***Aspergillus* en maíz**

En semillas de maíz, las colonias son por lo general de color verde claro, verde amarillento claro, verde intenso, café oliváceo o café. Las semillas de maíz severamente afectadas son incoloras y arrugadas. En medio de cultivo, el color de la colonia varía de verde amarillento a verde oliváceo, micelio blanco, esclerocios marrón oscuro a negros, reverso incoloro, marrón claro o naranja, textura de la colonia lanosa o flocosa. Las colonias de *A. parasiticus* por lo general son verde más intenso (Abarca, 2000). A pesar de que estos patógenos se consideran principalmente hongos de almacenamiento, las infecciones pueden iniciarse a nivel de campo. El inóculo primario proviene de propágulos en el suelo, micelio que inverna en residuos vegetales, esclerocios, basura sobre el suelo e insectos (De la Garza, 1994).

### **Métodos utilizados para detectar aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos**

#### **Métodos basados en la utilización de medios de cultivo diferenciales**

Estos hongos pueden ser cultivados en diferentes medios tanto para su identificación como para conservarlos. El medio de cultivo Malta Sal Agar, MSA, se utiliza para aislar la mayoría de los hongos de almacén; el Czapek, Czapek con Extracto de Levadura y el Czapek con Sacarosa, se utilizan para la identificación de los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus*. El CAM, Medio Agar Coco, se utilizan para discriminar cepas toxigénicas de cepas no toxigénicas ya que al crecer las mismas y exponerlas a luz ultra violeta emiten fluorescencia. El AFPA, *Aspergillus Flavus Parasiticus* Medio, se utiliza para diferenciar a los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* de otras especies de *Aspergillus*

Por lo general su sensibilidad no es muy elevada (Rodríguez *et al.*, 2007; Sepúlveda & Piontelli, 2005; Medina *et al.*, 2002).

### **Métodos basados en técnicas cromatográficas**

La Cromatografía en Capa Fina, TLC; Cromatografía Líquida, LC; Cromatografía Gaseosa, GC, son métodos que detectan con mucha mayor sensibilidad, hasta de 5 ppb, la presencia de cepas toxigénicas. Para TLC o la LC, pueden aplicarse pequeños discos extraídos con sacabocados, o extracciones con solventes para la obtención de una mayor pureza del extracto (Pildain *et al.*, 2005; Filteborg *et al.*, 1983).

### **Métodos basados en técnicas inmunológicas**

Utilizan anticuerpos mono o policlonales dirigidos contra antígenos más o menos específicos. Una de las técnicas más utilizadas es la ELISA, leyendo a 650 nm para determinar la concentración de la toxina (Cabañes *et al.*, 2007; Medina *et al.*, 2002).

### **Métodos basados en técnicas moleculares**

Para la identificación de cepas productoras de aflatoxinas se han utilizado los genes *nor-1*, *ver-1*, *afl-R*, *omt-1*, etc., implicados en la biosíntesis de aflatoxinas y esterigmatocistina. Estos genes indican la capacidad de una cepa de ser potencialmente productora de aflatoxinas (Cabañes *et al.*, 2007). Muchos autores han probado métodos para tratar de identificar acertadamente estos hongos, pero ninguno hasta ahora indica una certeza absoluta al respecto. Se han diseñado primers dirigidos a regiones

conservadas, a zonas que codifican enzimas, se han utilizado diferentes tipos de marcadores moleculares, pero tienen baja reproducibilidad. Se han desarrollado métodos de PCR múltiple para diferenciar líneas productoras y no productoras de aflatoxinas dentro de la sección Flavi, utilizando genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxinas (Rodríguez *et al.*, 2009; Rashid *et al.*, 2008; Rodríguez *et al.*, 2007; Criseo *et al.*, 2001). Para la identificación de géneros, especies, cepas o variantes genéticas pueden utilizarse técnicas que no necesitan de la identificación de genes específicos. Entre ellas se encuentran los RFLPs, (Restriction Fragment Length Polymorphism) Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción; en la misma se realiza primero una amplificación de un segmento de ADN con un determinado cebador y posteriormente se digieren los segmentos amplificados con enzimas de restricción. Los fragmentos se separan posteriormente mediante electroforesis y de acuerdo al patrón de bandeo se pueden construir árboles filogenéticos (Cabañes *et al.*, 2007; Somashekar *et al.*, 2003). En los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), Polimorfismo de DNA amplificado al azar; se realiza la amplificación aleatoria de DNA por medio de secuencias conocidas amplificadas al azar. Tienen baja reproducibilidad. Se utilizan cebadores de 8 a 10 nucleótidos que se pegan a distintas regiones del DNA y generan una secuencia de bandeo que puede ser distinta según la secuencia génica de las cepas en estudio. Varios autores los han trabajado y recomiendan diferentes primers para identificar a estos patógenos, entre ellos el P160, P117, P10, PM1, P111, P237, P1250, OPA-04, OPB-10, OPA-14, OPA-17, OPA-20, OPW-04, OPW-05 OPR-01 (Batista *et al.*, 2008; Lourenco *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 1995; Bayman & Cotty, 1993). Los AFLPs, (Amplified Fragment Length Polymorphism) Polimorfismo de longitud de

fragmentos amplificados. Se amplifican selectivamente fragmentos de DNA obtenidos mediante la digestión con enzimas de restricción. La amplificación es específica, puesto que se utilizan primers complementarios a la secuencia de los adaptadores que se ligan a los extremos de los fragmentos de DNA digeridos. La presencia o ausencia de bandas genera un patrón para cada cepa analizada. Estos patrones pueden ser analizados en forma automática (Batista *et al.*, 2008; Cabañes *et al.*, 2007; Baird *et al.*, 2006). Otro método muy utilizado actualmente es la SECUENCIACION, que consiste en la determinación de la secuencia de fragmentos de DNA amplificados que posteriormente se comparan con secuencias depositadas en bases publicas de datos como el Genbank o EMBL. Son estas mismas secuencias, las que permiten el diseño de primers que se utilizan en otras técnicas citadas anteriormente (Cabañes *et al.*, 2007).

RT-PCR, (Real Time Polymerase Chain Reaction), se trata de una PCR cuantitativa y en tiempo real. En este tipo de PCR la cantidad de fragmento amplificado se analiza en cada ciclo de amplificación. Estos combinan la amplificación de DNA, la hibridación con sondas y la generación de una señal fluorescente que permite cuantificar el DNA diana con una buena reproducibilidad. Se han realizado trabajos en el área de la medicina, en el diagnóstico de la aspergillosis nosocomial, para dilucidar genes involucrados en la biosíntesis de aflatoxinas principalmente (Cabañes *et al.*, 2007; Kami *et al.*, 2001). MICROARREGLOS, (Microarrays), esto permite el análisis comparativo y simultáneo de la expresión de cientos de genes en un recipiente similar a un portaobjetos y en un tiempo muy reducido. Aún se encuentra en etapa inicial de uso y para lograr una mayor fiabilidad en su uso deberán de incluirse fragmentos y secuencias con

información filogenética de especies potencialmente productoras conjuntamente con genes esenciales involucrados en la biosíntesis de micotoxinas (Cabañes *et al.*, 2007; Bhatnagar *et al.*, 2006; O'Brian *et al.*, 2002).

## **Micotoxinas**

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por ciertos hongos en productos agrícolas expuestos a la infestación fúngica. Su producción es inevitable y depende de diferentes factores ambientales en el campo y/o durante el almacenamiento. Dado su carácter inevitable e imprevisible, la contaminación por micotoxinas plantea un problema especial para la inocuidad de los alimentos (López & Park, 1999).

Derivan de las palabras griegas *Mikes*, hongo y *toxina*, veneno. Su formación tiene lugar al final de la fase de crecimiento, durante la fase estacionaria siendo a menudo asociado con la diferenciación y la esporulación (Goldblatt, 1972). Son moléculas pequeñas, de peso molecular menor a 700 kDa. La mayor parte de ellas se originan en la ruta policetónica, aunque existen otras rutas biosintéticas más complejas y las mismas relacionadas con un menor número de especies fúngicas productoras de la toxina (Moss, 1991). La presencia de estas micotoxinas puede darse en forma individual o simultánea con otras, lo que puede provocar efectos sinérgicos en el organismo, aumentando su toxicidad (Soriano, 2007).

## **Aflatoxinas**

Son micotoxinas producidas por los hongos *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. El estudio de las mismas se inicio en 1960, debido a la muerte en Inglaterra de 100.000 pavitos a causa de la que en su momento se llamó enfermedad X del pavo. Esta enfermedad se manifestó con la pérdida de apetito, letargo y debilidad de los animales. Cuando las aves estaban por morir, el cuello se arqueaba, la cabeza se tiraba hacia atrás y las patas quedaban tendidas. Posteriormente se descubrió que la causa de la muerte de las aves se debió a una intoxicación producida por alimento contaminado *A. flavus* presente en pasta de cacahuete importada de Brasil. (Rodríguez *et al.*, 2007; Moreno & Gil, 1990; Sargent *et al.*, 1961). En forma natural se han encontrado más de 13 distintos tipos de aflatoxinas, siendo derivados de la difurano cumarina. Pueden localizarse en el micelio de los hongos, en las esporas o ser excretadas como exotoxinas que se liberan en el medio donde crece el hongo (Ortiz, 1992). *A. flavus* produce únicamente aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y ácido ciclopiazónico o ambos o ninguna; *A. parasiticus* y *A. nomius*, producen aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>; *A. pseudotamarii* aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y Ácido ciclopiazónico y a *A. bombycis* aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (Rodríguez *et al.*, 2007; ; Ito *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001; Pitt & Hocking, 1997; Horn & Greene, 1995). Sin embargo, algunos autores, detectaron la producción de aflatoxinas de tipo G por cepas identificadas morfológicamente como pertenecientes a *A. flavus* (Vaamonde *et al.*, 2003; Cotty, 1989; Klich y Pitt, 1988; Saito *et al.*, 1986). Son las sustancias carcinógenas más potentes hasta ahora conocidas. Son además teratogénicas y mutagénicas. El principal órgano diana es el hígado, donde producen daño hepático agudo, cirrosis; además inducen tumores, disminución de la eficiencia del sistema

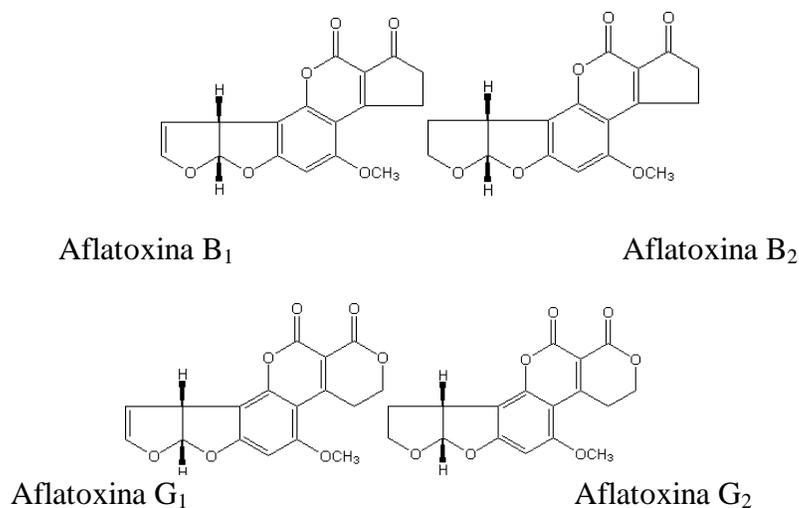
inmunitario, afecciones de los pulmones. Se acumulan en los tejidos y se excretan por la leche. La aflatoxina B<sub>1</sub> actúa también sobre el metabolismo de los lípidos y de los glúcidos. Se considera a la aflatoxina B<sub>1</sub> como la de mayor riesgo (Ruíz & Font, 2007). La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer IARC, clasifica a las aflatoxinas dentro del grupo 1 en su sistema de clasificación, como agente altamente carcinogénico en humanos (IARC, 2006).

Por lo general, la aflatoxina AFB<sub>1</sub> es la que se encuentra en mayores concentraciones, además es la más potente de todas. Cuando los animales ingieren en sus alimentos aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>, en lactancia, las mismas son excretadas por la leche en forma de aflatoxinas M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>, formas alteradas pero aun tóxicas (Soriano, 2007; Moreno, 1988). En los Estados Unidos el nivel máximo permitido de aflatoxinas en leche es de 0.5 ppb. Se ha encontrado una relación entre el nivel de aflatoxinas en alimentos balanceados y el nivel de aflatoxinas en leche 0.91% de las aflatoxinas presente en los animales pasa a la leche (Moreno & Gil, 1991). La importancia de las aflatoxinas radica en el riesgo que representan para la salud pública, así como las pérdidas económicas por la baja calidad del grano, limitaciones en las exportaciones, costos de manejo, análisis y eliminación de material contaminado (Acosta, 1994).

### **Estructura molecular del compuesto y propiedades**

Las aflatoxinas están estructuralmente relacionadas, químicamente son cumarinas sustituidas conteniendo anillos de bifurano y configuración tipo lactona. Son ópticamente activas, fluorescentes bajo luz ultravioleta y sus pesos moleculares varían

de 312 a 350 kd; son poco solubles en agua pudiendo ser extraídas con solventes orgánicos moderadamente polares. Cuando se encuentran en estado puros son termo resistentes alcanzando sus puntos de fusión temperaturas superiores a 250°C y se funden entre 190 y 310°C; y rangos de pH entre 3 y 10. Son fotosensibles y tienden a descomponerse cuando están en solución sobre todo acuosa o metanólica. Se descomponen bajo la acción de agentes oxidantes o álcalis fuertes y hipoclorito de sodio. Se han identificado 18 tipos de aflatoxinas de las cuales seis son contaminantes de alimentos: las del grupo B (B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub>), G (G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) y M (M<sub>1</sub> y M<sub>2</sub>)(Juan *et al.*, 2007; Ortiz, 1992).



**Figura 3.** Estructuras químicas de AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub> (Juan *et al.*, 2007).

### Biosíntesis de las aflatoxinas

Como ya se ha mencionado, las aflatoxinas son químicamente difuranocumarinas formadas por anillos heterocíclicos donde se relaciona a los furanos con la toxicidad y a la lactona con la fluorescencia de las partículas, además a la susceptibilidad de los

compuestos a la hidrólisis alcalina. En su biosíntesis están involucradas la condensación de un acetyl con tres o más unidades de malonil con la pérdida de  $\text{CO}_2$  (Yu *et al.*, 2002; Lillehoj, 1983; Bennet & Lee, 1979; Buchi & Rae, 1969). Se relaciona la biosíntesis de aflatoxinas con la de los lípidos y se asume una disminución en la síntesis de proteínas en algunos casos. La producción de aflatoxinas se inicia durante la fase estacionaria de crecimiento del hongo. Al inicio del crecimiento del mismo la producción de aflatoxinas es baja o nula, pero a medida que los niveles de nitrógeno y fosfatos se reducen en el medio, el metabolismo primario se desorganiza produciéndose la acumulación de metabolitos primarios e iniciándose la producción de aflatoxinas (Yu *et al.*, 2002; Magno *et al.*, 1997; Cleveland & Bhatnagar, 1991). Varias enzimas con distintas actividades dentro de la vía han sido identificadas y algunas parcialmente purificadas metiltransferasas, reductasas, ciclasas, esterasas, etc. Las enzimas implicadas y sus sitios de acción se muestran en la Figura 4 (Yu *et al.*, 2002). En la biosíntesis de las aflatoxinas están involucrados cuatro genes principales (afl-R; nor-1; ver-1; omt-1). Tales genes son responsables de la regulación biosintética de la producción de las mismas, así como otros genes homólogos (Díaz, 1994). La biosíntesis de las aflatoxinas  $\text{B}_1$ , ha sido dilucidada tanto a nivel bioquímico como a nivel genético. Las aflatoxinas son sintetizadas extra mitocondrialmente a partir de la Acetyl coenzima A, derivada del catabolismo de carbohidratos simples. Los intermedios glicolíticos estimulan la producción de aflatoxinas asociadas a la caída de niveles de piruvato y fosfoenol piruvato, los cuales son precursores de tres carbonos del acetato y malonato. En la primera fase de la biosíntesis de estas micotoxinas, el acetato y la malonil CoA, son convertidos a hexanoilo mediante una sintetasa de ácido graso. Este hexanoilo, es

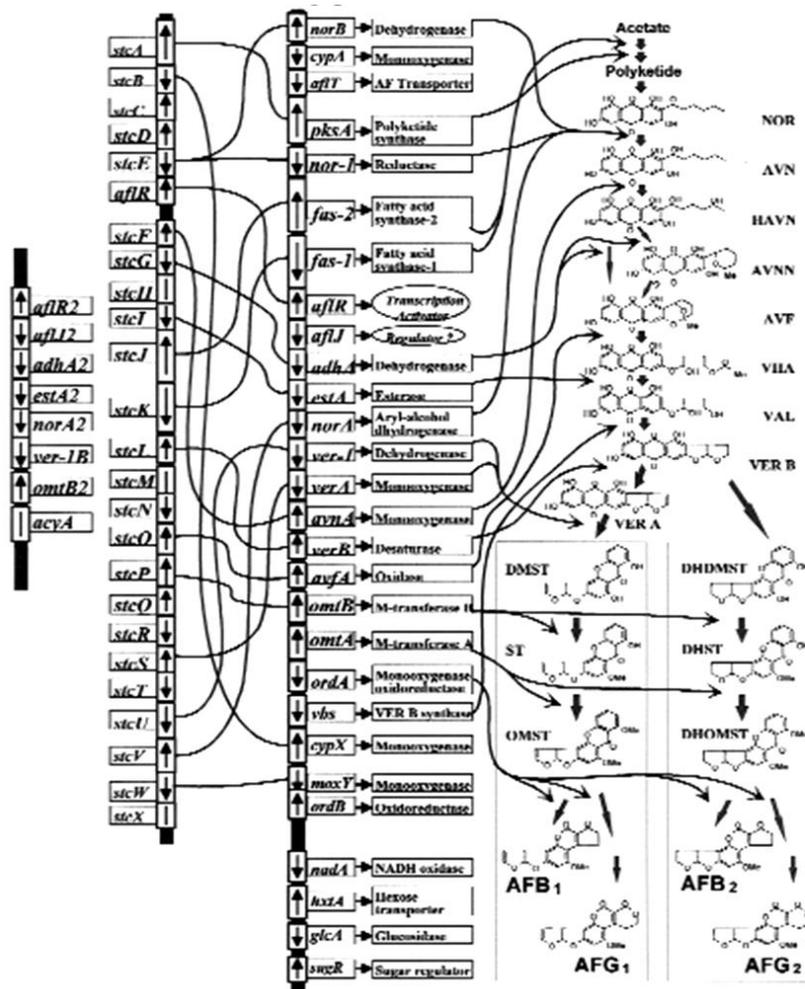
extendido por una poliketido sintetasa hasta el decaetido ácido norsolorínico, NOR, primer precursor estable en la biosíntesis de las aflatoxinas. El poliketido sufre posteriormente de 12 a 17 transformaciones enzimáticas a través de vías intermediarias, que se resumen en la (Figura 2.4); la averantina, AVN; la hidroxiaverantina, HAVN; la averufina, AVF; la hidroxiversicolorina, HVN; el acetato hemiacetal versiconal, VHA; el versiconal, VAL; la versicolorina B, VERB; la versicolorina A, VERA; la dimetil esterigmatocistina, DMST; la esterigmatocistina, ST; la orto-metil esterigmatocistina, OMST, Aflatoxinas, B<sub>1</sub> o B<sub>2</sub>; G<sub>1</sub> o G<sub>2</sub>, al dividirse la vía en 2 ramas. Mediante estudios genéticos sobre el mecanismo molecular de biosíntesis de la aflatoxina B<sub>1</sub>, se ha descrito, un fragmento de 70 pares de kilobases de longitud, conteniendo al menos 24 genes estructurales conocidos, incluyendo un gen de regulación positiva como activador de transcripción. Dichos genes estructurales codifican monoxigenasas del citocromo P450, deshidrogenasas, oxidasas, metiltransferasas, una poliketido sintetasa y dos sintetasa de ácidos grasos exclusivas. Dos genes de la sintetasa de ácidos grasos (*fas-1* y *fas-2*) y una poliketido sintetasa (*pksA*) participan en la síntesis del decaetido de malonil CoA. Una vez formado, el decaetido se cierra del anillo para formar un producto, norantrona que luego debe someterse a la oxidación para formar el primer producto estable intermedio, el ácido norsolorínico (NOR). En la conversión de norantrona NI, se supone involucrada una oxidasa. La conversión de la NI a la AVN requiere una deshidrogenasa, codificada por el gen *ni-1*. Genes adicionales, tales como *nor a* están en el grupo que codifican deshidrogenasas, que también pueden ser capaces de llevar a cabo la conversión. Se confirmó más tarde que el próximo intermedio estable es dimetilesterigmatocistina (DMST), que la citocromo P-450

monoxigenasa codificada por *ver a* es necesaria para la conversión de VERA a DMST. Una citocromo P-450 monoxigenasa codificada por el gen *avn A* se requiere para la conversión de la AVN a HAVN, mientras que el gen que codifica una alcohol deshidrogenasa, ADHA se consideró esencial para la conversión de Havn a AVF. El gen que codifica una *avf A* oxidasa es responsable para la conversión de AVF a VHA. El gen *vbs* codifica una deshidratasa que cataliza la cadena lateral de la ciclización VHA a VER (AB). En la última fase de la biosíntesis de la aflatoxina, una orto-metiltransferasa es necesaria para la conversión de la ST orto-metilsterigmatocistina (OMST). El *omtA* fue el primer gen confirmado en la biosíntesis de aflatoxinas. Otro gen que codifica una desmetilasa llamada *omtB* metiltransferasa es necesario para la conversión de DMST a ST y DHDMST a DHST. El paso final en la formación de aflatoxinas es la conversión de OMST o DHOMST a aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>, medidas que requieren la presencia de un NADPH dependientes de una monoxigenasa (*ORDA*) Otro gen *afIT* codifica una proteína con homología a los antibióticos. El flujo de proteínas, que podría ser necesario para el transporte de las toxinas a las células del hongo (Yu *et al.*, 2002).

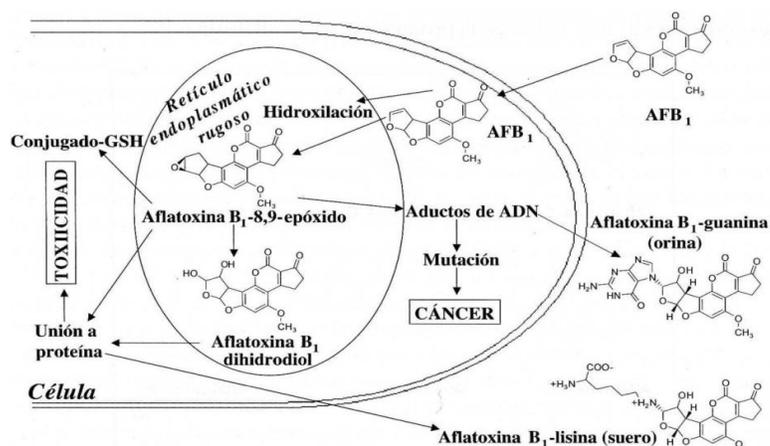
### **Mecanismo de acción de las aflatoxinas**

Las aflatoxinas ingeridas con los alimentos son absorbidas en la mucosa intestinal y pasan al torrente circulatorio, a través del cual llegan al hígado, riñones, canales biliares y sistema nervioso donde se acumulan. En los animales es evidente el daño al hígado y la disminución de la transformación de alimento en carne, huevo o leche (Ortiz, 1992). La AFB<sub>1</sub> se considera la aflatoxina más importante, no solo porque

aparece con más frecuencia y en más abundancia, sino también porque es la más tóxica. La AFB<sub>1</sub>, es absorbida en el intestino delgado y es transportada por los glóbulos rojos y las proteínas hasta el hígado, mayoritariamente por la vía portal. La toxina entra en la célula y es metabolizada en el retículo endoplasmático para ser hidroxilada y transformarse en varios compuestos como aflatoxinas P<sub>1</sub>, M<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub>. También puede darse la formación de aflatoxina B1-8,9-epoxido que puede ser eliminado por la orina (Juan *et al.*, 2007; Galtier, 1999).



**Figura 4.** Ruta biosintética de las aflatoxinas indicando los genes y sus respectivas enzimas involucradas (Yu *et al.*, 2002).



**Figura 5.** Mecanismo de acción de las AFB<sub>1</sub> (Juan *et al.*, 2007).

## Toxicología

Las aflatoxinas son genotóxicas y la IARC, clasifica a la AFB<sub>1</sub> dentro de la categoría 1 en base a la existencia de suficientes evidencias acerca de su carácter carcinogénico para el hombre (SCO, 1996). Los efectos tóxicos dependen de las dosis, duración de la ingestión, edad, especie, sexo y del estado nutricional de la persona o animal. Las principales aflatoxicosis se han dado en países India, China, Tailandia, África, Asia y algunas regiones de Sudamérica. En la población infantil se ha relacionado epidemiológicamente la presencia de aflatoxinas con ictericia neonatal, encefalopatía y degeneración de la grasa visceral, kwashiorkor (Juan *et al.*, 2007; Peraica *et al.*, 1999; Hendrickse, 1997).

## Toxicidad aguda

Se produce cuando se ingieren grandes cantidades de aflatoxinas. La presencia de aflatoxinas en el hígado da lugar a una infiltración de lípidos que dará lugar a necrosis celular hepática. Los metabolitos originados reaccionan con diferentes proteínas

celulares lo cual origina la inhibición de la síntesis de proteínas, además de la inhibición de la síntesis de carbohidratos y lípidos. Esto produce anorexia, depresión, ictericia, diarrea, fotosensibilidad y muerte. También producen efectos citotóxicos y la AFB<sub>1</sub> puede inhibir la actividad de la fosfodiesterasa nucleótido cíclica en el cerebro, hígado, corazón y tejidos renales (Juan *et al.*, 2007; Moss, 2002; IARC, 2002). Se han presentado casos de este tipo en 1974, en la India, donde 150 poblaciones de los estados de Gujarat y Rajastán, se vieron afectadas por un brote epidémico. 108 personas fallecieron siendo el total de intoxicados de 397. Se encontraron niveles de entre 6250 y 15600 µg/kg de aflatoxinas en granos de maíz contaminado. En el año 2004, en Makueni y Kiyui, Kenia, fallecieron 125 personas de las 317 intoxicadas con maíz contaminado con aflatoxinas, donde se detectaron niveles que variaron de 20 a 8000 µg/kg (Juan *et al.*, 2007; Krishnamachari *et al.*, 1975).

### **Toxicidad crónica**

Se produce debido al consumo de alimentos contaminados con niveles bajos de aflatoxinas durante semanas y/ o meses. Los síntomas no son muy específicos: reducción en la ganancia de peso, menor índice de conversión, disminución en la producción de huevos y leche y mayor susceptibilidad a ciertas enfermedades. (Juan *et al.*, 2007; Moss, 2002).

### **Ingesta diaria**

La Unión Europea mantiene que para este tipo de sustancias no existe ningún umbral por debajo del cual no se hayan observado efectos nocivos, por lo tanto no

considera pertinente fijar una dosis diaria tolerable y ha seguido el criterio de fijar los límites legales en los niveles más bajos posibles, es así que admitiendo que actualmente no es posible la eliminación total de la presencia de aflatoxinas en los alimentos, la concentración más baja permitida de AFB<sub>1</sub>, está establecida en 2µg/kg (ECOSCF, 1996).

### **Condiciones para la producción de aflatoxinas**

La producción de aflatoxinas está condicionada por una serie de factores (Moreno & Gil, 1991): a) el hongo productor; b) el sustrato; c) el contenido de humedad del ambiente; d) el contenido de humedad del sustrato; f) la temperatura; g) la microbiota asociada; h) el oxígeno en la atmósfera de almacenamiento; i) el período de almacenamiento. La sola presencia del hongo no implica la presencia de aflatoxinas o que las mismas vayan a producirse. Bajo condiciones óptimas para el desarrollo de los hongos, la producción de aflatoxinas puede ser alta a las 24 horas. El máximo se alcanza a los 7 a 10 días y posteriormente el nivel de aflatoxinas fluctúa con el tiempo, pero bajo las condiciones en que normalmente se manejan los productos agrícolas, las mismas son muy estables, resistiendo las temperaturas de elaboración de los alimentos (Moreno, 1988).

### **Factores implicados en la producción de aflatoxinas**

#### **El hongo**

Los hongos aflatoxigénicos producen esporas en gran número y las mismas requieren para germinar una humedad relativa mínima de 83% y para establecerse el

hongo requiere una humedad de 85% (actividad de agua de 0.80 a 0.85). Estos hongos son considerados parásitos débiles por lo cual invaden con mayor facilidad plantas débiles, semillas débiles, en fin plantas sometidas a condiciones de estrés como sequías, altas temperaturas (32 a 38°C), especialmente temperaturas nocturnas elevadas, ataques de insectos, etc. Proliferan fácilmente en tejidos muertos ya que son más saprobios que parásitos (Mazzani *et al.*, 2004; Moreno & Gil, 1991; Moreno, 1988, Christensen, 1974). El porcentaje de cepas productoras de aflatoxinas dependerá no solo del genotipo del hongo, sino además de factores ambientales que ejercen su influencia sobre el metabolismo y crecimiento del mismo. Algunos autores indican que en el caso de *A. flavus*, el 40% de los aislamientos son aflatoxigénicos, pero existen importantes diferencias geográficas y estacionales. En cambio en el caso de *A. nomius* y *A. parasiticus* esto es mucho más elevado, muchas veces el 100% (Cabañes *et al.*, 2007). *A. flavus* presenta mayor actividad proteolítica, *A. parasiticus* mayor actividad lipolítica, por lo tanto *A. flavus* es más abundante en maíz y *A. parasiticus* en cacahuete (Moreno & Gil, 1991; Gendy & Marth, 1980).

### **Micobiota asociada**

*Aspergillus* es un hongo débil, y es mal competidor con otros hongos que crecen en el mismo sustrato bajo las mismas condiciones ambientales (Moreno & Gil, 1991). En la competencia con la micobiota se puede alterar el metabolismo del hongo aflatoxigénico, por competencia por el sustrato o por la alteración de las condiciones ambientales de crecimiento. Lo que puede inhibir la producción de aflatoxinas o crear un efecto sinérgico en su producción (Moreno, 2004; Moreno & Gil, 1991).

### **Cantidad de inóculo**

La producción de aflatoxinas está relacionada al crecimiento vegetativo del hongo, a la llamada lag fase o fase estacionaria, por lo tanto es lógico razonar que a mayor esporulación menor producción de aflatoxinas. Existe una correlación lineal entre la fase lag y la fase log de acuerdo a la cantidad de inóculo inicial. La máxima producción de aflatoxinas se da con una carga de esporas de 10<sup>3</sup> esporas por mililitro (Soriano, 2007; Moreno, 2004; Karunaratne & Bullerman, 1990; Gonzales *et al.*, 1987).

### **Sustrato**

Prácticamente cualquier sustrato que permita el crecimiento de las especies toxigénicas es apto para la producción de aflatoxinas.. En ciertas plantas las aflatoxinas se forman de manera natural, como en el cacahuete, coco, copra, semilla de algodón y en cereales en maíz y sorgo, en ciertas cantidades que pueden ser riesgosas para la salud humana y animal (Moreno & Gil, 1991).

Sustratos con altas concentraciones de carbohidratos y ácidos grasos aumentan la producción de aflatoxinas. *A. flavus* presenta mayor actividad proteolítica y *A. parasiticus* mayor actividad lipolítica (Moreno, 2004; Gendy & Marth, 1980). Con incubación prolongada a 25°C las proteínas son degradadas a aminoácidos por las proteasas de los hongos. Estos pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno o de carbono. Cuando se usan como fuentes de carbono se pueden producir grandes cantidades de amonio, y esto afecta a la producción de aflatoxinas (Moreno, 2004). La producción óptima de aflatoxinas ocurre sobre sustrato sólido rico en carbohidratos

como coco, trigo, arroz, semilla de algodón. También ciertos aminoácidos como glicina, glutamato, prolina, aspartato y glutamina estimulan la producción de aflatoxinas. También macronutrientes como  $\text{Ca}^{2+}$ , que participa en procesos intracelulares y micronutrientes como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ . El  $\text{Zn}^{2+}$ , actúa en la formación de compuestos intermediarios como VER A. Además vitaminas del complejo B, excepto la riboflavina (Moreno, 2004; Praveen & Subramanyam, 1999; Bennett *et al.*, 1979; Detry *et al.*, 1971; Davis y Diener, 1968).

### **Agentes antifúngicos**

Ácidos orgánicos y sus sales como el ácido propiónico o el sórbico, que son fungistáticos e inhiben el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* y la producción de aflatoxinas (Moreno, 2004; Dixon & Hamilton, 1981). Aceites esenciales de plantas como *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Thymus vulgaris* han mostrado efecto fungistático sobre el hongo *A. flavus* (Cruz, 2008).

### **Temperatura**

Los *Aspergillus* pueden crecer a temperaturas de 8 a 55°C, siendo de 36 a 38°C las temperaturas óptimas de desarrollo y de 25 a 35°C las temperaturas óptimas de producción de aflatoxinas. No se producen aflatoxinas por debajo de 10°C y por encima de 45°C. El rango de producción es entre 12 y 40°C (Soriano *et al.*, 2007; Moreno & Gil, 1991). A bajas temperaturas, las cantidades de AFB y AFG son aproximadamente iguales; a temperaturas más elevadas la producción de AFB es predominante (Moreno, 2004).

## **Humedad**

La humedad relativa mínima para el desarrollo de hongos aflatoxigénicos es de 85% no existiendo un límite superior de humedad para la producción de estas toxinas. La actividad del agua para producción de aflatoxinas varía de 0.82 a 0.99 (Soriano *et al.*, 2007; Moreno & Gil, 1991).

## **Gases**

Las especies de *Aspergillus* son aerobias, y a niveles de 1% de oxígeno en el ambiente se detiene su desarrollo y por ende la producción de toxinas. (Moreno & Gil, 1991). Concentraciones de CO<sub>2</sub> mayores a 20% inhiben la germinación de las esporas. Concentraciones de 10% suprimen la producción de aflatoxinas. Concentraciones de oxígeno menores a 20 y mayores a 90% también inhiben la concentración de aflatoxinas (Moreno, 2004; Tabak & Cooke, 1968; Landers *et al.*, 1967).

## **pH**

Por lo general las especies de *Aspergillus* toleran mal los valores de pH ácidos (2-3), su crecimiento se ve menos afectado por pH alcalinos. La producción de aflatoxina G<sub>1</sub> es más dependiente del pH que la B<sub>1</sub>, no produciéndose a valores de pH de 2.5. La relación entre la producción de AFB<sub>1</sub>/AFG<sub>1</sub>, es de 3.0 a pH de 3.5 mientras que a pH de 5.5 es de 0.5 se ha encontrado que, por lo general, la expresión de seis genes implicados en la biosíntesis de aflatoxinas es inversamente proporcional al efecto del pH en la acumulación de aflatoxinas (Erlich & Cotty, 2003).

## **Luz**

La luz afecta el desarrollo de los hongos aflatoxigénicos y por lo tanto la producción de aflatoxinas. La fotorespuesta es además afectada por otros factores como la temperatura, y el tipo de sustrato. En estado puro se degradan con facilidad por efecto de la luz (Juan *et al.*, 2007; Bennett *et al.*, 1978).

## **Aflatoxinas en maíz**

La contaminación del grano de maíz con hongos productores de aflatoxinas empieza a nivel del campo, y puede continuar durante el transporte y almacenamiento cuando los granos no se encuentran acondicionados correctamente (Acosta, 1994; Moreno & Gil, 1991). En los EEUU se han reportado maíces contaminados con *A. flavus* desde los años 20 y para el año 92 había reportes de contaminación en maíces antes de la cosecha en 21 estados de la Unión Americana. En México entre 1989 y 1990 la totalidad de la producción maicera del estado de Tamaulipas se contaminó con aflatoxinas casi en su totalidad. En el año 1993, se logró bajar la contaminación a un 0.5% de la producción total (Acosta, 1994).

El grano es el único órgano de la planta de maíz que interviene en la contaminación con aflatoxinas. Los híbridos de maíz que producen pericarpio más delgado son más susceptibles a la contaminación con aflatoxinas. Las síntesis de las mismas se llevan a cabo en los tejidos ricos en lípidos del embrión y la aleurona. Posteriormente la infección puede progresar dentro del endospermo. Los granos de maíz contaminados con aflatoxinas están distribuidos al azar dentro del elote (Dunlap, 1994).

### **Aflatoxinas en maíz en México**

La contaminación del maíz con aflatoxinas es muy importante para México debido a que es utilizado principalmente para consumo humano: se consumen 325 g de tortilla /día/ per cápita e importa alrededor de 6 millones de toneladas de maíz al año. Se ha demostrado que la nixtamalización destruye del 95 al 100% de las aflatoxinas en maíz naturalmente contaminado por estas sustancias. Los datos obtenidos sobre la contaminación de maíz por AFB<sub>1</sub> en campo ilustran claramente que existen regiones en donde la concentración de AFB<sub>1</sub> es alta, por ejemplo, en varios municipios de Tamaulipas, en 1989 hubo maíz con concentraciones de 125 µg de AFB<sub>1</sub>/ kg; también existen regiones como el Bajío Guanajuatense donde la concentración de estos contaminantes es baja, ya sea por infestación natural o por infestación artificial con un hongo toxigénico muy estable. La concentración más alta fue de 8.8 µg/kg en la infestación natural evaluada en tres genotipos diferentes y la artificial de 24.7 µg/kg. Estas mismas diferencias se observan cuando el maíz está almacenado, así, regiones de baja humedad relativa y temperatura son las más favorables para mantener bajos niveles de contaminación (Guzmán, 1996; Guzmán *et al.*, 1995).

En Tamaulipas, el género *Aspergillus* fue el más abundante, más de 40% en grano almacenado, y a nivel de campo, *Fusarium*, más de 60% (Hernández *et al.*, 2007).

En Sonora, fueron aislados en orden decreciente de importancia *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria* y *Penicillium*, de grano de maíz colectado de las zonas de Río Sonora, Hermosillo, Valle del Yaqui y Valle del Mayo (Gallardo *et al.*, 2006).

## Métodos de análisis

Las metodologías de análisis son variadas dependiendo del objetivo del mismo y varían desde los más precisos y por lo general costosos a aquellos que solo indican la posibilidad de presencia de las aflatoxinas. Las aflatoxinas pueden analizarse utilizando pruebas de 3 tipos: a. Presuntivas, que pueden realizarse a nivel de campo y sirven para determinar si deben o no realizarse pruebas cuantitativas; b. pruebas rápidas de escrutinio, sirven para definir la presencia o ausencia de aflatoxinas; c. Métodos analíticos, que son aquellos que determinan en forma exacta el nivel de la toxina en un producto. (Soriano *et al.*, 2007).

Las pruebas presuntivas se basan en la propiedad de las aflatoxinas de emitir fluorescencia bajo luz ultra violeta de 365 nm. Esta prueba solo funciona en granos vivos, pero las toxinas pueden producirse en granos vivos y muertos. Cuando se presentan una o más partículas fluorescentes por kilogramo de muestra debe realizarse un análisis químico. Para evitar errores se recomienda el uso de una muestra patrón. (Moreno & Gil, 1991). Dos métodos rápidos han sido aceptados por la AOAC, el de Romer, recomendado para maíz blanco amarillo con una sensibilidad de 15 ppb y el de Holaday-Velasco, para maíz, y con una sensibilidad de 10 ppb. (Moreno & Gil, 1991). En el método de Holaday-Velasco, la muestra se hace pasar a través de una minicolumna de albumina neutra, gel de sílice, florisil, CaSO<sub>2</sub> y fibra de vidrio, donde las aflatoxinas quedan retenidas en el florisil y se observan como una banda fluorescente bajo luz ultravioleta. El método Romer es presuntivo, en el mismo también se hace pasar

la muestra por una columna de composición patentada donde las aflatoxinas quedan retenidas y también se observan como una banda fluorescente bajo luz ultravioleta.

Otro método todavía aceptado es el de la Cromatografía en Capa Fina, TLC, en la misma, se pueden identificar aflatoxinas B y G, bajo luz UV de 365 nm. Se considera un análisis semicuantitativo. La AOAC, aprueba un método de cromatografía en capa fina para aflatoxinas en maíz, utilizando como solvente cloroformo agua 250:14. También en la AOAC se especifican los criterios para verificación de la calidad de los estándares (Soriano *et al.*, 2007; Moreno & Gil, 1991). Existen también métodos serológicos cuali y cuantitativos aceptados por varios países como oficiales dentro de sus normas fitosanitarias, entre ellos Aflatest, EZ-Screen, Agri-Screen, Minicolumnas, Afla-20Cup, Sam-A, Oxoid, etc. (Moreno & Gil, 1991). Un análisis muy utilizado en la cuantificación de aflatoxinas es la Cromatografía Líquida de Alta Presión HPLC, que puede detectar concentraciones de hasta 100µg /100g de muestra, es el método más exacto y reproducible, pero es el más costoso y el que requiere de personal más capacitado (Soriano *et al.*, 2007; Ortiz, 1992; Moreno, 1988). La única prueba biológica que fue aceptada por la AOAC en 1984, es la de embrión de pollo para aflatoxina B1 (Moreno, 1988). La eficiencia en el análisis depende de varios factores como (Moreno & Gil, 1991): la calidad del muestreo, el método de análisis escogido (calidad de estándares y reactivos, equipo, etc.) y conocimientos y destreza del analista. La distribución de la aflatoxinas es muy heterogénea unos cuantos granos pueden contener una alta cantidad de toxina y sacar de norma un lote de granos de maíz. Shotwell *et al.*, 1974, encontraron en un solo grano de maíz 400 mil microgramos de aflatoxina. Cabe

destacar que en productos molidos o líquidos la distribución de aflatoxinas es más homogénea. Para maíz se recomiendan muestras no menores a 5 kg. A mayor tamaño de muestra de un lote que se analice, la presencia de aflatoxinas tiende a adquirir una distribución normal (Ortiz, 1992; Moreno & Gil, 1991). El muestreo se deberá considerar como la etapa más crítica e importante de cualquier proceso encaminado al diagnóstico de aflatoxinas en alimentos (Ortiz, 1992).

### **Control de la contaminación con aflatoxinas**

La mejor manera de evitar la contaminación con aflatoxinas es tomando precauciones desde el campo. (Sanchis *et al.*, 2007; Moreno & Gil, 1991). Desarrollo de variedades resistentes, se tienen maíces como reportados como resistentes a aflatoxinas desarrollados en los EEUU y a nivel México recientemente se ha reportado al H443A como tolerante a la contaminación a aflatoxinas en silos. Está diseñado para la producción en el noreste de México y otras regiones similares de clima semiárido [http://www.inifap.gob.mx/quienes\\_somos/noticias\\_html/nota\\_dia\\_agricultor2008.htm](http://www.inifap.gob.mx/quienes_somos/noticias_html/nota_dia_agricultor2008.htm) [http://intranet.inifap.gob.mx/boletin\\_inifap/boletin\\_inifap03.pdf](http://intranet.inifap.gob.mx/boletin_inifap/boletin_inifap03.pdf) (Sanchis *et al.*, 2007; Moreno & Gil, 1991). Uso de prácticas de manejo de cultivo adecuadas (Sanchis *et al.*, 2007; Moreno & Gil, 1991). Manejo de datos epidemiológicos, de las condiciones del suelo y de riesgos (Moreno, 2004). Manejo adecuado de restos de cultivo, malezas y rotación de cultivos (Moreno, 2004). Uso de fungicidas y fungistáticos (Sanchis *et al.*, 2007; Moreno & Gil, 1991). Control de insectos plaga, tanto a nivel de campo como en silos. (Sanchis *et al.*, 2007; Moreno & Gil, 1991). Cosechar al punto de madurez fisiológica evitando dejar el grano en campo más tiempo del necesario (Moreno, 2004).

Secado de granos, uso de compuestos conservantes. Se ha probado que los compuestos de ácido acético, propionico, sus sales y mezclas. Antimicrobianos naturales como timol, eugenol, carvacol (Sanchis *et al.*, 2007; Moreno & Gil, 1991). Almacenamiento de granos a bajas temperaturas, modificación de contenido de oxígeno en las atmósferas de almacenamiento (Sanchis *et al.*, 2007; Moreno, 1988). Utilización de cepas atoxigénicas de hongos (Sanchis *et al.*, 2007; USDA ARS, 2005).

### **Destoxificación**

Aunque las aflatoxinas son sensibles a oxidantes energéticos, álcalis, amoníaco, y eventualmente a la degradación microbiana no existe actualmente una tecnología para la eliminación de las mismas una vez que los alimentos han sido contaminados (Ortiz, 1992). Han sido probados sin embargo algunos métodos, tanto físicos, como químicos y biológicos.

### **Tratamientos físicos**

No se debe olvidar que las aflatoxinas son termoresistentes, algunos autores mencionan que en ciertos alimentos se requieren temperaturas de hasta 300°C para eliminar la toxina, puesto que la AFB<sub>1</sub> es estable hasta 260°C. Uno de los métodos físicos utilizados en maíz es el de tostado o freído a 100-150°C durante 30 min, reduce la AFB<sub>1</sub> en un 40 a 80%. Otro método utilizado es la adsorción. En el caso de las aflatoxinas, el carbón activo se considera relativamente eficaz. En cuanto al uso de la radiación, se ha experimentado con luz solar, luz ultravioleta y radiación gamma obteniéndose resultados diversos. En cuanto a las atmósferas modificadas, las mismas se

han usado en el control de *Aspergillus* y otros hongos de almacén y por ende la producción de aflatoxinas, esto se realiza aumentando la concentración de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> y generalmente se asocia con la disminución de las temperaturas en el silo (Zakhia-Rozis *et al.*, 2007; El-Bazza *et al.*, 2001).

### **Tratamientos químicos**

La nixtamalización del maíz, la que transforma hasta el 90% de las aflatoxinas en los metabolitos tóxicos B<sub>2a</sub> y G<sub>2a</sub>. El bisulfito destruye la aflatoxina B<sub>1</sub> y el ozono aparentemente degrada las aflatoxinas en cereales. Diversos procesos se citan entre ellos la alcalinización, el uso de amoníaco, peróxido de hidrógeno, ozono, peroxidasa, hipoclorito de sodio, metanol, aldehídos, peróxido de benzoilo, permanganato de potasio, etc., pero muchas de estas sustancias pueden tener efectos negativos en la salud humana o bien degradar la calidad alimentarias (Zakhia-Rozis *et al.*, 2007; Ellis *et al.*, 1991; Samarajeewa *et al.*, 1990).

### **Tratamientos biológicos**

Se ha investigado sobre la aplicación de cepas atoxigénicas de *A. flavus* y *A. parasiticus* que compiten con cepas tóxicas produciendo una reducción en la contaminación de aflatoxinas cercana a un 99% en cacahuete. También se han realizado aplicaciones en algodón en Texas en los EEUU con la cepa AF<sub>36</sub> contra *A. flavus*. La aplicación de ciertos microorganismos como *Flavobacterium aurantiacum* ha resultado efectiva en la eliminación de aflatoxina B<sub>1</sub> en aceites vegetales. También se han tenido experiencias con aplicación de mezclas de *Lactobacillus* y *Propionibacterium*, que

reducen la disponibilidad de aflatoxinas en la dieta, pero ciertas cepas de *Lactobacillus lactis* podrían dar lugar a la transformación de la aflatoxina B<sub>1</sub> a aflatoxicol, compuesto con las mismas propiedades carcinogénicas que la anterior. (Zakhia-Rozis *et al.*, 2007; Moreno, 2004).

### Legislación

Diferentes legislaciones tanto internacionales como nacionales tratan el problema de las aflatoxinas y establecen límites máximos de tolerancia en diferentes alimentos, además normatizan los muestreos y análisis. Entre estas ejemplifican el reglamento del Mercosur, la reglamentación de la FDA de los EEUU.

### NOM (Norma Oficial Mexicana)-187-SSAI/SCFI-2002

PRODUCTO	LIMITE MAXIMO
Harinas y cereales	20 µg / kg
Tortillas y harina de maíz nixtamalizado	12 µg / kg

### Límites permitidos por la FDA de los EEUU para aflatoxinas en alimentos

Artículo	Niveles comunes (mg/kg)	Niveles con episodios tóxicos (mg/kg)	Niveles permisibles de la FDA
Maní	2-6	30-125	20 ppb (µg/kg) en alimentos; 0,5 ppb aflatoxina M1 en leche
Mantequilla de maní	10	14-213	
Maní azucarado	20	30-230	
Maíz	>10	.	

**MERCOSUR/GMC/RES. N° 25/02****Reglamento técnico MERCOSUR sobre límites máximos de**

ALIMENTO	AFLATOXINA	LÍMITE
1. Leche		
1.1 Leche fluida	M1	0,5 µg/L
1.2. Leche en polvo	M1	5,0 µg/kg
2. Maíz		
2.1. Maíz en grano B1+B2+G1+G2 20 µg/kg (entero, partido, aplastado, mondado)	B1+B2+G1+G2	20 µg/kg
2.2. Harinas o sémolas de maíz		
3. Maní		
3.1. Maní B1+B2+G1+G2 20 µg/kg (sin descascarar, descascarado, crudo o tostado)	B1+B2+G1+G2	20 µg/kg
3.2. Maní en pasta (pasta de maní o manteca de maní)		

**Límites máximos admitidos por la UNION EUROPEA, reglamento (CE) NRO. 2174/03**

PRODUCTO	LÍMITE MÁXIMO
Cacahuates, frutos de cáscara y frutos secos para consumo humano	2 µg / kg
Cacahuates procesados	8 µg / kg
Cereales y derivados	2 µg / kg
Maíz procesado	5 µg / kg
Espicias	5 µg / kg

## LITERATURA CITADA

- Abarca, M. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología* 2000: 17 S79-S84.
- Acosta, S. 1994. Memoria: 1er Curso–Taller sobre aflatoxinas en maíz. Antecedentes históricos e Importancia de la contaminación con aflatoxinas. Tamaulipas, México. P 3-8.
- Anderson J.A.; Chung C.H.; Cho S.H. 1990. Versicolorin A hemiacetal, hydroxydihydrosterigmatocystin and aflatoxin G<sub>2</sub> a reductase activity in extracts from *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 111: 39-45.
- Baird, R.; Trigiano, R.N.; Windham, G.L.; Williams, W.P.; Kelly R.; Abbas H.K.; Moulton, J.K.; Scruggs M.L. 2006. Comparison of Toxigenic and Atoxigenic Isolates of *Aspergillus Flavus* Using DNA Amplification Fingerprinting Techniques *Mycopathologia* 161: 93-99.
- Basappa, S.C.; Jayarman, A.; Screenivasamurthy, V.; Parpia, H.A.B. 1967. Effects of B vitamins and ethyl alcohol on aflatoxina production by *Aspergillus orizae*. *Indian Journal of Experimental Biology* 5:262.

- Batista, P.P.; Santos, J.F.; Oliveira, N. T.; Pires, A.P.D.; Motta, C.M.S; Luna-Alves, E. A. 2008. Genetic characterization of Brazilian strains of *Aspergillus flavus* using DNA markers. *Genetic and Molecular Research* 7: 706-717.
- Bayman, P.; Cotty, P. 1993. Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Canadian Journal of Botany* 71: 23-31.
- Bhatnagar, D.; Ullah, A.H.J; Cleveland, T.E. 1988. Purification and characterization of a methyltransferase from *Aspergillus parasiticus* SRRC 163 involved in aflatoxin biosynthetic pathway. *Preparative Biochemistry* 18: 321-349.
- Bhatnagar D.; Cleveland, T.E.; Lillehoj, E.B.1989. Enzymes in aflatoxin B<sub>1</sub> biosynthesis strategies for identifying pertinent genes. *Mycopathologia* 107: 75-83.
- Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E. 1990. Purification and characterization of a reductase from *Aspergillus parasiticus* SRRC 2043 involved in aflatoxin biosynthesis. *FASEB J.* 4: A2164.
- Bhatnagar D.; Cleveland T.E. 1991. Aflatoxin biosynthesis: developments in chemistry, biochemistry and genetics. In: Shotwell O.L., Hurburgh C.R. Jr, (Eds.). *Aflatoxin in corn: New perspectives*. Ames, Iowa State University Press. p 391-405.
- Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E.; Kingston, D.G.I. 1991. Enzymological evidence for separate pathways for aflatoxin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> biosynthesis. *Biochemistry* 30: 4343- 4350.
- Bhatnagar, D.; Ehrlich, K.C.; Cleveland, T.E. 1992. Oxidation-reduction reactions in biosynthesis of secondary metabolites. In: Bhatnagar, D., Lillehoj, E.B., Arora, D.K. (Eds.) *Handbook of applied mycology: mycotoxins in ecological systems*. New York, Marcel Dekker. p 255-286.

- Bhatnagar, D.; Ehrlich, K.C.; Cleveland, T.E. 1993. Biochemical characterization of an aflatoxina B<sub>2</sub> producing mutant of *Aspergillus flavus*. FASEB J. 7: A1234.
- Bhatnagar, D.; Lax A.R.; Prima, B.; Cary, J.W.; Cleveland, T.E. 1996. Purification of a 43 Kda enzyme that catalyzes the reduction of norsolorinic acid to averantin in aflatoxin biosynthesis. FASEB. J. 10: A1522.
- Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E.; Brown, R.L.; Cary, J.W.; Yu, J.; Chang, P.K. 1998. Preharvest aflatoxin contamination: elimination through biotechnology. Ecological agriculture and sustainable development. En: Dhaliwal, G.S., Arora, R., Randhawa, N.S., Dhawan, A.R. (Eds.) Luhiana, Indian Ecological Society. p 100-129.
- Bhatnagar, D.; Yu, J.; Ehrlich, K.C. 2002. Toxins of filamentous fungi. en: Breitenbach. Cramer, M.; Lehrer, S. (Eds.) Fungal Allergy and Pathogenicity. Chemical Immunology. Basel Karger 81: 167-206.
- Batnagar, D.; Cary, J. W.; Ehrlich, K.; Yu, J.; Cleveland, T.E. 2006. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. Mycopathologia 162: 155–166.
- Bennet, J.W.; Lee, L.S. 1979. Mycotoxins: their biosynthesis in fungi aflatoxins and other bisfuranoids. Journal of Food Protection 42:805.
- Bennett, J.W.; Chang, P.K.; Bhatnagar, D. 1997. One gene to whole pathway: the role of norsolorinic acid in aflatoxin research Advances in Applied Microbiology 45: 1-15.
- Bradburn, N.; Coker, R. D.; Blunden, G. 1994. The aetiology of turkey X disease. Phytochemistry 35: 817.

- Brown D.W.; Adams, T.H.; Keller N.P. 1996. *Aspergillus* has distinct fatty acid synthases for primary and secondary metabolism. Proceedings of the Natural Academy of Sciences USA. 93: 14873-14877.
- Buchi, G.; Rae, I.D. 1969. The structure and chemistry of the aflatoxins, en Aflatoxins Goldblatt L.A., Ed., Academic Press, New York 55 p.
- Cabañes, F.; Abarca, L.; Bragulat, M.; Catellá, G. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Especies productoras de micotoxinas. Díaz de Santos. España. p 29-61. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.
- Cary, J.W.; Chang, P.K.; Bhatnagar, D. Clustered metabolic pathway genes in filamentous fungi. In: Khachatourans GG, Arora DK (Eds.). Applied mycology and biotechnology, agriculture and food production. Amsterdam, Elsevier Science BV, 2001; 1:165-198.
- Chang, P.K.; Yu, J.; Ehrlich, K.C. *et al.*, 2000. The aflatoxin biosynthesis gene *adhA* in *Aspergillus parasiticus* is involved in conversion of 5'-hydroxyaverantin to averufin. Applied Environmental Microbiology 66: 4715-4719.
- Chatterjee, M.; Townsend, C.A. 1996. Evidence for the probable final steps in aflatoxina biosynthesis. Journal of Organic Chemistry 59:4424-4429.
- Christensen, C. M. 1974. Storage of cereal grains and their products. American Association of Cereal Chemistry. St. Paul. 549 p.
- Chaturgoon, A.A.; Dutton, M.F.; Berry, R.K. 1990. The preparation of an enzyme associated with aflatoxin biosynthesis by affinity chromatography. Biochemical and Biophysical Research. Communications 166: 38-42.

- Cleveland, T.E.; Lax, A.R.; Lee, L.S.; Bhatnagar, D. 1987. Appearance of enzyme activities catalyzing conversion of sterigmatocystin to aflatoxin B<sub>1</sub> in late growthphase *Aspergillus parasiticus* cultures. *Applied Environmental Microbiology* 53: 1711-1713.
- Cleveland, T.E.; Bhatnagar, D.; Foell, C.J.; McCormick, S.P. 1987. Conversion of a new metabolite to aflatoxin B<sub>2</sub> by *Aspergillus parasiticus*. *Applied Environmental Microbiology* 53: 2804-2807.
- Cotty, P. J. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79: 808-814.
- Cotty, P. J.; Bayman, P.; Egel, D. S.; Elias, K. S. 1994. Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*, in Powell, K. A. (Eds), *The Genus Aspergillus*, Plenum Press, New York, pp 1–27.
- Criseo, G.; Bagnara, A.; Bisignano, G. 2000. Differentiation of Aflatoxin-producing and non-producing strains of *Aspergillus flavus* group, *Letters in Applied Microbiology* 33: 291-295.
- Cruz, A.; Moreno, J.; Sánchez, G.; Moreno, E.; Pérez, M. 2008. Efecto de los agentes esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) sobre el desarrollo de *Aspergillus flavus* y producción de aflatoxinas en maíz. *Memorias del X Congreso Internacional / XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*, A.C. Monterrey, México. L-53.
- Davis, N.D.; Diener, U.L. 1968. Growth and aflatoxina production by *Aspergillus parasiticus* from varios carbon source. *Applied Microbiology* 16:158.
- De La Garza, J. 1994. Memoria: 1er Curso – Taller sobre aflatoxinas en maíz. *Biología y Ecología de Aspergillus flavus*. Tamaulipas, México. P 9-14.

- Detroy, R.W.; Lillehoj, E.B.; Ciegler, A. 1971. Aflatoxins and related compounds Microbial Toxins. Vol 6. Ciegler, A., Kadis, S., Ajl, S. J. Eds. Academic Press, New York, 39 p.
- Diario Oficial de la Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 2174/2003 DE LA COMISIÓN de 12 de diciembre de 2003 que modifica el Reglamento (CE) no 466/2001 por lo que respecta a las aflatoxinas. L 326/12.
- Díaz, A. 1994. Memoria: 1er Curso – Taller sobre aflatoxinas en maíz. Biosíntesis de aflatoxinas. Tamaulipas, México. P 15-18.
- Diaz, T.; Mellado, E.; Cuenca, M.; Gaztelurrutia, L.; Villate, J. I.; Rodríguez, J. 2000. Genetic Similarity among One *Aspergillus flavus* Strain Isolated from a Patient Who Underwent Heart Surgery and Two Environmental Strains Obtained from the Operating Room . Journal of Clinical Microbiology 38: 2419-2422.
- Diener, U.; Cole, R.; Sanders, T.; Payne, G.; Lee, L.; Klich, M. 1987. Epidemiology of aflatoxina formation by *Aspergillus flavus*. Annual Review of Phytopathology 25:249-70.
- Dixon, R.C.; Hamilton, P.B. 1981. Effects of feed ingredients on the antifungal activity of propionate. Poultry Sciences 60:2407.
- Dunlap, J. 1994. Memoria: 1er Curso – Taller sobre aflatoxinas en maíz. Fisiología del maíz y efecto del clima sobre la presencia de aflatoxinas. Tamaulipas, México. P 19-32.
- Dutton, M.F. 1988. Enzymes and aflatoxin biosynthesis. Microbiological Review 52: 274-295.
- Egel DS, Cotty PJ, Elias KS 1994. Relationships among isolates of *Aspergillus* sect. Flavi that vary in aflatoxin production. Phytopatology 84: 906-912.

- Eaton, D.L.; Gallagher, E.P. 1994. Mechanisms of aflatoxins carcinogenesis. *Ann. Rev. Pharmacological Toxicology* 34 : 135- 170.
- ECOSCF. European Commission of Scientific Committee of Food. 1996. Opinion of Aflatoxins Ochratoxin A and Patulin expressed on 23 september 1994. Report of Scientific Committee of Food -35 Series.
- Ehrlich, K., Cotty, P.J. 2003. New insights into pH regulation of aflatoxin production by *Aspergillus* species. XXII Fungal Genetics Conference Proceedings. Abstract No. 201. p. 283.
- El-Bazza, E.M.; Farrag, A.; El-Fouly, E.; El-Tablawy, Y. 2001. Inhibitory effect of gamma radiation and *Nigellia sativa* seeds oil on growth, spore germination and toxin production of fungi. *Radiation Physical and Chemistry* 60:181-189.
- Ellis, W.O.; Smith, J.P.; Oldham, J.H. 1991. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organism, detection and methods of control. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 30:403-439.
- EMBRAPA. 2006. Analysis of Aflatoxin Producing Moulds by *Aspergillus flavus* and *Parasiticus* Agar (AFPA). Training course 25 27 October 2006, EMBRAPA Acre, Rio Branco, Brazil. 31 p.
- Filtenborg, O.; Frisvad, J. C. 1980. A simple screening method for toxigenic molds in pure cultures. *Lebensmittel - Wissenschaft + Technologie* p 128- 130.
- Filtenborg, O.; Frisvad, J. C.; Svendsen, J. A. 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 581-585.

- Fokunang, C.N.; Tembe, E.A.; Tomkins, P.; Barkwan, S. 2006. Global impact of mycotoxins on human and animal health management. *Agriculture* 35: 247–253.
- Fuchs, R.; Radie, B.; Ceovic, S.; Sostaric, B.; Hult, K. 1991. Human exposure to ochratoxin A, en Castegnaro, M., Plestina, R., and Bartsch, H., (Eds.). *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, IARC Scientific Publications No 115, International Agency for Research on Cancer, Lyon p 131–134.
- Galtier, P. 1999. Biotransformation and fate of micotoxinas. *Journal of Toxicology Review* 295-312.
- Gallardo, E.; Ibarra, G.; Sanchez, R.; Cuamea, G.; Molina, D.; Parra, N.; Rosas, E.; Cortez, M. 2006. Micobiota de maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de fumonisina B<sub>1</sub> por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) NIRENB. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 27-34.
- Gendy, S. M.; Marth E. H. 1989. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in the presence of *Lactobacillus casei*. *Journal of Food Protection* 44: 211–221.
- Geiser, D.; Pitt, J.; Taylor, J. Cryptic 1998. speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences, USA* 95: 388–393.
- Goldblatt, L.A. 1972. Implications of mycotoxins. *Clinical Toxicology* 5: 453.
- Gómez, M. 2007. Descripción del Maíz marzo\_2007. SIACON SIAP. 20 p.
- González, H.H.L.; Resnik, S.L.; Vaamonde, G. 1987. Influence of inoculum size on growth rate and lag phase of fungi isolated from Argentina com. *Int. Journal of Food Microbiology* 4:111-117.

- Gorelich, N.J. 1990. Risk assessment for aflatoxins: I Metabolism of aflatoxins B<sub>1</sub> by different species. *Risk Analysis* 539-559.
- Guo, B.Z.; Russin, J.S.; Brown, R.L.; Cleveland, T.E.; Widstrom, N.W. 1996. Resistance to aflatoxin contamination in corn as influenced by relative humidity and kernel germination. *Journal of Food Protection*, 59: 276-2811.
- Guzmán, D. 2006. Las aflatoxinas en maíz: desde la contaminación en campo hasta la legislación en México. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 48:126-130.
- Guzman, D.; Trudel, L.; Wogan, G.N. 1995. Corn nixtamalización and the fate of radiolabelled aflatoxin B<sub>1</sub> in the tortilla making process. *Bulgarian Environmental Contamination and Toxicology* 55:858-864.
- Harris, L. J.; Desjardins, A. E.; Plattner, R. D.; Nicholson, P.; Butler, G.; Young, J. C.; Weston, G.; Proctor, H. R.; Hohn, M. T. 1999. Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease* 56: 954–961.
- Hayes, A.W. 1980. Mycotoxins, a review of biological effects and their role in human diseases. *Clinical Toxicology*. 45-83.
- Hendrickse, R.G. 1997. Of sick turkeys, kwashiorkor, malaria, perinatal mortality, heroin addicts and food poisoning: Research on the influence of aflatoxins on child health in the tropics. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 91: 787–793
- Hernández, S.; Reyes, M.; García, J.; Mayek, N.; Reyes, C. 2007. Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25:127-133.

Horn, B.W.; Greene, R.L. 1995. Vegetative compatibility within population of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamarii* from a peanut field. *Mycologia* 87: 324-332.

Hsieh D.P.; Wan, C.C.; Billington, J.A. A. 1989. Versiconal hemiacetal acetate converting enzyme in aflatoxin biosynthesis. *Mycopathologia* 107: 121-126.

[http://www.inifap.gob.mx/quienes\\_somos/noticias\\_html/nota\\_dia\\_agricultor2008.htm](http://www.inifap.gob.mx/quienes_somos/noticias_html/nota_dia_agricultor2008.htm)

[http://intranet.inifap.gob.mx/boletin\\_inifap/boletin\\_inifap03.pdf](http://intranet.inifap.gob.mx/boletin_inifap/boletin_inifap03.pdf)

<http://www.mycobank.org/MycoTaxo.aspx?Link=T&Rec=209842>

Hussein, H. S.; Brasel, J. M. 2001, Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167: 101–134.

IARC. 2002. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56, IARC. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. Lyon, France. Vol 82.

IARC .1993. Toxins derived from *Fusarium moniliforme*. Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> and Fusarin C', IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol. 56, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp 445–446.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). 2006. Disponible en [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)

Ito, Y.; Peterson, W.; Wicklow, D.; Goto, T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. *Mycological Research* 105: 233-239.

- James, M.; Brent, A.; Lasker, M.; McNeil, M.; Shelton, M.; Warnock, D.; Reiss, E. 2000. Use of a Repetitive DNA Probe To Type Clinical and Environmental Isolates of *Aspergillus flavus* from a Cluster of Cutaneous Infections in a Neonatal Intensive Care Unit. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 3612-3618.
- Juan, C.; Soriano, J.M.; Burdaspal, P. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Aflatoxinas del grupo B y G. Díaz de Santos. España. p 91-117. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.
- Kami, M.; Fukui, T.; Ogawa, S.; Kazuyama, Y.; Machida, U.; Tanaka, Y.; Kanda, Y.; Kashima, T.; Yamazaki, Y.; Hamaki, T.; Mori, S.; Akiyama, H.; Mutou, H.; Sakamaki, H.; Osumi, K.; Kimura, S.; Hirai, H. 2001. Use of Real-Time PCR on Blood Samples for Diagnosis of Invasive Aspergillosis 1504 • *CID* 33: 1504-1512.
- Karunaratne, A.; Bullerman, L.B. 1990. Interactive effects of spore load and temperature on aflatoxin production. *Journal of Food Protection* 53: 227–229.
- Keller N.P.; Dischinger, J.H.C.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E.; Ullah, A.H.J. 1993. Purification of a 40-kilodalton methyltransferase active in the aflatoxin biosynthetic pathway. *Applied Environmental Microbiology* 59: 479-484.
- Klich, M. A.; Pitt, J. I. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society* 91: 99-108.
- Krishnamachari, K. A. V.; Bhat, R. V.; Nagarajan, V. ; Tilak, T. B. G. 1975. Hepatitis due to aflatoxicosis, an outlook in western India. *Lancet* 1: 1061–1063.
- Kurtzman, C.; Horn, B.; Hesseltine, C. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxina producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53:147-158.

- Kusumoto, K.; Hsieh, D.P. 1996. Purification and characterization of the esterases involved in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. Canadian Journal of Microbiology 8: 804-810.
- Landers, K.E.; Davies, N.D.; Diener, U.L. 1967. Influence of atmospheric gases on aflatoxina production by *Aspergillus flavus* in peanuts Phytopathology 57: 1086-1967.
- Lee, E.G.H.; Townsley, P.M.; Walden, C.C. 1966. Effects of divalent metals on the production of aflatoxins in submerged cultures. Journal of Food Science 31:432
- Lillehoj, E.B. 1983. Epidemiology of aflatoxin formation by *A. flavus*: Effect of environmental and cultural factors on aflatoxin contamination of developing corn kernels. p. 27–34. In U.L. Diener et al. (Eds.) Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. South. Coop. Ser. Bull. 279. Alabama Agric. Exp. Stn., Auburn.
- Lin, B.K; Anderson, J.A. 1992. Purification and properties of versiconal cyclase from *Aspergillus parasiticus*. Archives of Biochemistry and Biophysics 293: 67-70.
- López R.; Park, D. Department of Food Science. Documento sobre la III Conferencia Internacional FAO/OMS/PMASOBRE MICOTOXINAS, Túnez, Túnez, 3-6 de marzo de 1999 Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana 70803; y Timothy D. Phillips, Intercollegiate Faculty of Toxicology (Department of Veterinary Anatomy and Public Health), College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, Texas 77843. 16 pag.
- Lourenço, A.; Durigon, E.L; Zanotto, P.; Gazzinelli, J.E.; Palma, A.; Correa, B. 2007. Genetic diversity of environmental *Aspergillus flavus* strains in the state of São Paulo, Brazil by random amplified polymorphic DNA. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 102: 687-692.

- Mahanti, N.; Bhatnagar, D.; Cary, J.W.; Joubbran, J.; Linz, J.E. 1996. Structure and function of *fas-1A*, a gene encoding a putative fatty acid synthetase directly involved in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Applied Environmental Microbiology* 62:191-195.
- Mann, G.E.; Codifer, L.P.; Gradner, H.K.; Koltum, S.P.; Dollear, F.G. 1970. Chemical inactivation of aflatoxins in peanut and cotton seeds meals. *Journal of the American Oil Chemist Society* 47:173-176.
- Mateles, R.I.; Adye, J.C. 1965. Production of aflatoxins in submerged culture. *Applied Microbiology* 2: 208-211.
- Matsushima, K.; Ando, Y.; Hamasaki, T.; Yabe, K. 1994. Purification and characterization of two versiconal hemiacetal acetate reductases involved in aflatoxin biosynthesis. *Applied Environmental Microbiology* 60: 2561-2567.
- Mayer, Z; Bagnara, A.; Färber, P.; Geisen, R. 2003. Quantification of the copy number of *nor-1*, a gene of the aflatoxin biosynthetic pathway by real-time PCR, and its correlation to the cfu of *Aspergillus flavus* in foods. *International Journal of Food Microbiology* 82: 143-151.
- Mazzani, C.; Luzón, O.; Chavarry, M. 2004. *Aspergillus flavus* asociado a *Epitragus* sp. (Coleoptera: Tenebrionidae) en maíz bajo riego en Turén, estado Portuguesa, Venezuela. *Entomotropica* 19: 157-159.
- Mazzani, C.; Borges, O.; Luzón, O.; Barrientos, V.; Quijada, P. 2000. *Fusarium moniliforme*, fumonisinas y *Aspergillus flavus* en granos de híbridos de maíz en el Estado Guárico, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*. 17: 185-195.

- McClenny, N. 2005. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. *Medical Mycology* 43: S125-S128.
- McGuire, S.M.; Silva, J.C.; Casillas, E.G.; Townsend, C.A. 1996. Purification and characterization of versicolorin B synthase from *Aspergillus parasiticus*. Catalysis of the tereodifferentiating cyclization in aflatoxin biosynthesis essential to DNA interaction. *Biochemistry* 35: 11470-11486.
- McGuire, S.M.; Brobst, S.W.; Graybill, T.L.; Pal, K.; Townsend, C.A. 1989. Partitioning of tetrahydro- and dihydrobisfuran formation in aflatoxin biosynthesis defined by cellfree and direct incorporation experiments. *Journal of American Chemical Society* 111:8308-8309.
- McGuire, S.M.; Townsend, C.A. 1993. Demonstration of a Baeyer-Villiger oxidation and the time course of cyclization in bisfuran ring formation during aflatoxin B<sub>1</sub> biosynthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 3: 653-656.
- McMillan, W.; Windtrom, N.; Wilson, D.; Evans, B. 1990. Annual contamination of *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) moths with *Aspergillus flavus* and incidence of aflatoxin contamination in preharvest corn in Georgia coastal plain. *Journal of Entomological Sciences*. 25:123-124.
- Medina, F.; Irey, J.; Roque, M. 2002. Determinación de aflatoxinas en algunos productos naturales utilizando el medio agar coco y Elisa ligada. *Ciencia e Investigación* 2: 46-54.
- Minto, R.E.; Townsend, C.A. 1997. Enzymology and molecular biology of aflatoxina biosynthesis. *Chemical Review* 97: 2537-2555.

- Montiel, D.; Dickinson, M.J.; Lee, H.A.; Dyer, P.S.; Jeenes, D.J.; Roberts, I.N.; James, S.; Fuller, L.J.; Matsuchima, K.; Archer, D.B. 2003. Genetic differentiation of the *Aspergillus* section *Flavi* complex using AFLP fingerprints. *Mycological Research* 107: 1427-1434.
- Moody, F.; Tyler, B.M. 1990. Use of nuclear DNA restriction fragment length polymorphisms to analyze the diversity of the *Aspergillus flavus* group: *A. flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*. *S. Applied Environmental Microbiology* 1990 56: 2453-2461.
- Moody, F.; Tyler, B.M. 1990. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of the *Aspergillus flavus* group: *A. flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*. *Applied Environmental Microbiology* 56: 2441-2452.
- Moreno, J. 2004. Estudio comparativo de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en la producción de aflatoxinas bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura. TESIS. UNAM. Facultad de Estudios Superiores de Pstgrado. Cuautitlán Izcali, Edo. de México.
- Moreno, E.; Gil, M. 1991. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. UNAM. México, Df. 42 p.
- Moreno, E. 1988. Manual para la identificación de hongos de granos y sus derivados. UNAM. México, DF. 109 p.
- Moss, M. 2002. 2002. Risk assessment for aflatoxinas in foodstuffs *International Biodeterioration and Biodegradation* 137-142.
- Moss, M. 1991. The environmental factors controlling mycotoxins formation. *Mycotoxins and animal foods*. CRC Press. EEUU, pags 37-56.

- Murray, P.R.; Pfaller, M.A.; Rosenthal, K.S. 2006. Microbiología médica. 5ta ed. Elsevier. 974 p.
- Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html>.
- O'Brien, M.; Fakhoury, A. M.; Payne, G. A. 2003. Identification of genes differentially expressed during aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* Fungal Genetics and Biology 39: 118-127.
- Ortiz, A. 1992. Manual de procedimientos para el análisis de aflatoxinas. Almacenes Nacionales de Depósito. Centro Nacional de Investigación, Certificación y Capacitación. 223p.
- Pascual, M.R. 2005. Enfermedades de origen alimentario: Su prevención. Publicado por Ediciones Díaz de Santos. 177p.
- Payne, G.A.; Brown, M.P. 1998. Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. Annual Review of Phytopathology 36: 329- 362.
- Peraica, M.; Radic, B.; Lucic, A.; Pavlovic, M. 1999. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. Bugarian. WHO. 754-766.
- Peterson, S.; Ito, Y.; Horn, B.; Goto, T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. Mycologia 93: 689-703.
- Pildain, M.; Cabral, D.; Vaamonde, G. 2005. Poblaciones de *Aspergillus flavus* en maní cultivado en diferentes zonas agroecológicas de la Argentina, caracterización morfológica y toxigénica. RIA 34: 3-19.

- Pitt, J. L.; Miscamble, B. F. 1995. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Journal of Food Protection* 58: 86–90.
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 1997. *Fungi and food spoilage*. Academic Press, Sydney, Australia: 593p.
- Pitt, J.I.; Samson R.A.; Frisvad, J.C.. 2000. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification (R.A. Samson and J.I. Pitt, Eds.), Hardwood Academic Publishers, Reading, UK, 9- 50.
- Pitt, J.I.; Samson, R. A.2000. Integration of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification (R.A. Samson and J.I. Pitt, Eds.), Hardwood Academic Publishers, Reading, UK, 51-72.
- Praveen, R.J.; Subramanyam, C. 1999. Requirement of Ca<sup>+</sup> for aflatoxina production, inhibitory effect of Ca<sup>2+</sup> channel blockers on aflatoxina production by *Aspergillus parasiticus* NRRL2999. *Letters in Applied Microbiology* 28:85-88.
- Prieto, R.; Woloshuk, C.P. 1997. *ord1*, an oxidoreductase gene responsible for conversion of O-methylsterigmatocystin to aflatoxin in *Aspergillus flavus*. *Applied Environmental Microbiology* 63: 1661-1666.
- Raper, K.B.; Fennell, D.I. 1965. *The Genus Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins Company. 686 p.
- Rashid, M.; Khalil, S.; Ayub, N.; Ahmed, W.; Ghaffar, A. 2008. Categorization of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* isolates of stored wheat grains in to aflatoxinogenics and non -aflatoxinogenics. *Pakistani Journal of Botany* 40: 2177-2192.

REGLAMENTO TÉCNICO MERCOSUR sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz .MERCOSUR/GMC/RES. Nº 25/02 7p.

Riley, R.T.; Pestka, J. 2005. Micotoxins: metabolism, mechanism, and biochemical markers. En: The micotoxinas blue book. Ed. Duarte Díaz. Nottingham University Press. Inglaterra. 279-294.

Rodrigues, P.; Soares, C.; Kozakiewicz, Z.; Paterson, R.; Lima, N.; VENÂNCIO, A. 2007. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Mendez-Vilas (Eds.) p 527-534.

Rodrigues, P.; Venâncio, A.; Kozakiewicz, Z.; Lima, N. 2009. A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology* 129: 187–193.

Rustom, I.Y.S. 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry* 59:57-67.

Ruiz, M.; Font, G. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Toxicidad y Evaluación de Riesgos. Díaz de Santos. España. P 15-27. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.

Saito, M.; Tsuruta, O.; Siriacha, P.; Kawasugi, S.; Manabe, M.; Buangsuwon, D. 1986. Distribution and aflatoxin productivity of the atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated from soils in Thailand. *Proceedings of the Japan Association of Mycotoxicology* 24: 41-46.

Samarajeewa, U.; Sen, A.C.; Cohen, M.D.; Wei, C.I. 1990. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *Journal of Food Protection* 53:489-501.

- Samson, R.; Pitt, J. 2000. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. CRC PRESS. 510 p.
- Sanchis, V.; Marin, S.; Ramos, A. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Factores determinantes en la producción de micotoxinas. Díaz de Santos. España. P 63-89. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.
- Sargent, K.; Sheridan, A.; Kelly, J.; Carnaghan, R. 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature 192:1096-1097.
- SCO. Scientific Comitee of Food. 1996. Opinion of Aflatoxins Ochratoxin A and Patulin expressed on 23 september 1994. Report of Scientific Comitee of Food -36 Series. European Commision, DG Industry.
- Sharma R.P. 2004. Mycotoxins in the food chain: a look at their impact on immunological responses. Proc. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. 20<sup>vo</sup> Annual Symposium Alltech. pp.306-314.
- Sepulveda, C.; Piontelli, E. 2005. Poblaciones DE *Aspergillus* en semillas de maiz y soja de importacion argentina: enfasis en la seccion flavi. Boletín Micológico Vol. 20 : 41 - 55 2005.
- Shotwell, O.L.; Hesseltine, C.W.; Stubblefield, R.D.; Sorenson, W.C. 1966. Production of aflatoxina on rice. Applied Microbiology 14:425-428.
- Silva, J.C.; Minto, R.E.; Barry, C.E.; Holland, K.A.; Townsend, C.A. 1996. Isolation and characterization of the versicolorin B synthase gene from *Aspergillus parasiticus*: expansion of the aflatoxin B<sub>1</sub> biosynthetic cluster. Journal of Biological Chemistry 271: 13600-13608.

- Silva, J.C.; Townsend, C.A. 1996. Heterologous expression, isolation, and characterization of versicolorin B synthase from *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Biological Chemistry* 272: 804-813.
- Sodeinde, O.; Chan, M.C.K.; Maxwell, S.M.; Familusi, J.B.; Hendrickse, R.G. 1995. Neonatal jaundice, aflatoxins and naphthols: Report of a study in Ibadan, Nigeria. *Annual Trop. Pediatric* 15: 107–113.
- Somashekar, D.; Rati, E.R.; Chandrashekar, A. 2004. PCR-restriction fragment length analysis of *aflR* gene for differentiation and detection of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in maize. *International Journal of Food Microbiology* 93: 101-107.
- Soriano, J.M. 2007. Micotoxinas en alimentos. Díaz de Santos. España. 396p.
- Soriano, J.M.; Moltó, J.; Mañes, J. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Análisis de micotoxinas en alimentos. Díaz de Santos. España. P 91-117. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.
- Sweeney, M.J.; Dobson, A.D.W. 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 43:141-158
- Tabak, H.H.; Cooke, W.B. 1968. The effect of gaseous environment on the growth and metabolism of fungi. *Botanical Review* 34:124.
- Takayuki, S.; Bjeldanes, L.F. 1993. Introduction to Food Toxicology. Academic Press Inc, San Diego, CA.
- Trail, F.; Mahanti, N.; Linz, J. 1995. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microbiology* 141: 755-765.

- Tran-Dinh, N.; Pitt, J.I.; Carter, D.A. 1999 . Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *Mycological Research* 103:1485-1490.
- Townsend, C.A. 1997. Progress towards a biosynthetic rationale of the aflatoxina pathway. *Pure and Applied. Chemistry* 58: 227-238.
- United States Department of Agriculture. 2005. Managing Aflatoxins in Arizona. Arizona Cotton research and protection council. Agriculture research service. 11p.
- Vaamonde, G.; Degrossi, C.; Comerio, R.; Fernández Pinto, V. 1995. *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* en maní cultivado en la provincia de Córdoba (Argentina): Características diferenciales y capacidad aflatoxicogénica. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 30:191-198.
- Vaamonde, G.; Patriarca, A.; Fernández Pinto, V.; Comerio, R.; Degrossi, C. 2003. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 2738: 1-6.
- Vedder, J.C.; Nakashima, T.T. 1980. Biosynthesis of averufin by *Aspergillus parasiticus* detection of 180-label by <sup>13</sup>C NMR isotope shifts. *Journal of Chemical Society, Chemical Communications* 4: 183-185.
- Warham, E. J.; Buttler, L.D.; Sutton, B.C.. 1996. Ensayos para la Semilla de Maíz y de Trigo. *Manual de Laboratorio. CIMMYT. El Batán, México.* 83 p.
- Watanabe C.M.H.; Wilson, D.; Linz, J.E.; Townsend CA. 1996. Demonstration of the catalytic roles and evidence for the physical association of type I fatty acid synthases and a polyketide synthase in the biosynthesis of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Chemistry & Biology* 3: 463-469.

- Wicklow, D.T. 1991. Epidemiology of *Aspergillus flavus* in corn. En: O.L. Shotwell and C.R. Hurburg, eds. Aflatoxin in corn: new perspectives. Ames, Iowa: Iowa Agricultural and Home Experiment Station. Iowa State Univ. Research Bull 599. p. 315-328.
- Wicklow, D.T.; Mcalpin, E.C.; Platis, E. 1998. Characterization of the *Aspergillus flavus* population within an Illinois maize field Mycotoxin Research, USDA, Agricultural Research Service, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, U.S.A. Mycological Research 102: 263–268.
- Widstrom, N.W. 1996. The aflatoxin problem with corn grain. Advances in Agronomy 56: 219-280.
- Yabe, K.; Ando, Y.; Hamasaki, T. 1988. Biosynthetic relationship among aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub>. Applied Environmental Microbiology 54: 2101-2106.
- Yabe, K.; Nakamura, H.; Ando, Y.; Terakado, N.; Nakajima, H.; Hamasaki, T. 1988. Isolation and characterization of *Aspergillus parasiticus* mutants with impaired aflatoxina production by a novel tip culture method. Applied Environmental Microbiology 54: 2096-2100.
- Yabe, K.; Ando, Y.; Hashimoto, J.; Hamasaki, T. 1989. Two distinct *O*-methyltransferases in aflatoxin biosynthesis. Applied Environmental Microbiology 55: 2172-2177.
- Yabe, K.; Ando, Y.; Hamasaki, T. 1991. Desaturase activity in the branching step between aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> and aflatoxins B<sub>2</sub> and G<sub>2</sub>. Agricultural Biology and Chemistry 55:1907-1911.
- Yabe, K.; Ando, Y.; Hamasaki, T. 1991. A metabolic grid among versiconal hemiacetal acetate, versiconol acetate, versiconol and versiconal during aflatoxin biosynthesis. Journal of Genetic Microbiology 137: 2469-2475.

- Yabe, K.; Matsuyama, Y.; Ando, Y.; Nakajima, H.; Hamasaki, T. 1993. Stereochemistry during aflatoxin biosynthesis: conversion of norsolorinic acid to averufin. *Applied Environmental Microbiology* 59: 2486-2492.
- Yabe, K.; Hamasaki, T. 1993. Stereochemistry during aflatoxin biosynthesis: cyclase reaction in the conversion of versiconal to versicolorin B and racemization of versiconal hemiacetal acetate. *Applied Environmental Microbiology* 59: 2493-2500.
- Yabe, K.; Nakamura, M.; Hamasaki, T. 1999. Enzymatic formation of G-group aflatoxins and biosynthetic relationship between G- and B-group aflatoxins. *Applied Environmental Microbiology* 65: 3867-3872.
- Yu, J.; Bhatnagar, D.; Ehrlich, K. 2002. Aflatoxin biosynthesis. *Revista Iberoamericana de Micología* 19: 191-200.
- Yu, J.; Woloshuk, C.P.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T.E. 2000. Cloning and characterization of *avfA* and *omtB* genes involved in aflatoxin biosynthesis in three *Aspergillus* species. *Gene* 248: 157-167.
- Yu, J.; Chang, P.K.; Cary, J.W., *et al.* 1998. Characterization of the critical amino acids of an *Aspergillus parasiticus* cytochrome P450 monooxygenase encoded by *orda* involved in aflatoxin B1, G1, B2, and G2 biosynthesis. *Applied Environmental Microbiology* 64: 4834-4841.
- Yu, J. 2003. Genetics and biochemistry of mycotoxin synthesis. In: Arora DK (Ed.). *Handbook of fungal biotechnology* (2<sup>nd</sup> Edition). New York, Marcel Dekker.
- Yuan, G.F.; Liu, C.S.; Chen, C.C. 1995. Differentiation of *Aspergillus parasiticus* from *Aspergillus sojae* by random amplification of polymorphic DNA. *Applied Environmental Microbiology* 61: 2384-2387.

Zakhia-Rozis, N.; Catalá, A.; Soriano, J. M. 2007. Micotoxinas en alimentos. Trazabilidad y descontaminación / detoxificación de las micotoxinas. Díaz de Santos. España. P 119 al 132. Coord. José Miguel Soriano del Castillo

## **Incidencia de hongos potencialmente toxigénicos en maíz (*Zea mays*) en México**

**Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga; Martha Yolanda Quezada Viay; Alberto Flores Olivas**, Dpto. de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Carretera a Zacatecas, Buenavista, Saltillo, Coah. C.P. 25315. Tel. (844)11-02-26. Correspondencia: [aflooli@uaaan.mx](mailto:aflooli@uaaan.mx)

### **RESUMEN**

El cultivo del maíz es de importancia fundamental en México, no solo desde el punto de vista económico, sino también industrial, político y social. Debido a condiciones adversas durante su cultivo, puede ser susceptible al ataque de hongos productores de micotoxinas como *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Para determinar la incidencia de estos, en diferentes zonas ecológicas de México, se analizaron muestras compuestas de maíz de 14 estados. En los granos se detectó la presencia de  $62 \pm 2.68$  (11.72%) cepas de *Aspergillus flavus*,  $3 \pm 0.58$  (0.57%) de *Aspergillus parasiticus*,  $405 \pm 34.16$  (76.99%) de *Fusarium*,  $51 \pm 3.97$  (9.69%) y de *Penicillium*,  $3 \pm 0.58$  (0.53%).

**Palabras clave:** micotoxinas, hongos toxigénicos, maíz, México.

### **ABSTRACT**

The maize is a very important crop in Mexico, not only from an economic standpoint, because also has industrial, political and social importance. Due to adverse conditions during the crop may be more susceptible to attack by fungi producing mycotoxins, such as *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*. To determine these incidence in different ecological zones of Mexico, is made up of maize samples for 14 states of the republic. In the kernels was detected the presence of  $62 \pm 2.68$  (11.72%) strains of *Aspergillus flavus*,  $3 \pm 0.58$  (0.57%) from *Aspergillus parasiticus*,  $405 \pm 34.16$  (76.99%) of *Fusarium*,  $51 \pm 3.97$  (9.69%) and *Penicillium*,  $3 \pm 0.58$  (0.53%).

**Key words:** micotoxinas, toxigenic fungus, aflatoxins, México.

## Introducción

Durante el año 2007, en el mundo se produjeron más de 790 mil de toneladas de maíz. En México, el maíz representa el 65 % de la producción nacional de cereales. Según estimaciones de la FAO, el consumo per cápita diario es de 343 gramos. Este cultivo, se ve afectado a nivel de campo y en almacenamiento por hongos productores de micotoxinas como *Aspergillus*, *Fusarium*, y *Penicillium*. Las micotoxinas son metabolitos secundarios capaces de causar en el ser humano y los animales síndromes llamados micotoxicosis. Son moléculas pequeñas, de menos de 700 KDa, cuya síntesis está relacionada a la fase estacionaria, siendo a menudo relacionado con la diferenciación y la esporulación (Soriano, 2007; Moss, 1991; Goldblat, 1972). Los *Aspergillus* producen aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y ácido ciclopiazónico; los *Fusarium*, fumonisina B<sub>1</sub>, nivalenol, deoxinivalenol, zearelanona, toxina T-2; *Penicillium* ocratoxina A y patulina. Todas estas sustancias, afectan la salud humana y animal. Diversos órganos son afectados, entre ellos el hígado y el riñón, además el sistema respiratorio e inmunológico. Pueden causar mutaciones, abortos y cáncer (Murray *et al.*, 2006; Miller, 1994). A nivel mundial, se ha reportado contaminación de alimentos por hongos micotoxigénicos. Una de las más famosas en Inglaterra, en el año 1969, por aflatoxinas de *A. flavus*, que ocasionó la muerte de más de 100.000 pavitos (Sargent *et al.*, 1961). En el año 1976, presentó en la India, una epidemia de hepatitis y murieron más de 100 personas por consumo de maíz con elevado nivel de aflatoxinas (Soriano, 2007). En México, se ha reportado principalmente contaminación de alimentos por aflatoxinas, en Tamaulipas, en 1989 más de 100µg/kg (López *et al.*, 1995); en el 2006, Gallardo *et al.*, realizaron un estudio sobre la microbiota de maíz recién cosechado y

producción de fumonisinas B<sub>1</sub> por *Fusarium verticilloides*, en Sonora y encontraron principalmente los hongos *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, y *Fusarium sp.*, siendo este el patógeno con mayor incidencia, además, una producción mínima 500 µ/g de fumonisinas de las cepas aisladas. En el 2007, Hernández *et al.*, estudiaron la incidencia de hongos potencialmente toxigénicos en el norte de Tamaulipas, en maíz a campo y almacenado encontrando 76.9% de *Fusarium* a nivel de campo, y un 50.3% de *Aspergillus* a nivel de almacenamiento. Cabe destacar que los estudios sobre contaminación por micotoxinas en México se han centrado solamente en algunos estados donde se han presentado contaminaciones ocasionales por estos hongos a nivel de campo, almacenamiento o alimentos procesados (García *et al.*, 2003; Espinoza *et al.*, 2003; Robisonson *et al.*, 2003).

Debido a la importancia que representa la contaminación por estos hongos, el presente trabajo se realizó con el objetivo de incrementar el conocimiento sobre la presencia de los mismos en maíz colectado de 14 estados de la república mexicana.

### **Materiales y métodos**

Se estudiaron muestras compuestas de maíz blanco y maíz amarillo colectadas al azar, de campos de los estados de: Sonora, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas, Jalisco, Nayarit, Michoacán, Hidalgo, Guanajuato, Veracruz, Chiapas, Quintana Roo y Oaxaca. Los granos no dañados fueron seleccionados y procesados. Las semillas seleccionadas fueron desinfestadas con cloro al 2%, durante un minuto y enjuagadas tres veces en agua destilada esterilizada y secadas con papel estéril. Se

sembraron cien semillas de cada estado, en malta sal agar (MSA) al 6% de NaCl, en placas de Petri de 9 cm de diámetro, 10 semillas por placa y se incubaron a 25°C ±2 por 7 días. Se evaluó la micobiota.

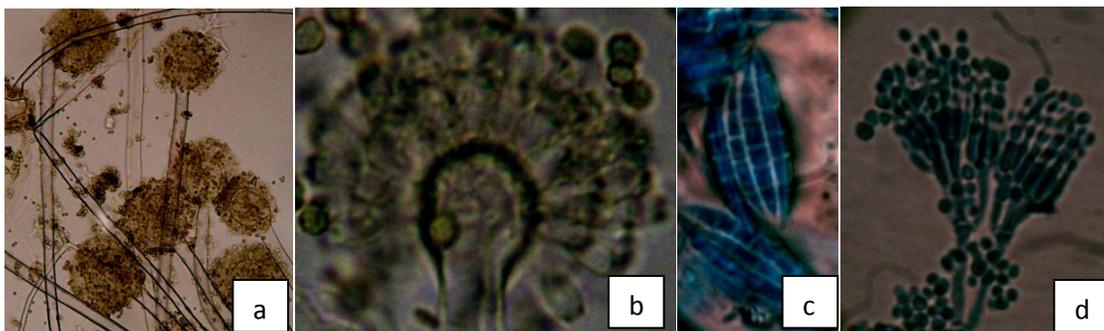
## Resultados

En los granos de maíz se detectó la presencia de 62±2.68 (11.72 %) cepas de *Aspergillus flavus*, 3±0.58 (0.57 %) de *Aspergillus parasiticus*, 405±34.16 (76.99 %) de *Fusarium*, 51±3.97 (9.69 %) de *Penicillium*, 3±0.58 (0.53 %) (Tabla 1) (Figura 1). Los estados con mayor incidencia de hongos potencialmente toxigénicos, fueron Guanajuato y Quintana Roo, donde *Fusarium* se presentó en el 100 % de las semillas en las muestras analizadas. *Penicillium* se presentó en 11 estados, siendo Chiapas, el presentó mayor incidencia de este patógeno. La menor proporción de hongos potencialmente toxigénicos se presentó en Sonora.

**Cuadro 1:** Incidencia de hongos potencialmente toxigénicos en granos de maíz de 14 estados de la república mexicana.

Origen	<i>A. flavus</i>	<i>A. parasiticus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>
Coahuila	7*	0	31	4
Nuevo León	1	0	53	0
Michoacán	6	0	6	2
Zacatecas	3	0	9	3
Jalisco	7	0	13	4
Oaxaca	6	0	25	5
Nayarit	2	0	45	0
Hidalgo	10	0	4	2
Guanajuato	3	0	100	5
Sonora	3	0	2	1
Chiapas	5	0	3	13
Veracruz	4	0	12	11
Quintana Roo	0	1	100	0
Tamaulipas	5	2	2	1
<b>Total</b>	62	3	405	51
<b>Ds</b>	2.68	0.58	34.16	3.97

\*Cada cifra indica el número de cepas de hongos potencialmente toxigénicos aisladas de 100 semillas por estado.



**Figura 1:** Fotografías al microscopio óptico de (a), cabezuelas monoseriadas de *Aspergillus parasiticus*; (b), cabezuela biseriada de *Aspergillus flavus*; (c), conidias de *Fusarium*; (d) conidióforo de *Penicillium*.

## Discusión

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Hernández *et al.* (2007), que obtuvieron micobiotas similares en granos de maíz colectados de campo en el norte de Tamaulipas, con un 76.9 % de *Fusarium*, 11.6 % de *Penicillium* y 3.1 % de *Aspergillus*. En los granos de maíz procesados, dentro del grupo *Flavi* la especie predominante fue *A. flavus* con un 95.38 %. También son similares a los resultados obtenidos por Bucio *et al.* (2003), que encontraron 30.7 % de *Fusarium* en maíces recién cosechados de 14 municipios; además, una incidencia de 50.3 % de *Fusarium* en parcelas inundadas sugiriendo que las condiciones de alta humedad favorecen el ataque de este hongo. Sin embargo, a pesar de que esta suposición es aplicable para el estado de Quintana Roo, donde la precipitación media anual es de 1100 mm reafirma la hipótesis de estos autores, no se observó igual comportamiento en los estados de Chiapas, Veracruz y Oaxaca que tienen medias de precipitación altas entre: 1000 y 5000 mm por año. Es importante señalar, que a pesar de la alta incidencia de *Fusarium*, las toxinas producidas por este hongo son menos tóxicas que las producidas por *Aspergillus flavus* y

*Aspergillus parasiticus*, siendo la aflatoxina B<sub>1</sub>, la sustancia biológica con mayor potencial cancerígeno determinado hasta el momento (Juan *et al.* 2007). En cuanto a la incidencia de estos hongos, la mayor cantidad de cepas, 10 en total, de *Aspergillus flavus* se presentó en el estado de Hidalgo y la menor cantidad en Nuevo León, con una sola cepa. *Aspergillus parasiticus* solo fue detectado en los estados de Quintana Roo y Tamaulipas. *Aspergillus flavus* se presentó en 13 de los 14 estados analizados. Esto condice con lo afirmado por Zummo *et al.*(1990), que indican que *Aspergillus flavus* posee un mayor potencial de contaminación de los granos de maíz en campo que *Aspergillus parasiticus*. En base a los resultados se puede afirmar que los hongos potencialmente toxigénicos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* se encuentran ampliamente distribuidos en México. La alta incidencia de hongos con potencial toxigénico, no necesariamente está relacionada con la producción de micotoxinas. El efecto potencial de estas últimas es acumulativo en los sistemas biológicos expuestos o consumidores de grano contaminado, por lo cual es importante realizar muestreos periódicos a nivel de campo y almacenamiento para reducir el riesgo del consumo de maíz contaminado, especialmente en estratos menos favorecidos económicamente donde el consumo de maíz es básico (Hernández *et al.* 2007). Los hongos potencialmente toxigénicos, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium* y *Penicillium*, están ampliamente distribuidos en los 14 estados analizados. *Fusarium* se presentó en 76.99 % de las muestras analizadas, *Aspergillus flavus* en 11.72 %; *Aspergillus parasiticus*, en 0.57 % y *Penicillium* en 0.53 %. Por lo tanto, es necesario analizar muestras de grano a nivel de campo y almacén, para la detección de estos patógenos en todos los estados de la República.

## **Agradecimientos**

A la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno Mexicano, que por medio de una beca otorgada permitió la realización de la Maestría en Ciencias en Parasitología Agrícola de la Ing. Agr. Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga. A la UAAAN.

## **Literatura citada**

Bucio C M, Martínez O A, Morales R H (2005) Contaminación con hongos en maíz recién cosechado en el estado de Guanajuato durante el año 2003 pp 425-431. Memorias del VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y II Foro de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Guanajuato, Guanajuato, México. 484 pp.

Espinoza N, Garrido E R, Pérez, M, Márquez R N (2003) Cuantificación de cuatro micotoxinas en el grano de maíz en el estado de Chiapas. p 61. Memorias del I Panamerican Symposium on Mycotoxins for industry. Ciudad de México. Resumen.

Gallardo E, Ibarra G, Sanchez R, Cuamea G, Molina D, Parra N, Rosas E, Cortez, M (2006) Micobiota de maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de fumonisina B<sub>1</sub> por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) NIRENB. Revista Mexicana de Fitopatología 24:27-34.

García G, Martínez R, Melgarejo J (2003) Inspecciones para determinar aflatoxinas en maíz en México: I Sonora. p 58. Memorias del I Panamerican Symposium on Mycotoxins for industry. Ciudad de México. Resumen.

Goldblat, L A (1972) Implications of micotoxins. *Clinical Toxicology* 5:453.

- Hernández S, Reyes M, García J, Mayek N, Reyes C (2007) Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:127-133.
- Juan C, Soriano J M, Burdaspal P (2007) Micotoxinas en Alimentos. Aflatoxinas del grupo B y G. Díaz de Santos. España. pp 91-117. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.
- López, M J, Carvajal, M, Itauarte, B. (1995). Supervising programme of aflatoxins in Mexican corn. *Food Addit. Contam.* 12: 297-312.
- Marasas, W.F.O., Burgess, L.W., Anelich R.Y., Lamprecht S.C. , van Schalkwyk D.J. 1988. Survey of *Fusarium* species associated with plant debris in South African soils. *S. Afr. J. Bot.* 54, 63-71.
- Martínez R, García G, Melgarejo J (2003) Inspecciones para determinar aflatoxinas en maíz en México: I Tamaulipas. p.59. *Memorias del I Panamerican Symposium on Mycotoxins for industry.* Ciudad de México. Resumen.
- Miller, J D (1994) Conference Report: 6th International Working Conference on Stored-product Protection. *Australian Mycotoxin Newsletter* 5: 1-8.
- Moss, M O (1991) The enviromental factors controlling micotoxin formation. En Smith JE, Henderson, R S. Boca Ratón, Florida, USA.
- Murray P R, Pflaller M A, Rosenthal K S (2006) *Microbiología médica.* 5ta (ed) Elsevier. España, 974 pp.

Robinson V A, Jaimes J, García L, González L (2003) Niveles de Micotoxinas en maíz en el estado de Michoacán. p 62. Memorias del I Panamerican Symposium on mycotoxins for industry. Ciudad de México. Resumen.

Sargent K, Sheridan A, Kelly J, Carnaghan R (1961) Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature. 192:1096-1097.

**Caracterización Morfológica y Toxigénica de cepas de *Aspergillus flavus* Link Fr. y de *Aspergillus parasiticus* Speare, aisladas de grano de maíz (*Zea mays*), proveniente de diferentes zonas agroecológicas de la República Mexicana**

**Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga; Alberto Flores Olivas; Martha Yolanda Quezada Viay**, Dpto. de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Carretera a Zacatecas, Buenavista, Saltillo, Coah. C.P. 25315. Tel. (844)11-02-26. **Mario Ernesto, Vázquez Badillo**. Dpto. de Semillas, UAAAN. y **Ernesto Moreno Martínez**. Unidad de Investigación de Granos y Semillas, Universidad Nacional Autónoma de México. Centro de Asimilación Tecnológica "C.A.T." Av. Dr. Jorge Jiménez Cantú S/N, Col. San Juan Atlámica. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Tel. (5880)-93-16. 3. Dpto. de Semillas, UAAAN. Correspondencia: [eenesto@servidor.com.mx](mailto:eenesto@servidor.com.mx)

## **RESUMEN**

*Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare, pueden contaminar el grano de maíz con aflatoxinas, las cuales, en concentraciones muy bajas, inferiores a partes por billón tienen efectos oncogénicos y teratogénicos en el hombre y en los animales. Para realizar un estudio de la presencia de estos hongos y de sus toxinas en México, se obtuvieron muestras compuestas de maíces de 14 estados de la república. Se realizó la caracterización morfológica de los *Aspergillus* aislados de las muestras por medio de técnicas microscópicas, y siguiendo claves taxonómicas para su identificación. Para la identificación química de las toxinas, se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina (TLC). La caracterización toxicológica de las cepas se desarrolló por medio de la evaluación de su potencial toxigénico en medio de cultivo in vitro; con el uso de columnas de anticuerpos monoclonales para la purificación de las aflatoxinas totales. Las poblaciones fúngicas analizadas resultaron ser potencialmente aflatoxigénicas en su totalidad. La cepa con mayor producción de aflatoxinas fue la AF01, proveniente de Coahuila y la de menor producción la cepa AF56, de Chiapas. El 100% de las cepas aisladas produjeron aflatoxinas in vitro: un 96.92% presentó AFB y un 3.07% AFB y AFG. Las concentraciones de aflatoxinas variaron de entre 22 y 2250 ppb. El estado con

mayor producción de aflatoxinas en media fue Veracruz y el de menor producción de aflatoxinas en media, Zacatecas.

**Palabras clave:** *Aspergillus*, aflatoxinas, maíz, México.

## **ABSTRACT**

*Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare, can contaminate the grain with aflatoxins in corn, which in very low concentrations are oncogenic and teratogenic effects in humans and animals. To make a study of the presence of these fungi and their toxins, are composed of maize samples from 14 Mexican states. A characterization of the morphology of *Aspergillus* isolated samples by microscopy, following taxonomic key for identification. For the identification of chemical toxins, the technique of thin layer chromatography (TLC). Toxicological characterization of the strains developed by the evaluation of their potential toxigenicity in culture medium in vitro, using monoclonal antibody columns for purification of total aflatoxins. Fungal populations were analyzed potentially aflatoxigénicas in its entirety. The strain with increased production of aflatoxins was the AF01, from Coahuila, and the lowest strain AF56 in Chiapas. 100% of the isolates produced aflatoxins in vitro: a 96.92% had a 3.07% and AFB AFB and AFG. Concentrations of aflatoxins ranged from 22 to 2250 ppb. The state with increased production of aflatoxins in Veracruz average and the lowest production of aflatoxins in half, Zacatecas.

**Keywords:** *Aspergillus*, aflatoxin, maize, Mexico.

## **Introducción**

La contaminación de los alimentos, tiene como consecuencia su deterioro al originar una serie de cambios físicos y químicos, acompañados de olores y sabores desagradables para el consumidor. Pero es de mayor importancia, la capacidad de ciertos

hongos de producir metabolitos tóxicos para el hombre y los animales (Pascual, 2005); causando enfermedades y síndromes clínicos, micotoxicosis (Murray *et al.*, 2006). Actualmente se conocen unos 200 hongos productores de toxinas que ejercen su poder con cantidades extremadamente bajas, inclusive en partes por billón (microgramos por kilogramo) (Pascual, 2005). Dentro de las sustancias de origen natural, las aflatoxinas están consideradas como las sustancias con el potencial más elevado de inducir cáncer, luego de las sustancias radioactivas. El principal órgano afectado por las aflatoxinas es el hígado, aunque también inducen tumores en el riñón, colon y pulmón. Los alimentos más susceptibles a la contaminación fúngica y la posterior producción de aflatoxinas son los granos, entre ellos el maíz; el cacahuete, la copra y la harinolina – harina de la semilla de algodón que queda después de la extracción del aceite- ; materia prima que es utilizada para la elaboración de alimentos para los animales. Tanto leche de vaca como la materna humana pueden contaminarse con la aflatoxina M si las madres consumen alimentos contaminados con aflatoxinas B (Moreno & Gil, 1991; Moreno, 1988). La copra y las nueces de Brasil, están también en riesgo de ser contaminadas por las micotoxinas de estos hongo (Moreno & Gil, 1991; Moreno, 1988). Las características morfológicas de los hongos productores de aflatoxinas, *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*, ayudan a identificarlos a nivel de especie; sin embargo, diferenciarlos entre sí, es complejo debido a las similitudes presentes entre las tres especies. (Rodríguez *et al.*, 2007; Moreno, 2004; Abarca, 2000; Kurtzman *et al.*, 1987). *Aspergillus parasiticus* presenta fiálides uniseriadas, mientras que *A. flavus* presenta fiálides uni y biseriadas, además se considera la ornamentación de la conidia como punto principal en la separación de ambas especies. *Aspergillus flavus* tiene cabezuelas esféricas a elípticas,

mientras que *Aspergillus parasiticus* presenta cabezuelas más esféricas y equinuladas. La separación de *A. nomius* se basa en que éste produce pequeños esclerocios en forma de bala, mientras que los de *A. flavus* son más globosos. No está claro si las cepas de *A. nomius* frescas produzcan estos esclerocios. Una diferencia fundamental entre las tres especies se da en el tipo de producción de metabolitos secundarios (Rodríguez *et al.*, 2007; Moreno, 2004). *Aspergillus flavus* produce únicamente aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y Ácido Ciclopiazónico o ambos o ninguna; *A. parasiticus* y *A. nomius*, aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>; (Rodríguez *et al.*, 2007; Cabañes *et al.*, 2007; Moreno, 2004; Ito *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001; Pitt y Hocking, 1997; Horn & Greene, 1995; Vaamonde, *et al.*, 1995). Sin embargo, algunos autores, detectaron producción de aflatoxinas de tipo G por cepas identificadas como pertenecientes a la especie *A. flavus* (Vaamonde *et al.*, 2003; Cotty, 1989; Klich & Pitt, 1988; Saito *et al.*, 1986). En semillas de maíz las colonias de *A. flavus* y *A. parasiticus* son por lo general de color verde claro, verde amarillento claro, verde intenso, café oliváceo o café. En medio de cultivo, el color de la colonia varía de verde amarillento a verde oliváceo, micelio blanco, esclerocios marrón oscuro a negros, reverso incoloro, marrón claro o naranja, textura de la colonia lanosa o flocosa. Las colonias de *A. parasiticus* son verde más intenso (Abarca, 2000; Warham *et al.*, 1996). Para diferenciar *A. flavus* de *A. parasiticus*, se cultivan en los medios de Czapek, Czapek con Extracto de Levadura ó Czapek con Sacarosa. El medio de agar coco (CAM), se utiliza para discriminar cepas productoras de aflatoxinas de cepas no productoras de aflatoxinas ya que al crecer las mismas y exponerlas a luz ultravioleta emiten fluorescencia. El medio para *Aspergillus Flavus Parasiticus* (AFPA), se utiliza para diferenciar a los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* de otras especies de *Aspergillus*.

(Rodríguez *et al.*, 2007; Cabañes *et al.*, 2007; Sepúlveda & Piontelli, 2005; McClenny, 2005; Medina *et al.*, 2002). Otra característica importante dentro de la especie *A. flavus*, es la capacidad de producir esclerocios y de acuerdo al tamaño y número de éstos, se han establecido dos tipos de cepas. Las cepas S, productoras de un alto número de pequeños esclerocios < 400 µm de diámetro, generalmente producen grandes cantidades de aflatoxinas y son consideradas atípicas y las cepas L que producen esclerocios grandes > 400 µm de diámetro, en bajo número, en promedio menor concentración de aflatoxinas. En Tailandia, Australia, Benín y Argentina se han aislado cepas S productoras de aflatoxinas tipo B o productoras de ambos tipos de aflatoxinas (B y G) mientras en Estados Unidos han sido reportadas cepas S productoras de aflatoxinas B (Pildain *et al.*, 2005; Vaamonde *et al.*, 2003; Cotty y Cardwell, 1999; Horn y Dorner, 1999; Bayman y Cotty, 1993; Cotty, 1989; Blaney *et al.*, 1989; Saito *et al.*, 1986; Hesseltine *et al.*, 1970). El conocimiento de las diferencias regionales en cuanto a las características morfológicas y toxigenicidad de las poblaciones de *A. flavus* y *A. parasiticus* puede ayudar a entender la dinámica poblacional y brindar importante información que podría ser utilizada en la implementación de medidas de control efectivas para reducir la contaminación de aflatoxinas en el campo.

El presente trabajo contribuye al conocimiento de la biodiversidad poblacional de *A. flavus* en México y su relación con diversos sistemas agroecológicos, presentando una caracterización toxigénica y morfológica de los aislamientos de este patógeno a partir de semillas de maíz procedentes de diferentes regiones agroecológicas de México.

## **Materiales y métodos**

**Aislamiento de cepas:** Se estudiaron muestras de maíz blanco y maíz amarillo colectadas al azar, de campos de los estados de: Sonora, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Zacatecas, Jalisco, Nayarit, Michoacán, Hidalgo, Guanajuato, Veracruz, Chiapas, Quintana Roo y Oaxaca. Los granos que no presentaban daños fueron seleccionados y procesados.

**Métodos de cultivo y siembra de los granos y medios de cultivo utilizados:** Las semillas seleccionadas fueron desinfestadas con cloro al 2%, durante un minuto y enjuagadas tres veces en agua destilada esterilizada y secadas. Cien semillas provenientes de muestras compuestas de los diferentes estados fueron sembradas en malta sal agar (MSA) al 6% de NaCl, en placas de Petri de 9 cm de diámetro, 10 semillas por placa e incubadas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 7 días. Se evaluó la microbiota, y las colonias que presentaron características de color similares a *A. flavus* y *A. parasiticus* fueron seleccionadas y purificados en papa dextrosa agar (PDA) (Hernández *et al.*, 2007; Sepúlveda & Piontelli, 2005).

**Preparación de cultivos monospóricos:** De cada aislado se tomó con sacabocados un explante de 0.5 cm de diámetro y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 1 ml de agua destilada esterilizada. Se pasó por vórtex 30 segundos y de dicha dilución, se tomaron 10 $\mu$ l de muestra que fueron sembrados y distribuidos con asa de vidrio estéril en cajas Petri con PDA e incubadas por 24 horas en estufa a  $27 \pm 2$  °C para la realización de cultivos monospóricos. Posteriormente se tomó con aguja estéril un punto

de crecimiento a las 24 horas y se sembró PDA para su crecimiento a  $25 \pm 2$  °C (Sepúlveda & Piontelli, 2005).

**Determinación de las especies de *Aspergillus* en medios especiales:** De los cultivos monospóricos se tomaron explantes de 0.5 cm de diámetro que fueron sembrados por duplicado: dos colonias equidistantes en cajas Petri de 9 cm de diámetro con agar Czapek con extracto de levadura (ACY) y (AFPA) para la confirmación de la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* (Rodríguez *et al.*, 2007; Sepúlveda & Piontelli, 2005). Dichas cajas fueron incubadas durante 7 días a  $27 \pm 2$  °C. al cabo de los cuales se analizaron las colonias midiéndose su radio, observándose el color de las mismas y el aspecto de la colonia. La presencia o ausencia de esclerocios, número, tamaño y forma, se analizó a los 10 días de crecimiento. Con microscopía óptica se observaron métulas, fiálides y conidias. Para la identificación de las mismas se utilizaron las claves de Rapper & Fennel (1965). El conteo total de los esclerocios se realizó por raspado en las cajas Petri. Fueron seleccionados 10 esclerocios al azar y medidos en microscopio con objetivo reglado.

**Presencia de aflatoxinas:** se sembraron explantes en agar coco extracto de levadura(ACY) para la determinación de cepas toxigénicas por medio de la fluorescencia, incubadas por 5 días a  $27 \pm 2$  °C (Rodríguez *et al.*, 2007; Sepúlveda & Piontelli, 2005; Medina *et al.*, 2002).

**Producción de aflatoxinas:** para determinar si las cepas aisladas eran o no productoras de las aflatoxinas tipo B y G (AFB y AFG, respectivamente); se utilizó el método rápido de «screening» de Filtenborg y Frisvad (1980) y Filtenborg *et al.*, (1983), que consiste en aplicar directamente sobre la placa cromatográfica un cilindro de Agar de 0.5 cm de diámetro cortado con un sacabocados de una colonia en agar Czapek extracto de levadura (ACY) de 7 días mantenida a 25 °C. La detección de las micotoxinas fue realizada usando placas de cromatografía de sílica gel G60 (20 x 20 cm, 0.25 mm espesor, Merck5721, Alemania). El solvente de corrida para la detección de aflatoxinas fue cloroformo-acetona (90:10) (Pildain *et al.*, 2005; Fernández Pinto *et al.*, 2001).

**Cuantificación de aflatoxinas:** La cuantificación total de aflatoxinas en las cepas toxigénicas determinadas por la prueba de Filtenborg y Frisvad (1980) y Filtenborg y otros (1983); se realizó por medio del método Aflatest de Vicam, modificándolo, para lo cual se pesó el contenido del medio de cultivo de una caja Petri. Se ajustaron a ese peso los valores de metanol (80%) y el cloruro de sodio, requeridos para la extracción de las aflatoxinas en el método original. Posteriormente se licuó por 10 segundos, se filtró, con papel Whatman no.1. Se tomaron 10 ml del filtrado y se diluyeron en 40 ml de agua destilada. Se tomó 1 ml de la dilución y se hizo un segundo filtrado por papel fibra de vidrio pasándolo por la columna de anticuerpos monoclonales previamente acondicionada. La misma se lavó 3 veces con agua destilada y posteriormente se retomó el eluato con 1ml de metanol grado HPLC en una cubeta de vidrio. Se añadió 1.0 ml de solución reveladora de bromo, se agitó por 1 min. y se leyó en un fluorómetro marca Vicam serie 4 (NOM-188-SSA1-2002; Vicam, 1999).

**Análisis estadístico:** Se utilizó la prueba de Duncan para las comparaciones de medias. Los datos fueron analizados por medio del paquete estadístico SAS V8, para Windows.

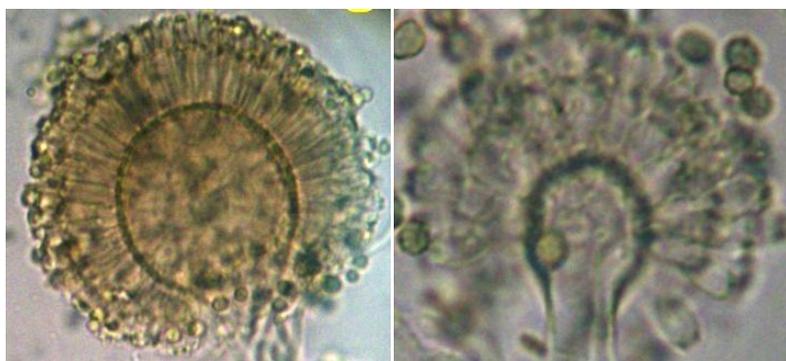
## **Resultados y discusión**

**Presencia y distribución de hongos en granos de maíz:** En los granos de maíz se detectó la presencia de  $62 \pm 2.68$  (11.72%) cepas de *Aspergillus flavus*,  $3 \pm 0.58$  (0.57%) de *Aspergillus parasiticus*,  $405 \pm 34.16$  (76.99%) de *Fusarium*,  $51 \pm 3.97$  (9.69%) de *Penicillium*,  $3 \pm 0.58$  (0.53%) de *Rhizopus* y  $2 \pm 0.53$  (0.38%) de *A. niger* para un total de  $526 \pm 157.52$  colonias. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Hernández *et al.*, (2007), que obtuvieron micobiotas similares en granos de maíz colectados de campo en el norte de Tamaulipas, con un 76.9% de *Fusarium*, 11.6% de *Penicillium* y 3.1% de *Aspergillus*. En los granos de maíz procesados, dentro del grupo flavi la especie predominante fue *A. flavus* con un 95.38%, coincidiendo con lo obtenido por Moreno (2004), donde se obtuvo *A. flavus* en el 100% de las 18 muestras de maíz de granos almacenados, obtenidos de Tamaulipas, Campeche, Guadalajara, Sinaloa, Chiapas y proveídos por CONASUPO. Existieron diferencias altamente significativas, al comparar las regiones muestreadas con relación a las especies. *A. flavus* sólo se presentó en 2 estados de la república, Quintana Roo y Tamaulipas, mientras que *A. parasiticus* se presentó en todos los estados analizados.

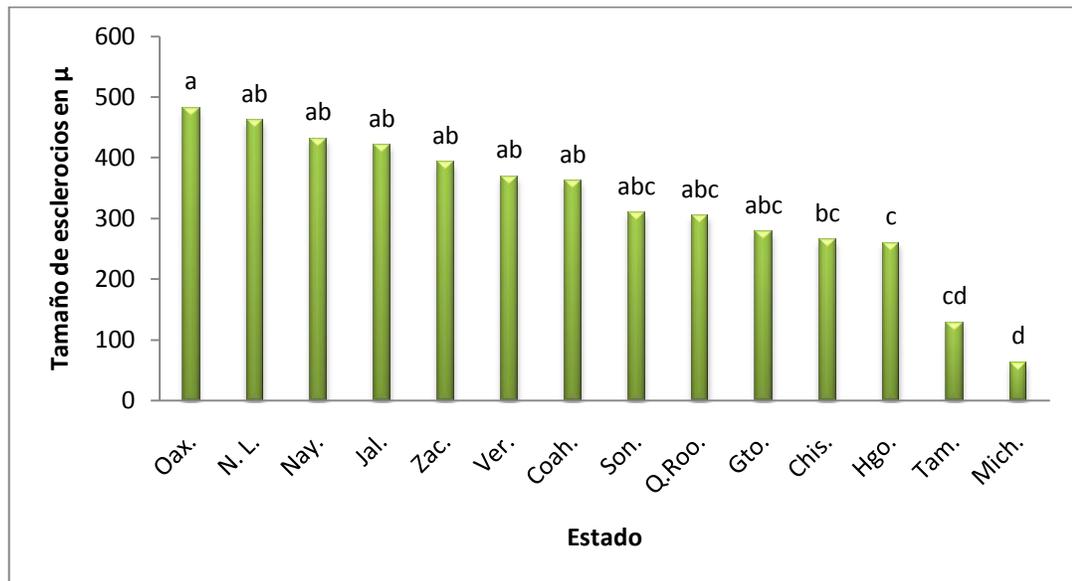
**Aspectos morfofisiológicos de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*:** El crecimiento promedio de las cepas aisladas en CYA fue de  $217 \pm 0.18$  mm para *A. flavus* y de  $219 \pm 0.23$  mm para *A. parasiticus*. Las colonias de *A. flavus* presentaron

color verde amarillo brillante más claro que las de *A. parasiticus*, que tomaron color verde oliváceo. En el AFPA, el 100% de los aislamientos presentó color naranja en el reverso de la colonia indicando la presencia de estos hongos; 42, (64.61%), de las cepas presentaron mótulas y fiálides (figura 1).

De las 65 cepas aisladas de los estados estudiados, 54 cepas produjeron esclerocios; en 33 cepas, los esclerocios fueron del tipo L, con un promedio de  $451 \pm 35.53\mu$  de diámetro, en 21 cepas los esclerocios fueron del tipo S, con un diámetro promedio de  $294 \pm 71.64$  y 11 cepas, no produjeron esclerocios a los 10 días de crecimiento. La cantidad de esclerocios varió entre  $1 \pm 0.71$  en las cepas AF01 (Coahuila), AF10 (Michoacán) y AF49 (Chiapas) a  $166 \pm 17.68$  esclerocios por caja, AF28(Oaxaca), para el caso de las cepas L. En el caso de las cepas S, la producción varió de  $2 \pm 2.83$  a  $19980 \pm 90.21$  esclerocios por caja para las cepas AF36 (Hidalgo) y AF56 (Veracruz), respectivamente. La mayor cantidad de esclerocios se produjo en las cepas aisladas de los estados de Veracruz y Chiapas (figura 2).



**Fig. 1:** Cabezuelas conidiales mono (izquierda) y biseriadas (derecha) de *Aspergillus flavus*.



**Fig. 2:** Comparación de medias de tamaño de los esclerocios producidos en las cepas de *Aspergillus* aisladas de cada estado estudiado.



**Fig. 3.** Esclerocio S (1), esclerocio L (2), cepa altamente productora de esclerocios (3) y cepa no productora de esclerocios (4).

Los datos son similares a los obtenidos por Moreno (2004), donde de 18 muestras de maíz de granos almacenados analizadas, el 87.5% de las mismas produjo esclerocios del tipo L, con un diámetro promedio de 675.2 $\mu$ , el 5.5%, esclerocios tipo S, con un diámetro de 313 $\mu$  y el 11.11% de las cepas no produjo esclerocios. También coinciden con lo obtenido, Pildain *et al.*, (2005), donde en cepas de *A. flavus* aisladas de cacahuate se obtuvieron de 188 aislados, el 46.8% de los mismos formó esclerocios tipo

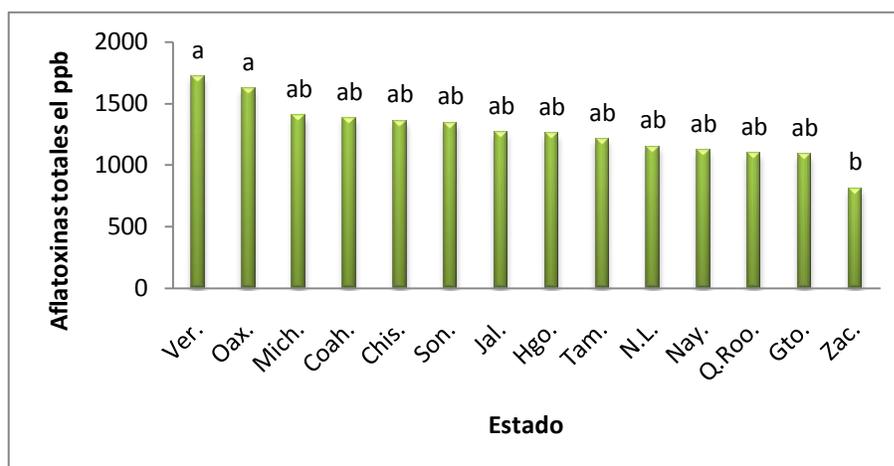
L, 25% del tipo S y 28.19% no formó esclerocios y con Nesci & Etcheverry (2002), que obtuvieron un 100% de cepas productoras de esclerocios del tipo L. Oaxaca, Nuevo León, Nayarit y Jalisco fueron los 4 estados que presentaron cepas con esclerocios más grandes (L) y Tamaulipas y Michoacán, los dos estados con los esclerocios más pequeños (S).

**Presencia de aflatoxinas en cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* en medio de cultivo**

**ACY:** el 100% de las cepas aisladas presentó fluorescencia bajo luz UV en ACY a los 5 días de crecimiento. Los datos son coincidentes en cuanto a la presencia de fluorescencia a los 5 días de crecimiento, con los obtenidos por Sepúlveda y Piontelli (2005), donde el 44% de las cepas de *A. flavus* analizadas presentaron halo azul fluorescente a los 5 días de crecimiento y con Medina *et al.*, (2002), donde el 84% de las muestras analizadas resultaron positivas al análisis en ACY.

**Presencia de aflatoxinas por TLC y aflatoxinas totales por inmunoafinidad:** En el 100% de las pruebas de TLC realizadas con las cepas aisladas se encontraron manchas fluorescentes azules, indicando la presencia de aflatoxinas B y el 4.61 % de las mismas, se presentaron también manchas fluorescentes verdes correspondientes a aflatoxinas G. Las cepas AF58 (Quintana Roo) productora de esclerocios S, AF59 y AF64 (Tamaulipas), no productoras de esclerocios, de *A. parasiticus* resultaron positivas a AFG. El 100% de los aislamientos del tipo L, produjo AFB, el 4.76% de los aislamientos S, produjo AFB y AFG al igual que el 18.18% de las cepas no productoras de esclerocios.

La producción media de aflatoxinas en medio ACY de los estados estudiados fue de  $1308.65 \pm 479.73$  ppb, siendo el estado de Veracruz el que obtuvo la producción media más alta con  $1718 \pm 294.09$  ppb y Zacatecas, la menor, con  $810 \pm 675$  ppb. La cepa más toxigénica en ACY fue AF01, Coahuila con  $2250 \pm 212.13$  ppb y la menos toxigénica AF52 Chiapas con  $22 \pm 8.49$  ppb. Entre el resto de los estados no se observaron diferencias significativas en cuanto a la producción de aflatoxinas (figura 3).



**Fig. 4:** Comparación de medias de Aflatoxinas totales de cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* aislados de los estados estudiados

Las zonas analizadas presentan condiciones macro y micro-climáticas diferentes. La historia del suelo, tipo de cultivos, niveles de insectos, precipitaciones, prácticas culturales también son diferentes y todos estos factores influyen sobre las comunidades de *A. flavus* y *A. parasiticus* tal como ha sido señalado por Orum *et al.*, (1997). Otro factor correlacionado con la divergencia entre comunidades de *A. flavus* y *A. parasiticus* en diferentes áreas es la latitud (Cotty, 1997); las regiones agroecológicas analizadas se encuentran a diferentes latitudes y dan otra posible causa de variabilidad (Pildain *et al.*,

2005). Los resultados de este estudio aportan nuevos datos sobre las comunidades de *A. flavus* y *A. parasiticus* en maíz en México, asociando caracteres morfológicos y toxigénicos de las cepas aisladas con las posibles diferencias agroecológicas de las diferentes áreas geográficas de las cuales provienen los aislamientos (Pildaín *et al.*, 2005). Se han considerado características de las cepas que están estrechamente relacionadas con la contaminación potencial del maíz con las toxinas producidas por esta especie fúngica asociada, tales como la capacidad toxigénica, el perfil de metabolitos secundarios tóxicos y la producción de estructuras de resistencia señaladas como importante fuente de inóculo primario.

### **Conclusiones**

Se determinó la presencia de *Aspergillus flavus* en los 14 estados de la República analizados y *Aspergillus parasiticus* en 2. Del total estudiado 54 cepas produjeron esclerocios a los 10 días de crecimiento. El 100% de las cepas aisladas resultó toxigénica, un 96.92% presentó AFB y un 3.07% AFB y AFG. Las concentraciones de aflatoxinas variaron de 22 a 2250 ppb. El estado con una mayor producción de aflatoxinas en media fue Veracruz y el de menor producción de aflatoxinas en media, Zacatecas.

### **Agradecimientos**

A la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno Mexicano, que por medio de una beca otorgada permitió la realización de la Maestría en Ciencias en Parasitología Agrícola de la Ing. Agr. Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga. A la Universidad

Autónoma Agraria Antonio Narro y a la Unidad de Investigación en Granos Y Semillas de la UNAM, que financiaron esta investigación.

### **Literatura citada**

- Abarca, M. 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergillosis nosocomial. *Revista Iberoamericana de Micología* 2000: 17 S79-S84.
- Bayman, P.; Cotty, P. 1993. Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Canadian Journal of Botany* 71: 23-31.
- Blaney, B. J.; Kelly, M. A.; Tyler, A.L.; Connole, M. D. 1989. Aflatoxin and cyclopiazonic acid Production by Queensland isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Australian Journal of Agricultural Reserch* 40: 395-400.
- Cabañes, F.; Abarca, L.; Bragulat, M.; Catellá, G. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Especies productoras de micotoxinas. Díaz de Santos. España. P 29-61. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.
- Cotty, P. J. 1997. Aflatoxin - producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. *Mycological Research* 101:698-704.
- Cotty, P. J. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. *Phytopathology* 79: 808-814.
- Cotty, P. J.; Cardwell, K. F. 1999. Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2264-2266.

- Fernandez Pinto, V.; Patriarca, A.; Locani, O.; Vaamonde, G. 2001. Natural co-occurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. *Food Additives and Contaminants* 18: 1017-1020.
- Filtenborg, O.; Frisvad, J. C. 1980. A simple screening method for toxigenic molds in pure cultures. *Lebensmittel - Wissenschaft + Technologie* 13: 128- 130.
- Filtenborg, O.; Frisvad, J. C.; Svendsen, J. A. 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 581-585.
- Hernández, S.; Reyes, M.; García, J.; Mayek, N.; Reyes, C. 2007. Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25:127-133.
- Hesseltine, C. W.; Shotwell, O. T.; Smith, M.; Ellis, J.J.; Vandegrift, E.; Shannon, G. 1970. Production of various Aflatoxins by Strains of the *Aspergillus flavus* series. In *Proceedings of the First US-Japan Conference on Toxic Microorganisms*, p. 202-210 UJNR Joint Panels on Toxic Microorganisms and the US Department of the Interior, Washington, DC.
- Horn, B. W.; Greene, R. L. 1995. Vegetative compatibility within populations of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamarii* from a peanut field . *Mycologia* 87: 324-332.
- Horn, B. W.; Dorner, J. W. 1999. Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1444-1449.
- Ito, Y.; Peterson, W.; Wicklow, D.; Goto, T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section Flavi. *Mycological Research* 105: 233-239.

- Klich, M. A.; Pitt, J. I. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. Transactions of the British Mycological Society 91: 99-108.
- Kurtzman, C.; Horn, B.; Hesseltine, C. 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaraii*. Antonie van Leeuwenhoek 53:147-158.
- McClenny, N. 2005. Laboratory detection and identification of *Aspergillus* species by microscopic observation and culture: the traditional approach. Medical Mycology Supplement 43: S125-S128.
- Medina, F.; Irey, J.; Roque, M. 2002. Determinación de aflatoxinas en algunos productos naturales utilizando el medio agar coco y Elisa ligada. Ciencia e Investigación 2: 46-54.
- Moreno, J. 2004. Estudio comparativo de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en la producción de aflatoxinas bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura. Tesis inédita. UNAM. Facultad de Estudios Superiores de Postgrado. Cuautitlán Izcali, Edo. de México.
- Moreno, E.; Gil, M. 1991. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. UNAM. Programa universitario de alimentos. México, Df. 42 p.
- Moreno, E. 1988. Manual para la identificación de hongos de granos y sus derivados. UNAM. Programa universitario de alimentos. México, DF. 109 p.
- Murray, P.R.; Pfaller, M.A.; Rosenthal, K.S. 2006. Microbiología Médica. 5ta ed. Elsevier. 974 p.

- Nesci, A.; Etcheverry M. 2002. *Aspergillus* section *Flavi* populations from field maize in Argentina. *Letters in Applied Microbiology* 34: 434-348.
- Orum, T. V.; Bigelow, D. M.; Nelson, M. R.; Howell, D. R.; Cotty, P. J. 1997. Spatial and temporal patterns of *A. flavus* strain composition and propagule density in Yuma County, Arizona soils. *Plant Disease* 81: 911-916.
- Pascual, M.R. 2005. Enfermedades de origen alimentario: Su prevención. Publicado por Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. 177p.
- Peterson, S.; Ito, Y.; Horn, B.; Goto, T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93: 689-703.
- Pildain, M.; Cabral, D.; Vaamonde, G. 2005. Poblaciones de *A. flavus* en maní cultivado en diferentes zonas agroecológicas de la Argentina. *RIA*, 34: 3-19.
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 1997. *Fungi and food spoilage*. Academic Press, ed...Sydney, Australia: 593p.
- Raper, K.B.; Fennell, D.I. 1965. *The Genus Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins Company. Ed .686 p.
- Rodrigues, P.; Soares, C.; Kozakiewicz, Z.; Paterson, R.; Lima, N.; Venâncio, A. 2007. Identification and characterization of *A. flavus* and aflatoxins. *Com. Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Mendez-Vilas (Ed). 527-534.
- Saito, M.; Tsuruta, O.; Siriacha, P.; Kawasugi, S.; Manabe, M.; Buangsuwon, D. 1986. Distribution and aflatoxin productivity of the atypical strains of *A. flavus* isolated from soils in Thailand. *Proceedings of the Japan Association of Mycotoxicology* 24: 41-46.

- SAS Institute Inc. 1988. SAS/STAT. User guide. Release V8 edition. SAS Institute. North Carolina USA. 1028 p.
- Sepúlveda, C.; Piontelli, E. 2005. Poblaciones de *Aspergillus* en semillas de maíz y soja de importación argentina: énfasis en la sección flavi. Boletín Micológico 20: 41 - 55 2005.
- Vaamonde, G.; Degrossi, C.; Comerio, R.; Fernández Pinto, V. 1995. *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* en maní cultivado en la provincia de Córdoba (Argentina): Características diferenciales y capacidad aflatoxicogénica. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 30:191-198.
- Vaamonde, G.; Patriarca, A.; Fernández Pinto, V.; Comerio, R.; Degrossi, C. 2003. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. International Journal of Food Microbiology 2738: 1-6.
- Vicam Technologies. 1999. Aflatest instruction manual. Watertown, U.S.A. 96 p.
- Warham, E. J.; Buttler, L.D.; Sutton, B.C.. 1996. Ensayos para la Semilla de Maíz y de Trigo. Manual de Laboratorio. CIMMYT. El Batán, México. 83 p.

**Relación entre la producción de aflatoxinas y esclerocios por cepas de *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare aislados de maíz (*Zea mays*) en México.**

**Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga; Martha Yolanda Quezada Viay; Alberto Flores Olivas**, Dpto. de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Carretera a Zacatecas, Buenavista, Saltillo, Coah. C.P. 25315. Tel. (844)11-02-26. **Mario Ernesto Vázquez Badillo**, Dpto. de Semillas, UAAAN. **Emilio Padrón Corral**, Centro de Investigación en Matemáticas Aplicadas, Universidad Autónoma de Coahuila, Unidad Campo Arredondo, Saltillo, Coah. y **Ernesto Moreno Martínez**. Unidad de Investigación de Granos y Semillas, Universidad Nacional Autónoma de México. Centro de Asimilación Tecnológica "C.A.T." Av. Dr. Jorge Jiménez Cantú S/N, Col. San Juan Atlamica. Cuautitlán Izcalli, Estado de México. **Tel.** (5880)-93-16. 3. Dpto. de Semillas, UAAAN. Correspondencia: [alejandraagro@yahoo.com.mx](mailto:alejandraagro@yahoo.com.mx)

**RESUMEN**

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos producidos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* que contaminan los alimentos y constituyen un serio riesgo para la salud humana y animal. El control del problema radica en la prevención del desarrollo de los mismos en sustratos susceptibles. Se ha sugerido que la severidad de la contaminación de un determinado cultivo en una región puede estar en parte determinada por el potencial toxigénico de las cepas presentes. Otra característica importante dentro de estas especies, relacionada con la capacidad de supervivencia y dispersión en el medio ambiente, es la capacidad de producir esclerocios. Se han tipificado dos tipos de cepas. Las S productoras de alto número de esclerocios pequeños y generalmente grandes cantidades de aflatoxinas Las L productoras de esclerocios grandes en bajo número, y en promedio menor concentración de aflatoxinas. Con el objetivo de analizar la relación entre la producción de aflatoxinas y esclerocios se tomaron muestras compuestas de maíces de 14 estados de la república Mexicana. Se analizaron la forma, tamaño y número de los esclerocios producidos por las 65 cepas aisladas, además tipo de aflatoxina producida B o G por TLC y aflatoxinas totales por anticuerpos monoclonales. Se determinó la presencia de *Aspergillus flavus* en los 14

aisladas, además tipo de aflatoxina producida B o G por TLC y aflatoxinas totales por anticuerpos monoclonales. Se determinó la presencia de *Aspergillus flavus* en los 14 estados de la República analizados y *Aspergillus parasiticus* en 2. Del total estudiado 54 cepas produjeron esclerocios a los 10 días de crecimiento. El 100% de las cepas aisladas resultó toxigénica, un 96.92% presentó AFB y un 3.07% AFB y AFG. La número de esclerocios producidos y la cantidad aflatoxinas esta positivamente.

**Palabras clave:** *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, esclerocios, aflatoxinas.

### **ABSTRACT**

Aflatoxins are toxic metabolites produced by *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus nomius* that contaminate food and are a serious risk to human and animal health. The control of the problem lies in preventing the development of these in susceptible substrates. It has been suggested that the severity of the pollution of a particular crop in one region may be partly determined by the toxigenic potential of strains present. Another important characteristic of these species, related to the ability of survival and dispersal in the environment is the ability to produce sclerotia. We have defined two types of strains. S producing the large number of small sclerotia and usually large amounts of aflatoxina. L the big low, and lower average concentration of aflatoxins. In order to analyze the relationship between the production of aflatoxins and sclerotia samples consisting of maize, 14 Mexican states. We analyzed the shape, size and number of sclerotia produced by 65 isolates also produced aflatoxin types B or G TLC and total aflatoxins by monoclonal antibodies. We determined the presence of *Aspergillus flavus* in 14 Mexican states analyzed in 2 and *Aspergillus parasiticus*. Of the total studied 54 strains produced sclerotia to 10 days of growth. 100% of the isolates were toxigenic, a 96.92% had a 3.07% AFB and AFB and AFG. The number of sclerotia produced and the amount is positive aflatoxins.

**Key words:** *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, sclerotia, aflatoxins.

## Introducción

Las aflatoxinas son producidas por los hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* (Kurtzman *et al.*), su presencia en los alimentos constituye un serio peligro para la salud humana y animal. Su estabilidad frente a diversos agentes, tanto físicos como químicos, hace que sea difícil eliminarlas de los alimentos una vez producidas. Por lo tanto, el control del problema radica en la prevención del desarrollo de los hongos toxigénicos en los sustratos susceptibles (Pildain *et al.*, 2005). Las aflatoxinas son consideradas las sustancias con el potencial más elevado de inducir cáncer en animales y humanos luego de las sustancias radioactivas. La capacidad de producción de las aflatoxinas está condicionada por factores como: el tipo de hongo, las características del sustrato y las condiciones externas (humedad, temperatura y luz) (Moreno, 2004). Se ha sugerido que la severidad de la contaminación de un determinado cultivo en una región puede estar en parte determinada por el potencial toxigénico de las cepas presentes (Horn & Dorner, 1999). Otra característica importante dentro de estas especies, está relacionada con la capacidad de supervivencia y dispersión del hongo en el medio ambiente, y es la capacidad de producir esclerocios. Dentro de la variación fenotípica encontrada para los aislamientos de esta especie, se han tipificado dos tipos de cepas. Las cepas S producen en alto número de esclerocios pequeños, menores a 400 µm de diámetro y generalmente producen grandes cantidades de aflatoxinas (Cotty, 1989; Pildain *et al.*, 2005). Estos aislamientos han sido referidos como atípicos, son denominados *A. flavus* var. *Parvisclerotigenus* (Saito *et al.* 1986; Saito y Tsuruta, 1993). Las cepas L producen esclerocios grandes mayores a 400µm de diámetro en bajo número, y en promedio

menor concentración de aflatoxinas (Saito *et al.*, 1986; Cotty, 1989; Bayman y Cotty, 1993; Pildain *et al.*, 2005). En Tailandia, Australia, Benin y Argentina se han aislado cepas S productoras de aflatoxinas tipo B o productoras de ambos tipos de aflatoxinas (B y G) (Hesseltine *et al.*, 1970; Saito *et al.*, 1986; Blaney *et al.*, 1989; Cotty & Cardwell, 1999; Vaamonde *et al.*, 2003), mientras que en Estados Unidos solamente han sido reportadas cepas S productoras de aflatoxinas B (Cotty y Cardwell, 1999; Horn y Dorner, 1999). En México, se han aislado cepas S y L, productoras de aflatoxinas B, en *A. flavus* y B y G en *A. parasiticus* (Moreno, 2004). Estudios moleculares realizados con cepas de *A. flavus* de diversa procedencia geográfica (Geiser *et al.*, 1998; Tran-Dinh *et al.*, 1999; Geiser *et al.*, 2001) indican que las cepas S productoras de aflatoxinas de tipo B y G y ACP forman un subgrupo que por sus características genéticas, morfológicas y bioquímicas debería posiblemente ser reconocido como una nueva especie. La separación de *A. nomius* se basa en que éste produce pequeños esclerocios en forma de bala, mientras que los de *A. flavus* son más globosos. No está claro si las cepas de *A. nomius* frescas produzcan estos esclerocios. Una diferencia fundamental entre las tres especies se da en el tipo de producción de metabolitos secundarios (Rodríguez *et al.*, 2007; Moreno, 2004). *Aspergillus flavus* produce únicamente aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y Ácido Ciclopiazónico o ambos o ninguna; *A. parasiticus* y *A. nomius*, aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>; (Rodríguez *et al.*, 2007; Cabañes *et al.*, 2007; Moreno, 2004; Ito *et al.*, 2001; Peterson *et al.*, 2001; Pitt & Hocking, 1997; Horn & Greene, 1995; Vaamonde, *et al.*, 1995). Sin embargo, algunos autores, detectaron producción de aflatoxinas de tipo G por cepas identificadas como pertenecientes a la especie *A. flavus* (Vaamonde *et al.*, 2003; Cotty, 1989; Klich & Pitt, 1988; Saito *et al.*,

1986). El conocimiento de las diferencias regionales en cuanto a las características morfológicas y toxigenicidad de las poblaciones de *A. flavus* y *A. parasiticus* puede ayudar a entender la dinámica poblacional y brindar importante información que podría ser utilizada en la implementación de medidas de control efectivas para reducir la contaminación de aflatoxinas en el campo.

### **Materiales y métodos**

**Obtención de cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* de maíz:** Cien semillas provenientes de muestras compuestas de 14 estados de la república, fueron desinfestadas con cloro al 2%, durante un minuto y enjuagadas tres veces en agua destilada esterilizada y secadas. Sembradas en malta sal agar (MSA) al 6% de NaCl, en placas de Petri de 9 cm de diámetro, 10 semillas por placa e incubadas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 7 días. Los *A. flavus* y *A. parasiticus* fueron identificados por medio de las claves de Raper y Fennel, 1965 (Hernández *et al.*, 2007; Sepúlveda & Piontelli, 2005).

**Preparación de cultivos monospóricos:** De cada aislado se tomó con sacabocados un explante de 0.5 cm de diámetro y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml con 1 ml de agua destilada esterilizada. Se pasó por vórtex 30 segundos y de dicha dilución, se tomaron 10 $\mu$ l de muestra que fueron sembrados y distribuidos con asa de vidrio estéril en cajas Petri con PDA e incubadas por 24 horas en estufa a  $27 \pm 2$  °C para la realización de cultivos monospóricos. Posteriormente se tomó con aguja estéril un punto de crecimiento a las 24 horas y se sembró PDA para su crecimiento a  $25 \pm 2$  °C (Sepúlveda & Piontelli, 2005).

**Obtención del nro. y tamaño de los esclerocios:** La presencia o ausencia de esclerocios, número, tamaño y forma, se analizó a los 10 días de crecimiento en Czapek. El conteo total de los esclerocios se realizó por raspado en las cajas Petri. Fueron seleccionados 10 esclerocios al azar y medidos en microscopio con objetivo reglado.

**Producción de aflatoxinas:** para determinar si las cepas aisladas produjeron aflatoxinas tipo B o G (AFB y AFG, respectivamente); se utilizó el método rápido de «screening» de Filtenborg y Frisvad (1980) y Filtenborg *et al.*, (1983), que consiste en aplicar directamente sobre la placa cromatográfica un cilindro de Agar de 0.5 cm de diámetro cortado con un sacabocados de una colonia en agar Czapek extracto de levadura (ACY) de 7 días mantenida a 25 °C. La detección de las micotoxinas fue realizada usando placas de cromatografía de sílica gel G60 (20 x 20 cm, 0.25 mm espesor, Merck5721, Alemania). El solvente de corrida para la detección de aflatoxinas fue cloroformo-acetona (90:10) (Pildain *et al.*, 2005; Fernández Pinto *et al.*, 2001).

**Cuantificación de aflatoxinas:** La cuantificación total de aflatoxinas en las cepas toxigénicas determinadas por la prueba de Filtenborg & Frisvad (1980) y Filtenborg *et al.*, (1983); se realizó por medio del método Aflatest de Vicam, modificándolo, para lo cual se pesó el contenido del medio de cultivo de una caja Petri. Se ajustaron a ese peso los valores de metanol (80%) y el cloruro de sodio, requeridos para la extracción de las aflatoxinas en el método original. Posteriormente se licuó por 10 segundos, se filtró, con papel Whatman no.1. Se tomaron 10 ml del filtrado y se diluyeron en 40 ml de agua destilada. Se tomó 1 ml de la dilución y se hizo un segundo filtrado por papel fibra de

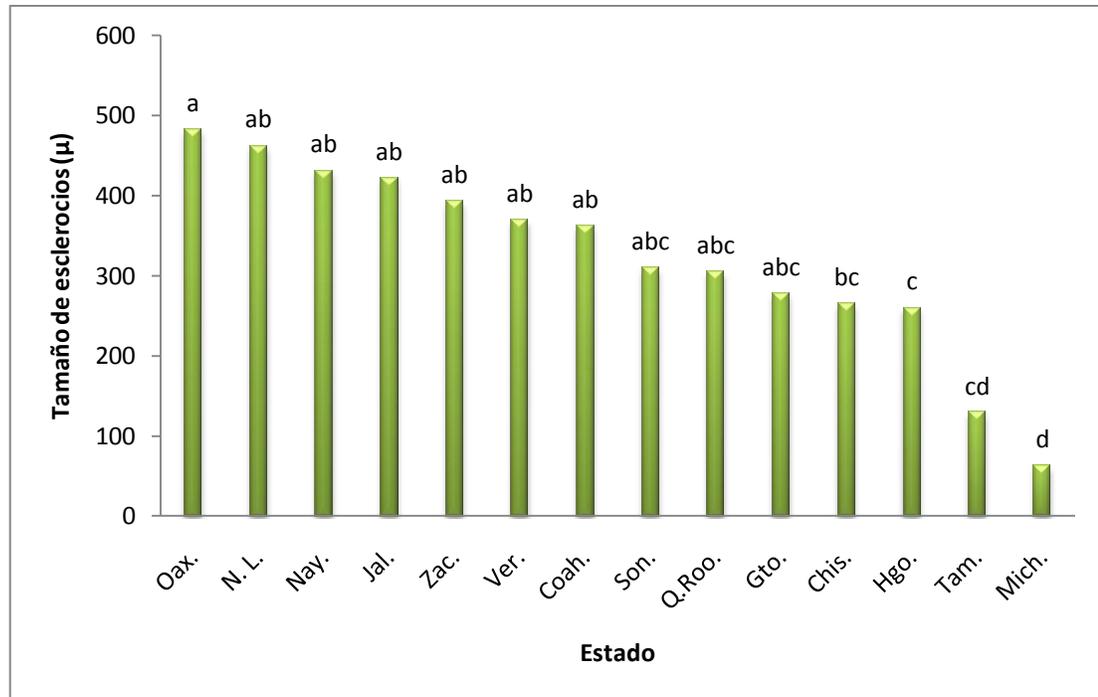
vidrio pasándolo por la columna de anticuerpos monoclonales previamente acondicionada. La misma se lavó 3 veces con agua destilada y posteriormente se retomó el eluato con 1ml de metanol grado HPLC en una cubeta de vidrio. Se añadió 1.0 ml de solución reveladora de bromo, se agitó por 1 min. y se leyó en un fluorómetro marca Vicam serie 4 (Vicom, 1999).

**Análisis estadístico:** se realizó por medio del paquete bioestadístico Graphpad Prisma 5.0, utilizando para las correlaciones el coeficiente de Spearman, con un intervalo de confianza de 99% y  $\alpha= 0.05$ .

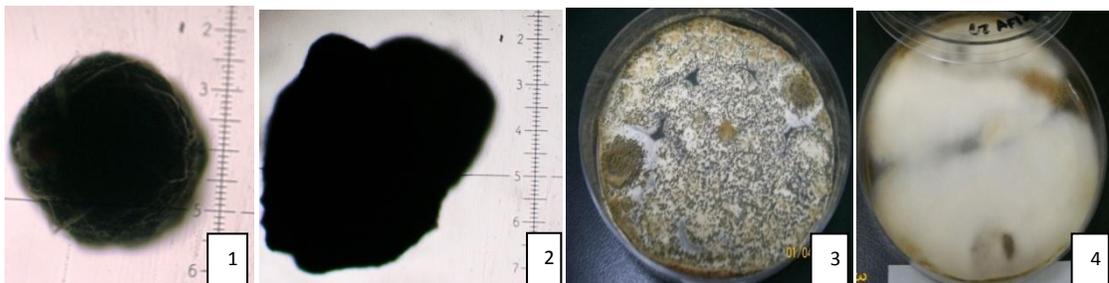
## **Resultados y discusión**

**Aspectos morfofisiológicos de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*:** 54 cepas produjeron esclerocios; 33 del tipo L, con un promedio de  $451 \pm 35.53\mu$  de diámetro y 21 del tipo S, con un diámetro promedio de  $294 \pm 71.64$  y 11 cepas, no produjeron esclerocios a los 10 días de crecimiento. La cantidad de esclerocios varió entre  $1 \pm 0.71$  en las cepas AF01 (Coahuila), AF10 (Michoacán) y AF49 (Chiapas) a  $166 \pm 17.68$  esclerocios por caja, AF28 (Oaxaca), para el caso de las cepas L. En el caso de las cepas S, la producción varió de  $2 \pm 2.83$  a  $19980 \pm 90.21$  esclerocios por caja para las cepas AF36 (Hidalgo) y AF56 (Veracruz), respectivamente. La mayor cantidad de esclerocios se produjo en las cepas aisladas de los estados de Veracruz y Chiapas (figuras 1 y 2). Se observó predominancia de cepas L, lo que coincide con Ortiz *et al.*, (2008) que obtuvieron en *A. flavus* un 68% fueron cepas L, 15,4% de cepas S y 16,5% de cepas no productoras de esclerocios, en suelos con cultivos de cacahuete; también con Pildain *et*

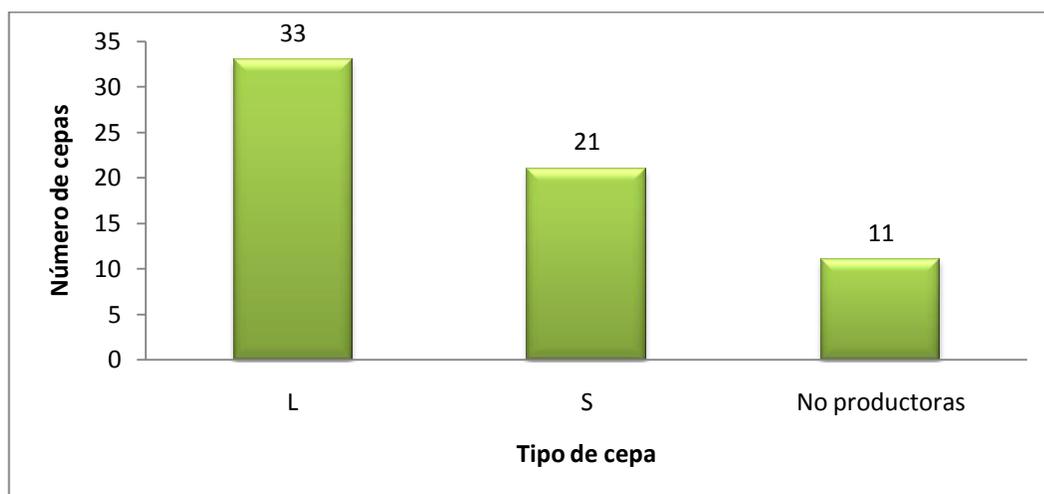
*al.*, (2005), donde el 72% produjo esclerocios; el 25% fue tipo S; el 46% del tipo L y el 29% no produjo esclerocios; y con Barros *et al.*, 2003, que encontraron 59% de cepas L; 22% cepas S y 19% cepas no productoras de esclerocios (Figura 3).



**Fig. 1:** Comparación de medias de tamaño de los esclerocios producidos en las cepas de *Aspergillus* aisladas de cada estado estudiado.



**Fig. 2.** Esclerocio S (1), esclerocio L (2), cepa altamente productora de esclerocios del estado de Chiapas (3) y cepa no productora de esclerocios (4).



**Fig. 3:** Cantidad de cepas productoras de esclerocios L, S y no productoras de esclerocios sobre un total de 65 aislamientos.

También los datos son similares a los obtenidos por Moreno (2004), donde de 18 muestras de maíz de granos almacenados analizadas, el 87.5% de las mismas produjo esclerocios del tipo L, con un diámetro promedio de  $675.2\mu$ , el 5.5%, esclerocios tipo S, con un diámetro de  $313\mu$  y el 11.11% de las cepas no produjo esclerocios y con lo obtenido por Pildain *et al.*, (2005), donde en cepas de *A. flavus* aisladas de cacahuete se obtuvieron de 188 aislados, el 46.8% de los mismos formó esclerocios tipo L, 25% del tipo S y 28.19% no formó esclerocios. También con Nesci & Etcheverry (2002), que obtuvieron un 100% de cepas productoras de esclerocios del tipo L. Oaxaca, Nuevo León, Nayarit y Jalisco fueron los 4 estados que presentaron cepas con esclerocios más grandes (L) y Tamaulipas y Michoacán, los dos estados con los esclerocios más pequeños (S), no obstante cabe destacar que en los estados citados también se presentaron cepas de ambos tipos y también cepas no productoras de esclerocios, y dentro de una misma caja se presentaron esclerocios (L) y (S).

**Presencia de aflatoxinas por TLC y aflatoxinas totales por inmunoafinidad:** En el 100% de las pruebas de TLC realizadas con las cepas aisladas se encontraron manchas fluorescentes azules, indicando la presencia de aflatoxinas B y el 4.61 % de las mismas, se presentaron también manchas fluorescentes verdes correspondientes a aflatoxinas G. Las cepas AF58 (Quintana Roo) productora de esclerocios S, AF59 y AF64 (Tamaulipas), no productoras de esclerocios, de *A. parasiticus* resultaron positivas a AFG. El 100% de los aislamientos del tipo L, produjo AFB, el 4.76% de los aislamientos S, produjo AFB y AFG al igual que el 18.18% de las cepas no productoras de esclerocios. En Tailandia, Australia, Benin y Argentina se han aislado cepas S productoras de aflatoxinas tipo B o productoras de ambos tipos de aflatoxinas (B y G) (Hesseltine et al., 1970; Saito *et al.*, 1986; Blaney *et al.*, 1989; Cotty y Cardwell, 1999; Vaamonde *et al.*, 2003), mientras que en Estados Unidos solamente han sido reportadas cepas S productoras de aflatoxinas B (Cotty & Cardwell, 1999; Horn & Dorner, 1999). En México, se han aislado cepas S y L, productoras de aflatoxinas B, en *A. flavus* y B y G en *A. parasiticus* (Moreno, 2004). No se pudo correlacionar la cantidad de aflatoxinas producidas con el crecimiento promedio de las colonias ni con el tamaño de los esclerocios producidos por las cepas, donde el coeficiente de Spearman resultó no significativo, esto no coincide con trabajos anteriores realizados por Barros *et al.*, (2005) y Pildain *et al.*, (2005) que indican que los esclerocios S producen aflatoxinas en mayor proporción que los L, en cacahuate en la Argentina. Sin embargo, se observaron diferencias significativas en cuando a la producción de aflatoxinas y número de esclerocios producidos. Sanchiz *et al.*, (1984), concluyeron tras el análisis de 137 cepas de *A. flavus* que Las cepas toxigénicas presentan una incidencia de esclerocios y

actividad proteolítica mayor que las no toxigénicas, pero en términos generales, las actividades medias de ambos grupos son semejantes, sin apenas diferencias significativas. La asociación positiva entre la producción de esclerocios y aflatoxinas fue observada por Wicklow & Shotwell (1983) quienes postularon que probablemente las aflatoxinas tiene una función correlacionada con los esclerocios y que la biosíntesis de las mismas y la morfogénesis de los esclerocios están interrelacionadas. Las zonas analizadas presentan condiciones macro y micro-climáticas diferentes. La historia del suelo, tipo de cultivos, niveles de insectos, precipitaciones, prácticas culturales también son diferentes y todos estos factores influyen sobre las comunidades de *A. flavus* y *A. parasiticus* tal como ha sido señalado por Orum *et al.*, (1997). Otro factor correlacionado con la divergencia entre comunidades de *A. flavus* y *A. parasiticus* en diferentes áreas es la latitud (Cotty, 1997); los estados analizados se encuentran a diferentes latitudes y dan otra posible causa de variabilidad (Pildain *et al.*, 2005). Los resultados de este estudio aportan nuevos datos sobre las comunidades de *A. flavus* y *A. parasiticus* en maíz en México, asociando el número y tamaño de los esclerocios producidos y la concentración de aflatoxinas de las cepas aisladas con las posibles diferencias agroecológicas de las diferentes áreas geográficas de las cuales provienen los aislamientos (Pildaín *et al.*, 2005). Se han considerado características de las cepas que están estrechamente relacionadas con la contaminación potencial del maíz con las toxinas producidas por esta especie fúngica asociada, tales como la capacidad toxigénica, el perfil de metabolitos secundarios tóxicos y la producción de estructuras de resistencia señaladas como importante fuente de inóculo primario.

## **Conclusiones**

Se determinó la presencia de *Aspergillus flavus* en los 14 estados de la República analizados y *Aspergillus parasiticus* en 2.

Del total estudiado 54 cepas produjeron esclerocios a los 10 días de crecimiento. El 100% de las cepas aisladas resultó toxigénica, un 96.92% presentó AFB y un 3.07% AFB y AFG. La producción de esclerocios y aflatoxinas esta positivamente correlacionada en lo que respecta al número de esclerocios, no así al tipo.

La importancia de determinar cepas productoras de esclerocios tipo S, L o no productoras se debe a que estas estructuras de resistencia presentan germinación esporogénica con lo cual un eventual control de la infección precosecha en el cultivo de maíz, donde las aflatoxinas son un problema requerirá prácticas agronómicas diseñadas a reducir la importancia de los esclerocios como fuente de inóculo primario.

## **Agradecimientos**

A la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno Mexicano, que por medio de una beca otorgada permitió la realización de la Maestría en Ciencias en Parasitología Agrícola de la Ing. Agr. Andrea Alejandra Arrúa Alvarenga.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y a la Unidad de Investigación en Granos Y Semillas de la UNAM, que financiaron esta investigación.

### Literatura citada

- Barros, G; Torres, A. ; Chulze, S. 2003. selección de *aspergillus* sección *flavi* como agentes de biocontrol de hongos aflatoxicogénicos en maní. INTA. Reuniones y Congresos: Resúmenes y trabajos presentados 14, 3p.
- Bayman, P.; Cotty, P. 1993. Genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. Canadian Journal of Botany 71: 23-31.
- Blaney, B. J.; Kelly, M. A.; Tyler, A.L.; Connole, M. D. 1989. Aflatoxin and cyclopiazonic acid Production by Queensland isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Australian Journal of Agricultural Reserch 40: 395-400.
- Cabañes, F.; Abarca, L.; Bragulat, M.; Catellá, G. 2007. Micotoxinas en Alimentos. Especies productoras de micotoxinas. Díaz de Santos. España. P 29-61. Coord. José Miguel Soriano del Castillo.
- Cotty, P. J. 1989. Virulence and cultural characteristics of two *Aspergillus flavus* strains pathogenic on cotton. Phytopathology 79: 808-814.
- Cotty, P. J. 1997. Aflatoxin - producing potential of communities of *Aspergillus* section *Flavi* from cotton producing areas in the United States. Mycological Research 101:698-704.
- Cotty, P. J.; Cardwell, K. F. 1999. Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. Applied and Environmental Microbiology 65: 2264-2266.
- Fernandez Pinto, V.; Patriarca, A.; Locani, O.; Vaamonde, G. 2001. Natural co-ocurrence of aflatoxin and cyclopiazonic acid in peanuts grown in Argentina. Food Additives and Contaminants 18: 1017-1020.

- Filtborg, O.; Frisvad, J. C. 1980. A simple screening method for toxigenic molds in pure cultures. *Lebensmittel - Wissenschaft + Technologie* 13: 128- 130.
- Filtborg, O.; Frisvad, J. C.; Svendsen, J. A. 1983. Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 45: 581-585.
- Geiser, D. M.; Pitt, J. I.; Taylor, J. W. 1998. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin producing fungus *Aspergillus flavus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 388-393.
- Geiser, D.M.; Dorner, J. W.; Horn, B. W.; Taylor, J. W. 2001. The Phylogenetics of Mycotoxin and Sclerotium Production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* 31, pp 169-179.
- Hernández, S.; Reyes, M.; García, J.; Mayek, N.; Reyes, C. 2007. Incidencia de hongos potencialmente toxígenos en maíz (*Zea mays* L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 25:127-133.
- Hesseltine, C. W.; Shotwell, O. T.; Smith, M.; Ellis, J.J.; Vandegrift, E.; Shannon, G. 1970. Production of various Aflatoxins by Strains of the *Aspergillus flavus* series. In *Proceedings of the First US-Japan Conference on Toxic Microorganisms*, p. 202-210 UJNR Joint Panels on Toxic Microorganisms and the US Department of the Interior, Washington, DC.
- Horn, B. W.; Greene, R. L. 1995. Vegetative compatibility within populations of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. tamarii* from a peanut field . *Mycologia* 87: 324-332.

- Horn, B. W.; Dorner, J. W. 1999. Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1444-1449.
- Ito, Y.; Peterson, W.; Wicklow, D.; Goto, T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. *Mycological Research* 105: 233-239.
- Klich, M. A.; Pitt, J. I. 1988. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society* 91: 99-108.
- Moreno, J. 2004. Estudio comparativo de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* en la producción de aflatoxinas bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura. Tesis inédita. UNAM. Facultad de Estudios Superiores de Postgrado. Cuautitlán Izcali, Edo. de México.
- Nesci, A.; Etcheverry M. 2002. *Aspergillus* section *Flavi* populations from field maize in Argentina. *Letters in Applied Microbiology* 34: 434-448.
- Orum, T. V.; Bigelow, D. M.; Nelson, M. R.; Howell, D. R.; Cotty, P. J. 1997. Spatial and temporal patterns of *Aspergillus flavus* strain composition and propagule density in Yuma County, Arizona soils. *Plant Disease* 81: 911-916.
- Ortiz M.P.; Barros G.; Ramírez M.L.; Torres A.; Chulze S. 2008. Poblaciones de *Aspergillus* sección flavi en suelo de formosa. efecto de un agente de biocontrol en los niveles de dichas poblaciones. INTA. Reuniones y Congresos: Resúmenes y trabajos presentados. Cabrera. Cordoba - Libro de Resúmenes. Jornada. XXIII Jornada Nacional del Maní. Colegio de Ingenieros Agronomos 21: 1-3.

- Peterson, S.; Ito, Y.; Horn, B.; Goto, T. 2001. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A. nomius*. *Mycologia* 93: 689-703.
- Pildain, M.; Cabral, D.; Vaamonde, G. 2005. Poblaciones de *Aspergillus flavus* en maní cultivado en diferentes zonas agroecológicas de la Argentina, caracterización morfológica y Toxigénica. *RIA*, 34 (3): 3-19.
- Pitt, J.I.; Hocking, A.D. 1997. *Fungi and food spoilage*. Academic Press, ed...Sydney, Australia: 593p.
- Raper, K.B.; Fennell, D.I. 1965. *The Genus Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins Company. Ed ..686 p.
- Rodrigues, P.; Soares, C.; Kozakiewicz, Z.; Paterson, R.; Lima, N.; Venâncio, A. 2007. Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Mendez-Vilas (Ed). 527-534.
- Saito, M.; Tsuruta, O.; Siriacha, P.; Kawasugi, S.; Manabe, M.; Buangsuwon, D. 1986. Distribution and aflatoxin productivity of the atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated from soils in Thailand. *Proceedings of the Japan Association of Mycotoxicology* 24: 41-46.
- Saito, M.; Tsuruta, O. 1993. A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand and its aflatoxin productivity. *Proceedings of the Japan Association of Mycotoxicology* 37:31-36.
- Sanchís, I.; Jiménez, M.; Hernández, E. 1984. Diferencias morfológicas y enzimáticas entre cepas de *Aspergillus flavus* productoras y no productoras de aflatoxinas. Anales de biología. Sección especial, 1: 109-114.

- Sepúlveda, C.; Piontelli, E. 2005. Poblaciones de *Aspergillus* en semillas de maíz y soja de importación argentina: énfasis en la sección flavi. *Boletín Micológico* 20: 41 - 55 2005.
- Tran-Dinh, N.; Pitt, J. I.; Carter, D. A. 1999. Molecular genotype analysis of natural toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A.parasiticus*. *Mycological Research* 103:1485-1490.
- Vaamonde, G.; Degrossi, C.; Comerio, R.; Fernández Pinto, V. 1995. *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* en maní cultivado en la provincia de Córdoba (Argentina): Características diferenciales y capacidad aflatoxicogénica. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 30:191-198.
- Vaamonde, G.; Patriarca, A.; Fernández Pinto, V.; Comerio, R.; Degrossi, C. 2003. Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *Flavi* from different substrates in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 2738: 1-6.
- Vicam Technologies. 1999. Aflatest instruction manual. Watertown, U.S.A. 96 p.
- Wicklowsky, D. T.; Shotwell, O. L. 1983. Intrafungal distribution of aflatoxins among conidia and sclerotia of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 1-5.

## CONCLUSIONES GENERALES

- Los hongos potencialmente toxigénicos, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium* y *Penicillium*, están ampliamente distribuidos en los 14 estados analizados. *Fusarium* se presentó en 76.99 % de las muestras analizadas, *Aspergillus flavus* en 11.72 %; *Aspergillus parasiticus*, en 0.57 % y *Penicillium* en 0.53 %. Por lo tanto, es necesario analizar muestras de grano a nivel de campo y almacén, para la detección de estos patógenos en todos los estados de la República.
- Se determinó la presencia de *Aspergillus flavus* en los 14 estados de la República analizados y *Aspergillus parasiticus* en 2. Del total estudiado 54 cepas produjeron esclerocios a los 10 días de crecimiento. El 100% de las cepas aisladas resultó toxigénica, un 96.92% presentó AFB y un 3.07% AFB y AFG. Las concentraciones de aflatoxinas variaron de 22 a 2250 ppb. El estado con una mayor producción de aflatoxinas en media fue Veracruz y el de menor producción de aflatoxinas en media, Zacatecas.
- La producción de esclerocios y aflatoxinas esta positivamente correlacionada en lo que respecta al número de esclerocios, no así al tipo. La importancia de determinar cepas productoras de esclerocios tipo S, L o no productoras se debe a que estas estructuras de resistencia presentan germinación esporogénica con lo

cual un eventual control de la infección precosecha en el cultivo de maíz, donde las aflatoxinas son un problema requerirá prácticas agronómicas diseñadas a reducir la importancia de los esclerocios como fuente de inóculo primario.

## APENDICE

**Tabla 1.** Producción de aflatoxinas totales y comportamiento de las cepas aisladas en medio diferenciales.

Cepa	Aflatoxinas totales	Media	Desv.	AFPA	ACY
AF01	2400			1*	1**
	2100	2250	212.132034	1	1
AF02	1220			1	1
	1240	1230	14.1421356	1	1
AF03	1800			1	1
	1700	1750	70.7106781	1	1
AF04	1280			1	1
	1220	1250	42.4264069	1	1
AF05	660			1	1
	820	740	113.137085	1	1
AF06	1300			1	1
	1300	1300	0	1	1
AF07	1160			1	1
	1100	1130	42.4264069	1	1
AF08	1220			1	1
	1080	1150	98.9949494	1	1
AF09	980			1	1
	440	710	381.837662	1	1
AF10	2000			1	1
	2000	2000	0	1	1
AF11	1160			1	1
	1300	1230	98.9949494	1	1
AF12	2000			1	1
	2400	2200	282.842712	1	1
AF13	1080			1	1
	1040	1060	28.2842712	1	1
AF14	1220			1	1
	1180	1200	28.2842712	1	1
AF15	1560			1	1
	1500	1530	42.4264069	1	1
AF16	200			1	1
	180	190	14.1421356	1	1
AF17	720			1	1
	700	710	14.1421356	1	1
AF18	1060			1	1
	1090	1075	21.2132034	1	1

Tabla 1. Cont.

Cepa	Aflatoxinas totales	Media	Desv.	AFPA	ACY
AF19	1120	1170	70.7106781	1	1
	1220			1	1
AF20	1080	1260	254.558441	1	1
	1440			1	1
AF21	2200	1920	395.979797	1	1
	1640			1	1
AF22	1280	1350	98.9949494	1	1
	1420			1	1
AF23	1120	1050	98.9949494	1	1
	980			1	1
AF24	1040	1020	28.2842712	1	1
	1000			1	1
AF25	1240	1230	14.1421356	1	1
	1220			1	1
AF26	1160	1150	14.1421356	1	1
	1140			1	1
AF27	1840	2020	254.558441	1	1
	2200			1	1
AF28	1860	1870	14.1421356	1	1
	1880			1	1
AF29	1700	1820	169.705627	1	1
	1940			1	1
AF30	1140	1170	42.4264069	1	1
	1200			1	1
AF31	1000	1060	84.8528137	1	1
	1120			1	1
AF32	1400	1280	169.705627	1	1
	1160			1	1
AF33	1100	1150	70.7106781	1	1
	1200			1	1
AF34	2200	2100	141.421356	1	1
	2000			1	1
AF35	1100	1070	42.4264069	1	1
	1040			1	1
AF36	1040	990	70.7106781	1	1
	940			1	1
AF37	1500	1420	113.137085	1	1
	1340			1	1

Tabla 1. Cont.

Cepa	Aflatoxinas totales	Media	Desv.	AFPA	ACY
AF38	1160	1200	56.5685425	1	1
	1240			1	1
AF39	1120	1140	28.2842712	1	1
	1160			1	1
AF40	1180	1210	42.4264069	1	1
	1240			1	1
AF41	1080	1090	14.1421356	1	1
	1100			1	1
AF42	1160	1140	28.2842712	1	1
	1120			1	1
AF43	1220	1160	84.8528137	1	1
	1100			1	1
AF44	1220	1260	56.5685425	1	1
	1300			1	1
AF45	960	830	183.847763	1	1
	700			1	1
AF46	1700	1660	56.5685425	1	1
	1620			1	1
AF47	1300	1280	28.2842712	1	1
	1260			1	1
AF48	1060	1090	42.4264069	1	1
	1120			1	1
AF49	1120	1110	14.1421356	1	1
	1100			1	1
AF50	2400	2300	141.421356	1	1
	2200			1	1
AF51	1800	1880	113.137085	1	1
	1960			1	1
AF52	16	22	8.48528137	1	1
	28			1	1
AF53	1440	1480	56.5685425	1	1
	1520			1	1
AF54	2000	1930	98.9949494	1	1
	1860			1	1
AF55	1740	1760	28.2842712	1	1
	1780			1	1
AF56	1340	1290	70.7106781	1	1
	1240			1	1

Tabla 1. Cont.

Cepa	Aflatoxinas totales	Media	Desv.	AFPA	ACY
AF57	1900			1	1
	1880	1890	14.1421356	1	1
AF58	1020			1	1
	1160	1090	98.9949494	1	1
AF59	1400			1	1
	1460	1430	42.4264069	1	1
AF60	1060			1	1
	1020	1040	28.2842712	1	1
AF61	1240			1	1
	1300	1270	42.4264069	1	1
AF62	980			1	1
	840	910	98.9949494	1	1
AF63	1880			1	1
	2040	1960	113.137085	1	1
AF64	54			1	1
	116	85	43.8406204	1	1
AF65	1700			1	1
	1800	1750	70.7106781	1	1

\* El valor de 1, en AFPA indica coloración naranja en el medio diferencial, resultado de la presencia de los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus*.

\*\* Indica la fluorescencia bajo luz UV del ACY, debido a la presencia de aflatoxinas.

Tabla 2. Resultados de TLC para cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* analizadas.

Cepa	AFB	AFB	AFG	AFG
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 1	Repetición 2
AF01	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF02	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF03	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF04	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF05	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF06	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF07	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF08	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF09	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF10	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF11	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF12	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

Tabla 2. Cont.

Cepa	AFB		AFG	
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 1	Repetición 2
AF13	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF14	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF15	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF16	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF17	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF18	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF19	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF20	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF21	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF22	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF23	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF24	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF25	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF26	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF27	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF28	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF29	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF30	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF31	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF32	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF33	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF34	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF35	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF36	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF37	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF28	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF29	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF30	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF31	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF32	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF33	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF34	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF35	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF36	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF37	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF38	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF39	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF40	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

Tabla 2. Cont.

Cepa	AFB		AFG	
	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 1	Repetición 2
AF41	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF42	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF43	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF44	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF45	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF46	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF47	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF48	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF49	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF50	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF51	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF52	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF53	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF54	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF55	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF56	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF57	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF58	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
AF59	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
AF60	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF61	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF62	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF63	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
AF64	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
AF65	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

**Tabla 3.** Características morfológicas y toxicológicas de las cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* aisladas.

Cepa	Genero	Sp.	Estado	Crec. de la colonia	Color de la colonia	Micelio	Forma de esclerocios	Número de esclerocios	Tamaño de esclerocios	Tipo	Monoser.	Biser.	AF
AF01	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y subglobosos	1±0.71	410±289.91	L	+	-	B
AF02	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y subglobosos	40±7.78	411±10.61	L	+	-	B
AF03	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y subglobosos	83±10.61	378± 47.38	S	+	+	B
AF04	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y subglobosos	22±12.73	424±31.82	L	+	+	B
AF05	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y subglobosos	20±10.61	411±2.12	L	+	+	B
AF06	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y subglobosos	11±3.54	450±48.79	L	+	+	B
AF07	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Coahuila	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y verticalmente elongados	18±17.68	439±4.24	L	+	+	B
AF08	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Nuevo León	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y verticalmente elongados	11±12.02	462±66.47	L	+	+	B
AF09	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Michoacán	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Sin esclerocios	0	0	0	+	-	B
AF10	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Michoacán	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y verticalmente elongados	1±0.71	400±283	L	+	+	B
AF11	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Michoacán	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Sin esclerocios	0	0	0	+	+	B
AF12	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Michoacán	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Sin esclerocios	0	0	0	+	-	B
AF13	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Michoacán	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Alargados	12±1.41	176±2.12	S	+	+	B
AF14	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Michoacán	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Sin esclerocios	0	0	0	+	+	B
AF15	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Zacatecas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Alargados y semiesféricos	63±12.73	501±17.68	L	+	+	B

**Tabla 3. Cont.**

Cepa	Genero	Sp.	Estado	Crec. de la colonia	Color de la colonia	Micelio	Forma de esclerocios	Número de esclerocios	Tamaño de esclerocios	Tipo	Monoser.	Biser.	AF
AF16	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Zacatecas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y semialargados	51±43.84	428±5.66	L	+	-	B
AF17	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Zacatecas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y subglobosos	1092±203.65	248±29.7	S	+	-	B
AF18	<i>Asperigilus</i>	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y zonada	Verde amarillo brillante	Aéreo y abundante	Globosos	2±0.71	462±16.97	L	+	-	B
AF19	<i>Asperigilus</i>	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y subglobosos	200±2.12	349±2.83	S	+	+	B
AF20	<i>Asperigilus</i>	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y subglobosos	197±1.41	341±1.41	S	-	+	B
AF21	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y abundante	Globosos y subglobosos	143±32.53	481±27.58	L	+	-	B
AF22	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y subglobosos	29±9.19	456±21.73	L	+	-	B
AF23	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos y subglobosos	62±16.97	435±16.26	L	+	-	B
AF24	<i>Asperigilus</i>	<i>flavus</i>	Jalisco	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y elongados verticalmente	8±5.66	424±30.76	L	+	+	B
AF25	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Oaxaca	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos	20±2.83	534±1.77	L	+	-	B
AF26	<i>Asperigilus</i>	<i>flavus</i>	Oaxaca	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y elongados verticalmente	15±1.41	463±35.71	L	-	+	B
AF27	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Oaxaca	Radial y flocosa	Verde amarillo	Escaso y superficial	Globosos y subglobosos	30±3.54	453±8.49	L	+	+	B
AF28	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Oaxaca	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y superficial	Globosos y subglobosos	166±17.68	536±919	L	-	1	B
AF29	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Oaxaca	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Superficial y abundante	Globosos y subglobosos	161±28	426±3.54	L	+	+	B

**Tabla 3. Cont.**

Cepa	Genero	Sp.	Estado	Crec. de la colonia	Color de la colonia	Micelio	Forma de esclerocios	Número de esclerocios	Tamaño de esclerocios	Tipo	Monoser.	Biser.	AF
AF30	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Oaxaca	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Superficial y escaso	Globosos y alargados	119±26.16	385±9.19	S	+	+	B
AF31	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Nayarit	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Superficial y abundante	Globosos y subglobosos	19±4.24	478±11.31	L	+	-	B
AF32	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Nayarit	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Superficial y abundante	Sin esclerocios	0	0	0	-	+	B
AF33	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Abundante y profundo	Globosos	13±9.90	426±13.67	L	-	+	B
AF34	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y superficial	Globosos y subglobosos	163±123.74	423±28.28	L	+	+	B
AF35	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y superficial	Globosos y subglobosos	3±3.54	378±199.97	L	-	+	B
AF36	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Superficial y escaso	Globosos y subglobosos	2±2.83	368±192.30	S	+	-	B
AF37	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y subglobosos	29±12.37	298±5.66	S	+	+	B
AF38	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y verticalmente elongados	3±0.00	425±35.36	L	+	-	B
AF39	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y abundante	Globosos y subglobosos	5±4.95	465±5.36	L	+	+	B
AF40	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y subglobosos	4±5.66	430±46.29	L	+	+	B
AF41	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y subglobosos	6±5.66	446±29.70	L	+	+	B
AF42	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Hidalgo	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Sin esclerocios	0	0	0	+	+	B
AF43	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Guanajuato	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos	14±12.02	364±14.14	S	+	-	B
AF44	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Guanajuato	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos y elongados	2±.12	500±242.67	L	+	+	B

**Tabla 3. Cont.**

Cepa	Genero	Sp.	Estado	Crec. de la colonia	Color de la colonia	Micelio	Forma de esclerocios	Número de esclerocios	Tamaño de esclerocios	Tipo	Monoser.	Biser.	AF
AF45	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Guanajuato	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos	3960±101.82	218±20.51	S	+	-	B
AF46	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Sonora	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Oblongos y subglobosos alargados	34±8.49	495±12.73	L	+	-	B
AF47	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Sonora	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y subglobosos	1732±130.11	217±13.44	S	+	+	B
AF48	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Sonora	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Globosos	Profundo y escaso	5±4.50	215±21.31	S	+	-	B
AF49	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Chiapas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos	1±1.41	410±1.00	L	+	+	B
AF50	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Chiapas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Abundante y superficial	Globosos y subglobosos	43±6.36	331±17.68	S	+	+	B
AF51	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Chiapas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Profundo y escaso	Globosos y subglobosos	1823±149.20	312±24.04	S	-	+	B
AF52	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Chiapas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos	86±10.61	266±.66	S	+	+	B
AF53	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Chiapas	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Globosos	19279±1245.92	211±24.75	S	+	+	B
AF54	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Veracruz	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Aéreo y escaso	Subglobosos y elongados	36±10.61	472±18.38	L	+	-	B
AF55	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Veracruz	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Abundante y superficial	Globosos y subglobosos	69±26.87	285±24.75	L	+	+	B
AF56	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Veracruz	Radial y flocosa	Verde amarillo brillante	Escaso y profundo	Globosos	19980±190.21	171±8.49	L	+	+	B
AF57	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Veracruz	Radial y flocosa	Profundo y escaso	Verde amarillo brillante	Globosos	7027±292.74	289±19.66	S	+	-	B
AF58	<i>Aspergillus</i>	<i>parasiticus</i>	Quintana Roo	Radial y flocosa	Aéreo y escaso	Verde	Globosos	877±157.68	370±7.78	S	+	-	B G
AF59	<i>Aspergillus</i>	<i>parasiticus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y abundante	Verde	0	0	0	0	+	-	B G

**Tabla 3. Cont.**

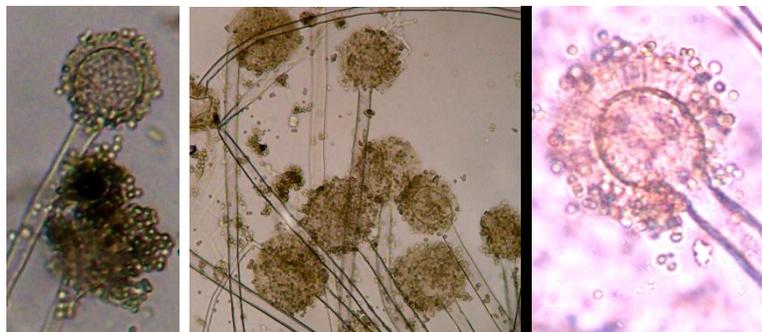
Cepa	Genero	Sp.	Estado	Crec. de la colonia	Color de la colonia	Micelio	Forma de esclerocios	Número de esclerocios	Tamaño de esclerocios	Tipo	Monoser.	Biser.	AF
AF60	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y abundante	Verde amarillo	0	0	0	0	+	+	B
AF61	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y abundante	Verde amarillo brillante	0	0	0	0	+	+	B
AF62	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y escaso	Verde amarillo brillante	Globosos	21±2.83	486±2.83	L	+	+	B
AF63	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y escaso	Verde amarillo brillante	Globosos	29±15.56	421±21.21	L	+	+	B
AF64	<i>Asperigilus</i>	<i>parasiticus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y abundante	Verde	0	0	0	0	+	0	B G
AF65	<i>Aspergillus</i>	<i>flavus</i>	Tamaulipas	Radial y flocosa	Aéreo y abundante	Verde amarillo brillante	0	0	0	0	0	0	B



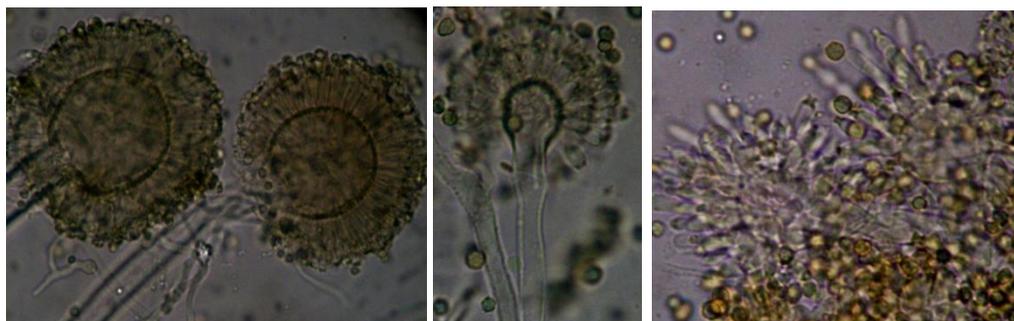
**Figura 1.** Maíces colectados a campo de los estados de Zacatecas, Nuevo León, Coahuila y Michoacán.



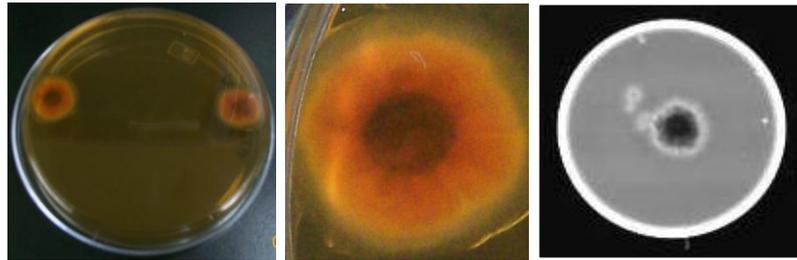
**Figura 2.** Micobiotas de los estados de Oaxaca, Jalisco, Guanajuato.



**Figura 3.** Cabezuelas monoseriadas de *A. parasiticus*.



**Figura 4.** Cabezuelas, izquierda monoseriada, centro y derecha, biseriadas de *A. flavus*.



**Figura 5.** Coloración naranja, indicativa de la presencia de *A. flavus* y *A. parasiticus* en AFPA y fluorescencia en ACY, indicando presencia de aflatoxinas.



**Figura 6.** Características de micelio de cepas de *A. flavus* aisladas a la izquierda, profundo y escaso, al centro, superficial y escaso y a la derecha, superficial y abundante.