



11661

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

**ESTUDIO COMPARATIVO DE *Aspergillus flavus* Link  
Y *Aspergillus parasiticus* Speare EN LA PRODUCCIÓN  
DE AFLATOXINAS BAJO DIFERENTES  
CONDICIONES DE HUMEDAD Y TEMPERATURA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN MICROBIOLOGÍA**

**P R E S E N T A :**

**BIOL. JOSEFINA MORENO LARA**

ASESOR: DR. ERNESTO MORENO MARTÍNEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

2004

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## JURADO ASIGNADO

Presidente: **DR. RENE ROSILES MARTINEZ**

Vocal: **M. en C. ERNESTO AVILA GONZALEZ**

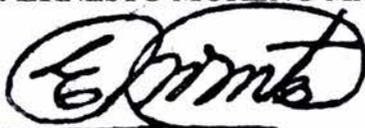
Secretario: **DR. FRANCISCO JAVIER PLASCENCIA DE LA PARRA**

1er. suplente: **DR. TONATIUH CRUZ SANCHEZ**

2do. Suplente: **DR. ERNESTO MORENO MARTINEZ**

Sitio donde se desarrolló el tema:  
Unidad de Investigación en Granos y Semillas. Facultad de Estudios Superiores  
Cuautitlán-UNAM.

Nombre y firma del asesor  
**DR. ERNESTO MORENO MARTÍNEZ**



---

Nombre y firma del sustentante:  
**JOSEFINA MORENO LARA**



---

## **DEDICATORIA**

GRACIAS A DIOS, POR SER MI CREADOR, POR ESTAR PRESENTE EN CADA INSTANTE DE MI VIDA Y POR TODAS LAS BENDICIONES QUE ME HA DADO.

A MIS PADRES POR TODO EL AMOR QUE ME HAN BRINDADO SIEMPRE, POR SUS CONSEJOS, POR GUARME EN EL CAMINO DE LA VIDA Y APOYARME PARA LOGRAR MIS ANHELOS. GRACIAS POR TODO.

A MIS HERMANOS GABY, ARTURO Y ERE, QUE SON MIS MAS GRANDES AMIGOS Y COMPAÑEROS, POR COMPARTIR TANTOS MOMENTOS DE FELICIDAD Y POR TODO SU APOYO.

A MIS SOBRINOS YAMELITO, ANGEL ARTURO Y MARY JOSE POR LLEGAR EN EL MOMENTO PRECISO PARA ILUMINAR MI VIDA.

A MI ABUELITA POR TODO SU CARIÑO.

A MARTHA YOLANDA POR SER MI MEJOR AMIGA Y HERMANA , GRACIAS POR ESTAR SIEMPRE EN LOS BUENOS Y MALOS MOMENTOS.

A MI TIO FILO Y MI TIA OFE POR ABRIRME LAS PUERTAS DE SU CASA Y APOYARME.

A MIS AMIGOS DE UNIGRAS: CRISTI, CARO, GABY, LAURITA, SOCO, DR. ERNESTO, DR. SERGIO, JUAN CARLOS, ENRIQUE, RAY, GUSTAVO Y CARLOS POR TODA SU AYUDA.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Ernesto Moreno Martínez, Jefe de la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) FESC - UNAM, por la dirección de la tesis, así como por su valiosa revisión y corrección de la presente tesis.

A los tutores Dr. Fco. Javier Plascencia de la Parra, Ernesto Ávila González, Rene Rosiles Martínez, Dr. Blas Lotina H., por su orientación y evaluación en los avances de tesis durante los seminarios.

A la M. en C. Ma. Cristina Pérez Reyes por su capacitación y adiestramiento en la identificación de hongos, medios de cultivo, en el análisis de cromatografía y por sus valiosos consejos durante todo el desarrollo del presente trabajo.

Agradezco al Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo y al Dr. Eduardo Castaño Tostado por su valiosa ayuda en el análisis estadístico del presente trabajo.

A la M. en C. Martha Yolanda Quezada Viay, a la M. en C. Carolina Moreno Ramos y al C. Dr. J. Abraham Méndez Albores por su apoyo para la determinación de aflatoxinas.

Toda la parte experimental se llevó acabo en el laboratorio de la Unidad de Investigación en Granos y semillas de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM.

A todo el personal que labora en la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) de la UNAM, por su ayuda durante la fase experimental del presente estudio.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - UNAM, mi Alma Mater, donde logre mi formación profesional como M. en C.

## INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAGINAS
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE FOTOS	xi
RESUMEN	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
1. <i>Aspergillus flavus</i> L. y <i>Aspergillus parasiticus</i> S.	4
2. Aflatoxinas	5
3. Biosíntesis de las aflatoxinas	8
4. Factores biológicos	10
4.1. Variabilidad de la cepa	10
4.2. Competencia con la micobiota	10
4.3. Cantidad de inóculo	11
5. Factores químicos	11
5.1. Sustrato y nutrientes	11
5.2. Agentes antifúngicos	13
6. Factores ambientales	14
6.1. Temperatura	14
6.2. Actividad de agua (aw)	14
6.3. Los gases atmosféricos	15
6.4. Luz	16
6.5. pH	16
7. Efecto de las aflatoxinas	17
7.1. Efectos bioquímicos	18
7.1.1. Energía del metabolismo	18
7.1.2. Metabolismo de los carbohidratos y lípidos	18
7.1.3. Metabolismo de los ácidos nucleicos y proteínas	18
7.2. Efectos biológicos	19
7.2.1. Toxicidad	19

7.2.2. Citotoxicidad	19
7.2.3. Efectos inmunosupresores	20
7.2.4. Carcinogénesis	20
7.2.5. Mutagénesis	20
7.2.6. Teratogenicidad	21
8. Biotransformación biológica de las aflatoxinas	22
9. Biocontrol	23
10. La producción de aflatoxinas en maíz	24
10.1. Prevención de la contaminación de maíz con aflatoxinas en el campo	25
10.2. Control durante la cosecha	26
10.3. Control después de la cosecha y descontaminación	27
11. Descontaminación de aflatoxinas	27
11.1. Tratamientos químicos	28
11.1.1. Cal	28
11.1.2. Amoníaco	28
11.1.3. Peroxido de hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	28
11.1.4. Peroxidasa	29
11.1.5. Hipoclorito de sodio	29
11.1.6. Ozono	29
11.1.7. Otros químicos	30
11.2. Tratamientos físicos	30
11.2.1. Temperatura	30
11.2.2. Radiaciones	30
11.2.3. Atmósferas modificadas	31
11.2.4. Adsorción	31
12. Métodos para detectar aflatoxinas en maíz	32
12.1. La luz negra	32
12.2. Cromatografía de capa fina (TLC)	32
12.3. Kits de pruebas rápidas	32
12.4. Cromatografía líquida (HPLC)	33

12.5. Inmunofinidad en columna con anticuerpos monoclonales	33
13. Legislación internacional	34
JUSTIFICACION	37
III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	38
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS ESPECIFICOS	38
HIPÓTESIS	39
DIAGRAMA DE TRABAJO	40
IV. MATERIALES Y METODOS	41
1. Aislamiento e identificación de cepas de <i>Aspergillus flavus</i> Link y <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	
1.1. Cepas de <i>A. flavus</i> Link y <i>A. parasiticus</i> Speare	41
1.2. Identificación y características morfológicas de cada cepa aislada	41
2. Cultivo de las cepas de <i>Aspergillus flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S. en medio líquido de arroz y maíz, para caracterizar las cepas en función de la producción de aflatoxinas	42
2.1. Suspensión de esporas para inocular en medio líquido con harina arroz	42
2.2. Medio líquido para la producción de aflatoxinas	42
2.3. Cuantificación de la producción de aflatoxinas en medio líquido de arroz, de cada cepa de las dos especies de <i>Aspergillus</i>	43
3. Producción de aflatoxinas por las diferentes cepas de <i>Aspergillus flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S. en medio sólido (grano de maíz)	43
3.1. Maíz	43
3.2. Contenido de humedad del maíz	44
3.3. Suspensión de esporas para inocular el medio sólido (grano de maíz)	44
3.4. Inoculación del grano de maíz con las cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S., para la producción de aflatoxinas	44

3.5. Prueba de germinación en maíz	45
3.6. Determinación de aflatoxinas totales en grano de maíz	45
3.7. Determinación de aflatoxinas totales realizando dilución	46
3.8. Cromatografía en capa fina (TLC) para determinar las aflatoxinas	47
3.9. Análisis estadístico	47
4. Producción de aflatoxinas en grano de maíz con diferentes contenidos de humedad	48
4.1. Maíz	48
4.2. Contenido de humedad del maíz	48
4.3. Suspensión de esporas, para inocular el grano de maíz	49
4.4. Almacenamiento del maíz inoculado con tres cepas de <i>A. flavus</i> Link y tres cepas de <i>A. parasiticus</i> Speare con diferente capacidad para producir aflatoxinas	49
4.6. Prueba de germinación en maíz	50
4.7. Determinación de aflatoxinas totales	50
4.8. Determinación de aflatoxinas totales realizando dilución	50
4.9. Análisis estadístico	50
5. Producción de aflatoxinas en maíz a diferentes temperaturas de almacenamiento	51
5.1. Maíz	51
5.2. Contenido de humedad del maíz	51
5.3. Suspensión de esporas, para inocular el grano de maíz	52
5.4. Almacenamiento del maíz a temperaturas de 20, 27 y 34 °C e inoculado con cepas de las dos especies de <i>Aspergillus</i> en estudio, con diferente capacidad de producción de aflatoxinas	52
5.5. Prueba de germinación del maíz inoculado con cepas de <i>Aspergillus</i> con diferente capacidad productora de aflatoxinas	53
5.6. Determinación de aflatoxinas totales	53
5.7. Determinación de aflatoxinas totales realizando dilución	53

<b>5.8. Análisis estadístico</b>	<b>53</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>55</b>
<b>1. Morfología de las cepas de <i>Aspergillus flavus</i> Link , en estudio</b>	<b>55</b>
<b>2. Características morfológicas de <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare</b>	<b>60</b>
<b>3. Producción de aflatoxinas en medio líquido de arroz y en medio sólido (granos de maíz) de las 30 cepas de <i>Aspergillus flavus</i> Link y 7 cepas de <i>A. parasiticus</i> Speare y su efecto en la germinación del maíz.</b>	<b>70</b>
<b>3.1. Comparación de Medias</b>	<b>70</b>
<b>3.2. Producción de aflatoxinas en medio líquido con arroz</b>	<b>71</b>
<b>3.3. Producción de aflatoxinas en granos de maíz</b>	<b>73</b>
<b>3.4. Efecto de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S. en la germinación del maíz con un contenido de humedad de 18 %.</b>	<b>73</b>
<b>3.5. Contenido de humedad</b>	<b>78</b>
<b>4. Tipos de aflatoxinas que produce cada cepa</b>	<b>78</b>
<b>5. Efecto de las cepas de <i>Aspergillus flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S. en el maíz almacenado en tres contenidos de humedad y la producción de aflatoxinas y germinación</b>	<b>80</b>
<b>5.1. Producción de Aflatoxinas</b>	<b>80</b>
<b>5.2. Comparación de Medias</b>	<b>80</b>
<b>5.3. Germinación de los granos de Maíz</b>	<b>85</b>
<b>5.4. Comparación de Medias de la germinación</b>	<b>87</b>
<b>5.5. Contenido de humedad de los granos de maíz</b>	<b>90</b>
<b>5.6. Comparación de medias del contenido de humedad de los granos de maíz</b>	<b>94</b>
<b>6. Efecto del maíz inoculado con cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>parasiticus</i> S. almacenado en tres temperaturas en la producción de aflatoxinas y la germinación de los granos de maíz</b>	<b>98</b>
<b>6.1. Producción de aflatoxinas</b>	<b>98</b>
<b>6.2. Comparación de Medias</b>	<b>98</b>

<b>6.3. Germinación de los granos de maíz</b>	<b>104</b>
<b>6.4. Contenido de humedad</b>	<b>111</b>
<b>6.5. Comparación de Medias</b>	<b>111</b>
<b>VI. DISCUSIÓN</b>	<b>112</b>
<b>VII. CONCLUSIÓN</b>	<b>128</b>
<b>VIII. LITERATURA CITADA</b>	<b>130</b>
<b>APENDICE</b>	<b>143</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>146</b>

## INDICE DE CUADROS

CUADROS	Pág.
2.1. Principales propiedades físico-químicas de las aflatoxinas	7
5.1. Porcentaje de los diferentes hongos que estaban presentes en las muestras analizadas de donde se aislaron las cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S.	57
5.2. Características morfológicas de las 30 cepas de <i>Aspergillus flavus</i> Link, aisladas de diferentes sustratos y cultivadas durante 10 días en medio Czapek, a 27°C.	59
5.3. Características morfológicas de 7 cepas de <i>Aspergillus parasiticus</i> Speare aisladas de diferentes sustratos y cultivadas durante 10 días en medio de Czapek a 27°C.	67
5.4. Comparación de medias de la producción de aflatoxinas en medio líquido inoculado con cepas de <i>A. flavus</i> Link, incubadas a 27°C durante 7 días.	72
5.5. Comparación de medias de la producción de aflatoxinas en medio líquido inoculado con cepas de <i>A. parasiticus</i> Speare, incubadas a 27°C durante 7 días.	72
5.6. Comparación de medias de las variables evaluadas en los granos de maíz inoculado con cepas de <i>A. flavus</i> Link, , incubadas a 27°C durante 30 días.	74
5.7. Comparación de medias de las variables evaluadas en los granos de maíz inoculados con cepas de <i>A. parasiticus</i> Speare, , incubadas a 27°C durante 30 días.	75
5.8. Tipos de aflatoxinas producidas por cada una de las cepas de <i>A. flavus</i> L. y de <i>Aspergillus parasiticus</i> S. , identificadas por cromatografía de capa fina (TLC) en 20 µl del extracto.	79
5.9. Comparación de medias en la producción de aflatoxinas (ppb) en los granos de maíz inoculado con cepas <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S. almacenado con tres contenidos de humedad durante 30, 60 y 90 días.	81
5.10. Comparación de medias en la producción de aflatoxinas (ppb) en Maíz inoculado con cepas de <i>A. flavus</i> L y <i>A. parasiticus</i> S. bajo tres contenidos de humedad y almacenado durante 30, 60 y 90 días.	82
5.11. Comparación de medias de la interacción cepas x contenido de humedad en la producción de aflatoxinas en granos de maíz inoculados con tres cepas de <i>A. flavus</i> L. (25, 35, 37) y 3 cepas de <i>A. parasiticus</i> S. (36, 24, 26), almacenados durante 30 días a 27°C y en tres contenidos de humedad.	83
5.12. Comparación de medias de la interacción cepas x contenido de humedad en la producción de aflatoxinas en granos de maíz inoculados con tres cepas de <i>A. flavus</i> L. (25, 35, 37) y 3 cepas de <i>A. parasiticus</i> S. (36, 24, 26), almacenados durante 60 días a 27°C y en tres contenidos de humedad.	84

5.13.	Comparación de medias de la interacción cepas x contenido de humedad en la producción de aflatoxinas en los granos de maíz inoculados con cepas 3 De <i>A. flavus</i> L. (25, 35, 37) y 3 cepas de <i>A. parasiticus</i> S. (36, 24, 26), almacenados durante 90 días, a 27°C y en tres contenidos de humedad.	85
5.14.	Comparación de medias en la germinación de los granos de maíz inoculado con cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S., almacenado bajo tres contenidos de humedad durante 30, 60 y 90 días.	87
5.15.	Comparación de medias en la germinación de los granos de maíz inoculado con cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S. almacenado durante 90 días y diferentes contenidos de humedad.	88
5.16.	Comparación de medias del contenido de humedad (%) de los granos de maíz inoculado con cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S., almacenados durante 30, 60 y 90 días.	94
5.17.	Comparación de medias del contenido de humedad de los granos de maíz inoculado con cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S., almacenados en tres contenidos de humedad durante 30, 60 y 90 días.	95
5.18.	Comparación de medias del contenido de humedad de los granos de maíz inoculados con cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S. almacenados con tres contenido de humedad durante 30 días a 27°C.	95
5.19.	Comparación de medias del contenido de humedad de los granos de maíz inoculados con cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S. almacenados con tres contenido de humedad durante 60 días a 27°C.	96
5.20.	Comparación de medias del contenido de humedad de los granos de maíz inoculados con cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S. almacenados con tres contenidos de humedad durante 90 días a 27°C.	97
5.21.	Comparación de medias en la producción de aflatoxinas (ppb) en los granos de maíz inoculados con cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S., almacenados a 17% de humedad por 8, 16 y 24 días.	99
5.22.	Comparación de medias de la producción de aflatoxinas (ppb) en maíz inoculado con cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S., almacenado a 17% de humedad y en tres temperaturas durante 8, 16 y 24 días.	100
5.23.	Comparación de medias de la producción de aflatoxinas en maíz inoculado con cepas de <i>A. flavus</i> L. (25, 35, 37) y <i>A. parasiticus</i> S. (36, 24, 26), incubado a 20, 27 y 34°C, durante 8 días.	100
5.24.	Comparación de medias de la producción de aflatoxinas en maíz inoculado con Cepas de <i>A. flavus</i> L. (25, 35, 37) y <i>A. parasiticus</i> S. (36, 24, 26) incubado a 20, 27 y 34°C, durante 16 días.	101
5.25.	Comparación de medias de la producción de aflatoxinas en maíz inoculado con cepas de <i>A. flavus</i> L. (25, 35, 37) y <i>A. parasiticus</i> S. (36, 24, 26), incubado a 20, 27 y 34°C, durante 24 días.	102

5.26.	Comparación de medias del porcentaje de germinación de los granos de maíz inoculados con cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S., almacenados durante 8, 16 y 24 días con tres contenidos de humedad.	104
5.27.	Comparación de medias del porcentaje de germinación de los granos de maíz inoculados con cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S., almacenados durante 8, 16 y 24 días, en tres contenidos de humedad.	106
5.28.	Comparación de medias de la humedad (%) de los granos de Maíz inoculados con cepas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S., almacenados durante 8, 16 y 24 días, en un contenidos de humedad de 17% aproximadamente.	111
6.1.	Producción de aflatoxinas de <i>A. flavus</i> L. y <i>A. parasiticus</i> S. en diferentes temperaturas y sustratos en trabajos realizados por otros autores.	127

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
2.1. Estructuras morfológicas de <i>Aspergillus flavus</i>	5
2.2. Estructura molecular de las aflatoxinas	7
2.3. Vía biosintética de las aflatoxinas	9
5.1. Producción de aflatoxinas (ppb) de cada una de las cepas de <i>A. flavus</i> Link en medio de cultivo líquido con arroz incubadas a 27°C durante 7 días y en medio sólido (granos de maíz) incubadas a 27°C por 30 días.	76
5.2. Producción de aflatoxinas (ppb) de cada una de las cepas de <i>A. parasiticus</i> Speare en medio de cultivo líquido con arroz incubadas a 27°C durante 7 días y en medio sólido (granos de maíz) incubadas a 27°C por 30 días.	77
5.3. Producción de aflatoxinas de 3 cepas de <i>A. flavus</i> L y 3 cepas de <i>A. parasiticus</i> S en grano de maíz en las humedades 15.5, 16 y 17 %, incubadas a 27°C, durante 0, 30, 60 y 90 días	86
5.4. Comparación de medias de la germinación de los granos de maíz con tres contenidos de humedad inoculados con cepas de <i>A. flavus</i> L. (25, 35, 37) y <i>A. parasiticus</i> S. (36, 24, 26), almacenados durante 30 días.	91
5.5. Comparación de medias de la germinación de los granos de maíz con tres contenidos de humedad inoculados con cepas de <i>A. flavus</i> L. (25, 35, 37) y <i>A. parasiticus</i> S. (36, 24, 26), almacenados durante 60 días.	92
5.6. Comparación de medias de la germinación de los granos de maíz con tres contenidos de humedad inoculados con cepas de <i>A. flavus</i> L. (25, 35, 37) y <i>A. parasiticus</i> S. (36, 24, 26), almacenados 90 días.	93
5.7. Producción de aflatoxinas de 3 cepas de <i>A. flavus</i> L y 3 cepas de <i>A. parasiticus</i> S en grano de maíz en las humedades 15.5, 16 y 17 %, incubadas a 27°C, durante 0, 30, 60 y 90 días.	103
5.8. Comparación de medias del porcentaje de germinación de los granos de maíz inoculados con cepas de <i>A. flavus</i> L. (25, 35, 37) y <i>A. parasiticus</i> S. (36, 24, 26), almacenados en tres temperaturas durante 8 días.	108
5.9. Comparación de medias del porcentaje de germinación de los granos de Maíz inoculados con cepas de <i>A. flavus</i> L. (25, 35, 37) y <i>A. parasiticus</i> S. almacenados en tres temperaturas durante 16 días.	109
5.10. Comparación de medias del porcentaje de germinación de los granos de maíz inoculados con cepas de <i>A. flavus</i> L. (25, 35, 37) y <i>A. parasiticus</i> S. (36, 24, 26), almacenados en tres temperaturas durante 24 días.	110

## INDICE DE FOTOS

No.	OBJETIVO DEL MICROSCOPIO A	PAGINA
1	Crecimiento de la colonia radial y de color verde-amarillo de <i>A. flavus</i> L.	63
2	Cabezuelas y esclerocios de la cepa 1 de <i>A. flavus</i> L.	10x 63
3	Cabezuelas maduras e inmaduras de la cepa 1 de <i>A. flavus</i> L.	10x 63
4	Esclerocios de la cepa 8 de <i>A. flavus</i> L.	10x 64
5	Cabezuela biseriada de la cepa 28 de <i>A. flavus</i> L.	100x 64
6	Cabezuela biseriada y monoseriada de la cepa 18 de <i>A. flavus</i> L.	40x 64
7	Cabezuela biseriada y monoseriada de la cepa 18 de <i>A. flavus</i> L.	100x 64
8	Cabezuela biseriada de la cepa 25 de <i>A. flavus</i> L.	100x 65
9	Cabezuelas de la cepa 25 de <i>A. flavus</i> L.	20x 65
10	Conidios de la cepa 28 de <i>A. flavus</i> L.	100x 65
11	Crecimiento radial de la colonia de color verde seco de <i>A. parasiticus</i> S.	68
12	Cabezuelas de la cepa 24 de <i>A. parasiticus</i> S.	10x 68
13	Cabezuelas de la cepa 33 de <i>A. parasiticus</i> S.	20x 69
14	Cabezuela monoseriada de la cepa de <i>A. parasiticus</i> S.	100x 69
15	Conidios de la cepa 23 de <i>A. parasiticus</i> S.	100X 69

## RESUMEN

**Josefina Moreno Lara :Estudio comparativo de *Aspergillus flavus* link y *Aspergillus parasiticus* Speare en la producción de aflatoxinas bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura. (Bajo la asesoría del Dr. Ernesto Moreno Martínez).**

De diferentes muestras de productos comerciales analizadas (cacahuete, pistache, nuez, cebada, coco, chile y maíz) se aislaron 31 cepas de *A. flavus* L. y 7 cepas de *A. parasiticus* S. Para identificar y diferenciar cada cepa se estudiaron las características morfológicas principales: el crecimiento de la colonia, el tipo de micelio, tamaño de la colonia, la presencia y la forma de los esclerocios, la forma de las cabezuelas y el tamaño de los conidios, para su estudios estas cepas se desarrollaron en medio de cultivo Czapek (Raper y Fenell, 1965).

Con el fin de conocer si las cepas eran productoras o no productoras de aflatoxinas, cada una de las cepas aisladas, tanto de *A. flavus* L., como *A. parasiticus* S. se inocularon en medio líquido de arroz y se incubaron a 27°C durante 7 días. La cuantificación total de aflatoxinas, se determinó por el método 991.31 del AOAC utilizando el método AflaTest DE VICAM.

La cepa con mayor producción de aflatoxinas fue la 25 de *A. flavus* L. con 5033.3 ppb y en las cepas que no hubo producción de aflatoxinas fueron la 3,10, 13, 17, 20, 27, 30, 33 y 37 de *A. flavus* L., y en la especie de *A. parasiticus* S. la cepa mas productora de aflatoxinas fue la 36 con 2000 ppb y las cepas 22, 23, 26 y 29 de *A. parasiticus* S. no produjeron aflatoxinas.

Unidades experimentales de los granos de maíz AS-900, se inocularon igualmente con las cepas de ambas especies. La humedad del grano se ajustó a 18% y se almacenó durante 30 días a 27°C. La producción de aflatoxinas se determinó por el método AflaTest antes mencionado. En grano de maíz, las cepas con mayor producción fueron la cepa 28 de *A. flavus* Link con 7667 ppb y la cepa 19 de *Aspergillus parasiticus* S. con 2650 ppb. Las cepas que no produjeron aflatoxinas son las mismas que en medio líquido, excepto la cepa 27 de *A. flavus* L. que produjo 1 ppb.

Se evaluó la germinación del grano de maíz inoculado con las diferentes cepas en estudios y se observó que la cepa 35 de *A. flavus* L. fue la que mas afectó la germinación, disminuyendo hasta 7% y el grano de maíz menos afectado fue el del testigo que no fue inoculado, con una germinación de 61%. Por TLC se determinó que tipo de aflatoxina era la mas común en estas condiciones de incubación; La AFB1 fue la más común, seguida de la AFB2, no se detectaron AFG1 y AFG2.

Se seleccionaron 3 cepas de *A. flavus* L. (25, 35 y 37) y 3 cepas de *A. parasiticus* S. (36, 24 y 26) de acuerdo a su máxima y mínima producción de aflatoxinas en medio líquido con arroz durante 7 días. Estas cepas también se inocularon en maíz, que fue ajustado a contenidos de humedad de 15.5, 16 y 17% aproximadamente, y almacenados a una temperatura de 27°C, durante 30, 60 y 90 días. En el grano almacenado 60 días, con 17% de humedad se registró la mayor producción de aflatoxinas. La cepa con mayor producción de aflatoxinas fue la cepa 25 de *A. flavus* L.

La cepa 37 de *A. flavus* L. y la cepa 26 de *A. parasiticus* S., no produjeron aflatoxinas, en ninguna de las tres humedades y tiempos de almacenamiento.

La germinación del grano de maíz disminuyó considerablemente en la humedad de 17%, en los granos de maíz inoculados con ambas cepas hasta 0% a los 60 días en comparación con la humedad de 15.5 y 16%. Esto debido al desarrollo de las especies estudiadas y al efecto de la humedad y temperatura de almacenamiento sobre los procesos intrínsecos del deterioro biológico de los granos en su poder germinativo.

Con el fin de determinar el efecto de la temperatura de almacenamiento, en otro experimento se inocularon 3 cepas de *A. flavus* L. (25, 35 y 37) y 3 cepas de *A. parasiticus* S. (36, 24 y 26) en maíz con un contenido de humedad de aproximadamente 17% y se incubaron a temperaturas de 20, 27 y 34°C, durante 8, 16 y 24 días de almacenamiento. La producción de aflatoxinas fue mayor en las temperaturas de 27 y 34°C, en 20°C casi no hubo producción. La cepa con más producción de aflatoxinas fue la cepa 24 de *A. parasiticus* S. a los 24 días de almacenamiento en 34°C con una producción 4833.3 ppb. Se evaluó la germinación de los granos de maíz y se observó que en 20°C, la germinación aún en la que esta inoculada se mantiene alta, a diferencia de la germinación a temperatura de 34°C donde la germinación era de 0% a los 8, 16 y 24 días, con las cepas (25, 35 y 26. 36, 24 y 26).

Las características morfológicas de las cepas de las dos especies en estudio no son determinantes para definir que cepas son productoras o no productoras de aflatoxinas. La temperatura y la humedad son factores de gran importancia en el desarrollo del hongo y en la producción de aflatoxinas en ambas especies. Por otra parte se definió que cada cepa tiene diferentes requerimientos para la producción de aflatoxinas.

Palabras clave: *A. flavus* L., *A. parasiticus* S., aflatoxinas, temperatura, humedad y germinación.

## I. INTRODUCCIÓN

Desde épocas prehispánicas, el maíz ha sido base de la dieta de los mexicanos, siendo actualmente su consumo diario de 328g *per capita*, en forma de tortilla (Figuroa, 1999). En los últimos cinco años, la superficie sembrada de maíz en México se ha mantenido alrededor de 8 millones de hectáreas, con las cuales se logran producir un promedio anual de 18 millones 500 mil toneladas (Paredes- López *et al.*, 2000). En México el cultivo de maíz ocupa el primer lugar en superficie cultivada y cosechada, le siguen en importancia, el sorgo y el frijol (SAGARPA, 2002).

Los granos y las semillas son invadidos por hongos, tanto en el campo de cultivo, como después de la cosecha. A los primeros se les ha denominado hongos de campo, siendo éstos principalmente especies de los géneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Helminthosporium*, entre otros. A los hongos que invaden después de la cosecha, se les ha denominado hongos de almacén y son principalmente especies del género *Aspergillus* (Christensen y Kaufmann, 1965; Domsch *et al.*, 1980; Moreno, 1988).

Las especies más importantes de los géneros mencionados son *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* L. y *Aspergillus parasiticus* S., debido principalmente a su capacidad potencial de producir micotoxinas; fumonisinas, producidas por la primer especie y aflatoxinas por las dos últimas (Gelderblom *et al.*, 1988; Goldblatl., 1969).

La contaminación por hongos puede, además de generar pérdidas económicas por la pérdida de calidad de los granos y semillas, repercutir en la salud humana, por la capacidad de algunas cepas de estas especies para producir toxinas. El inóculo primario de los hongos que contaminan al maíz durante su almacenamiento proviene del suelo de los cultivos, de la planta, de los elevadores de granos, máquinas cosechadoras, etc (Lillehoj, 1983).

La contaminación por aflatoxinas en maíz es un problema internacionalmente importante, especialmente bajo condiciones tropicales y subtropicales donde la infección por *Aspergillus* y la síntesis de aflatoxinas se ven favorecidas.

Las condiciones del medio ambiente como la sequía y ciertas prácticas agronómicas, por ejemplo la fertilización nitrogenada, han sido reportadas como favorables para la síntesis de aflatoxinas en el campo. Bucio *et al.* (2001a) encontraron que la contaminación por aflatoxinas en maíz en la región del bajo en México, no está relacionada con la infección ocurrida durante el desarrollo del cultivo, sino que lo más probable es que se deba a las deficientes condiciones de almacenaje del maíz cosechado.

Con relación a los hongos del género *Aspergillus*, los dos principales daños que causan en el almacén, son la contaminación de los granos con toxinas y la pérdida de viabilidad de las semillas agrícolas (Moreno y Christensen, 1971; Moreno y Gil, 1991; Sauer *et al.*, 1992; Moreno *et al.*, 2000). En cuanto a la pérdida de viabilidad de las semillas, se sabe que como grupo, *Aspergillus flavus* tiene un efecto nocivo sobre la viabilidad de la semilla de maíz; sin embargo, no existe información referente al daño que las especies *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare tienen sobre la longevidad del maíz almacenado (Christensen y Kaufmann, 1965; Sauer; *et al.*, 1992).

En Tamaulipas durante 1985 a 1988, *A. flavus* representó sólo el 2% de la población fúngica y los niveles de contaminación de aflatoxina fueron bajos (Guzmán-de-Peña, 1989; 1997). Sin embargo, en 1989 la situación fue diferente y los niveles de contaminación en campo y almacén por aflatoxinas fueron altos (Guzmán-de-Peña, 1997). Por el contrario, en Guanajuato, otro estado importante en la producción de maíz, en 1982, 1987, 1999 y 2000 (Guzmán-de-Peña, 1997; 2001), *A. flavus* L. representó el 0.5% de la población fúngica y los niveles de contaminación con aflatoxinas fueron bajos, tanto en campo como en almacén. Estudios realizados sobre la producción de aflatoxinas durante el cultivo del maíz en campo, indican que las condiciones de temperatura (19.5°C), humedad relativa (50.7%) y lluvias irregulares no son usualmente favorables para la síntesis de aflatoxinas en el Estado de Guanajuato, México (Bucio *et al.*, 2001b).

Después de que el grano es cosechado, la producción de aflatoxinas sigue siendo un riesgo, si la humedad del grano permite el establecimiento del hongo. La manera ideal, pero no siempre posible, de evitar la invasión de los granos en el almacén

por estos hongos, es mantener a los granos con humedades inferiores a la humedad mínima requerida para el desarrollo de los hongos. *A. flavus* L. requiere en maíz un contenido de humedad mínimo de 16.5%, lo cual significa que el maíz con un contenido de humedad menor a 16.5% no es susceptible de la invasión de ese hongo en particular, pero no de otros hongos de almacén, que tienen requerimientos de agua alrededor del 14% en maíz (Sauer *et al.*, 1992). En este trabajo se estudian las características morfológicas de cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., así como su capacidad de producir aflatoxinas en condiciones de temperatura y humedad relativa específicas en el almacén.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. LOS HONGOS: *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare.

El género *Aspergillus* pertenece a la clase de hongos conocidos como los Hyphomycetes, la cual pertenece a la división-forma de hongos conocidos como los Deuteromycota. Esta división-forma incluye los estados conidiales, de los hongos que pueden o no tener el estado teleomórfo o anamórfo (Moore-Landercker, 1996).

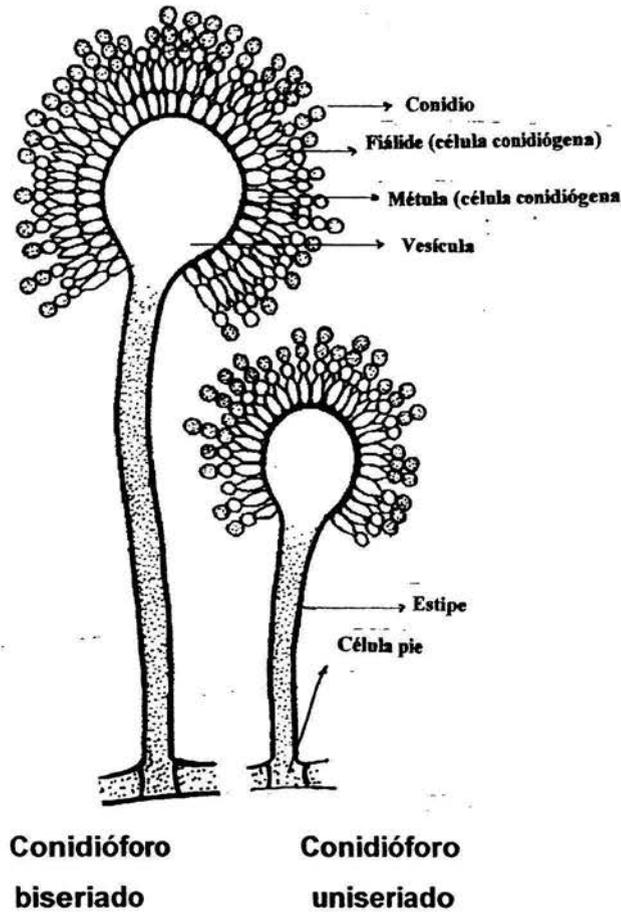
Algunas especies del género *Aspergillus* no presentan estados sexuales, como es el caso de las dos especies en estudio, *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare, cuyo estado perfecto no es conocido y por lo tanto su reproducción es asexual o conidial. *Aspergillus* es un género mitospórico que se caracteriza por la producción de hifas especializadas, denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas que originarán las esporas asexuales o conidios (Figura 2.1).

El conidióforo característico de *Aspergillus*, es una estructura unicelular que tiene tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio) (Figura 2.1). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente 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 (Abarca, 2000).

Es importante mencionar que Gams *et al.* (1985) reclasificaron al género *Aspergillus* y lo dividieron en 6 subgéneros (*Aspergillus*, *Fumigati*, *Omati*, *Clavati*, *Nidulantes* y *Circumdati*) cada uno de los cuales está dividido a su vez en una o más secciones que corresponden con los grupos descritos por Raper y Fenell (1965).

Estas especies de hongos tienen una distribución muy amplia. Los *Aspergillus* sección *flavi* incluyen las especies de *A. parasiticus* S., *A. flavus* L. y *A. nomius*, que se encuentran en las nueces y en pistache; también se les encuentra en el suelo. *Aspergillus bombycis* ha sido aislado en restos del gusano de seda y *Aspergillus pseudotamarii* se ha aislado de suelo, estas especies bajo ciertas condiciones producen

aflatoxinas carcinogénicas (Ehrlich *et al.*, 2002; Kumeda *et al.*, 2003). *A. flavus* L., *A. pseudotamarii* producen únicamente AFB y *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. parasiticus* S. producen ambos tipos de toxinas las AFB y las AFG (Yu *et al.*, 2002).



**Figura 2.1. Estructuras morfológicas de *Aspergillus flavus*.**

## 2. LAS AFLATOXINAS

El estudio intensivo y sistemático de las micotoxinas se inició a principios de la década de los sesentas. En 1960 en Inglaterra murieron 100,000 pavitos, lo que representó una fuerte pérdida económica, sobre todo para el productor de alimentos. Después de investigar las diferentes causas posibles, se llegó a la conclusión de que la intoxicación era causada por toxinas producidas por un hongo presente en pasta de

cacahuete de Brasil. El hongo responsable fue *A. flavus* L. y de su nombre se derivó el de sus metabolitos tóxicos, las aflatoxinas (Sargeant *et al.*, 1961; Bash y Rae, 1969; Davies y Diener, 1979).

La palabra aflatoxina esta formada por las siguientes letras: la primera letra "A" es por el género *Aspergillus*, las siguientes 3 letras "FLA" es por la especie *flavus* L. y el nombre "TOXIN" que significa veneno (Ellis *et al.*, 1991).

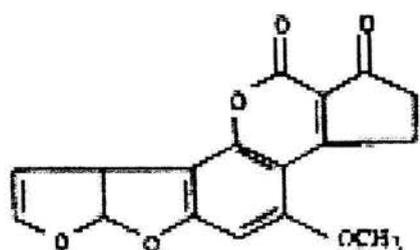
Las aflatoxinas son compuestos heterocíclicos formados predominantemente por las especies, *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. Las aflatoxinas son metabolitos secundarios, producidos por *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. Las principales aflatoxinas son cuatro: AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2.

Las letras B y G se refieren a los colores azul (blue) y verde (green) de fluorescencia observados bajo luz ultravioleta de onda larga; esta propiedad de fluorescencia de las aflatoxinas ha llegado a ser la base para la cuantificación por métodos fisicoquímicos (Asao *et al.*, 1963); y los números se refieren a los patrones de separación de estos compuestos al utilizar cromatografía de capa fina (Bullerman, 1979).

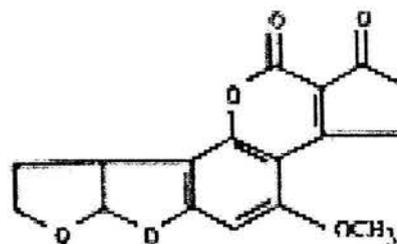
Generalmente AFB1 es encontrada en mayores concentraciones que las otras y es la más potente, y con actividad carcinogénica, teratogénica y mutagénica, y el órgano que más afecta es el hígado, por lo que es considerada una hepatoxina (Moreno y Gil, 1991).

Químicamente las aflatoxinas son difuranocumarinas (Buchi y Rae, 1969), estos compuestos están formados por anillos heterocíclicos, los furanos relacionados a la toxicidad y un anillo de lactona (Figura 2.2) responsable de la fluorescencia y el cual también hace que estos metabolitos sean susceptibles a la hidrólisis alcalina (Lillehoj, 1983).

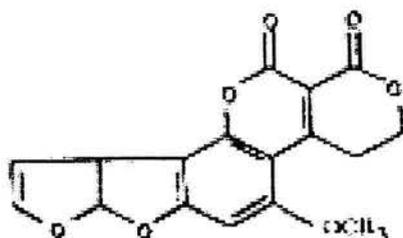
Las aflatoxinas son consideradas como policétidos por estar formadas por procesos que involucran la condensación de un acetil con tres o mas unidades de malonil con la perdida de CO<sub>2</sub> (Bennet y Lee, 1979) . En el Cuadro 2.1 se muestran algunas de las propiedades físico-químicas de las aflatoxinas y en la Figura 2.2 las estructuras moleculares de las mismas (Moreno y Gil, 1991).



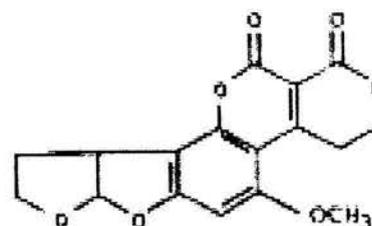
Aflatoxina B1



Aflatoxina B2



Aflatoxina G1



Aflatoxina G2

**Figura 2.2. Estructura molecular de las aflatoxinas.**

**Cuadro 2.1. Principales propiedades fisico-químicas de las aflatoxinas.**

Características	Aflatoxinas					
	B1	B2	G1	G2	M1	Aflatoxicol
Fórmula química	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>
Peso molecular	312	314	328	330	330	314
Punto de Fusión (° C)	268-269(D)	287-289 (D)	244-249 D)	230	290 (D)	230-234
Absorción ultravioleta	223(25,600)	220(20,500)	243(11,500)	217(28,000)	226(23,100)	
en etanol nm(E)	285(23,400)	265(12,700)	247(9,900)	245(12,900)	265(11,600)	
Fluorescencia	362(21,800)	263(24,000)	264(10,000)	365(19,300)		
	425 nm	425 nm	450 nm	425 nm	425 nm	425 nm

### 3. BIOSÍNTESIS DE LAS AFLATOXINAS

Se ha establecido que existe una estrecha asociación entre la biosíntesis de aflatoxinas y la de los lípidos (Twonsend *et al.*, 1984; Cleveland y Bhatnagar, 1991) y además en algunos casos, la síntesis de proteínas disminuye durante la fase de producción de aflatoxinas (Magno *et al.*, 1997). Al inicio del crecimiento del hongo existe poca o ninguna producción de aflatoxinas, pero al reducirse los niveles de fosfatos y nitrógeno en el medio, el metabolismo primario se desorganiza, acumulándose varios metabolitos primarios y se empiezan a producir las aflatoxinas (Drew y Demian, 1987).

La mejor vía estudiada del metabolismo secundario de estos hongos, es la de las aflatoxinas y ha sido recientemente descrita (Bhatnagar *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 2002).

La utilización de la glucosa para la producción de aflatoxinas es importante, y por esto se sabe que las aflatoxinas son sintetizadas extra mitocondrialmente a partir del acetil Co A derivado del catabolismo de carbohidratos simples. Los intermediarios glicolíticos estimulan la producción de aflatoxinas asociada con la caída en los niveles de piruvato y fosfoenol piruvato, los cuales son precursores de 3 carbonos del acetato y malonato. Los precursores glicolíticos estimulan las vías reproductivas asexual y sexual de los hongos (Payne y Brown, 1998).

Primeramente el acetato y malonil CoA son convertidos por una ácido graso sintasa hasta un hexanoyl, el cual es subsecuentemente extendido por un policétido sintasa hasta el dacetido ácido norsolorínico; primer precursor estable en la biosíntesis de las aflatoxinas. El policétido después experimenta aproximadamente de 12 a 17 transformaciones enzimáticas, a través de una serie de vías intermediarias las cuales se resumen en la Figura 2.3 incluyendo averantin, 5' hydroxyaverantin, averufanin, averufin, 1'hydroxyversicolorane, acetato versiconal, versiconal y versicolorin B. La vía se ramifica en dos, una para formar AFB1 y AFG1, que contiene anillos de dihidrobisfuranos y son producidas por dimetilesterigmatocistina (DMST) y la otra rama forma AFB2 y AFG2 conteniendo anillos de tetrahidrobisfurano, las cuales son producidas por la dihidrodimetil esterigmatocistina (DHDMST). La vía propuesta

está basada principalmente en evidencias de análisis genéticos y enzimáticos (Payne y Brown, 1998; Sweeney *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 2002).

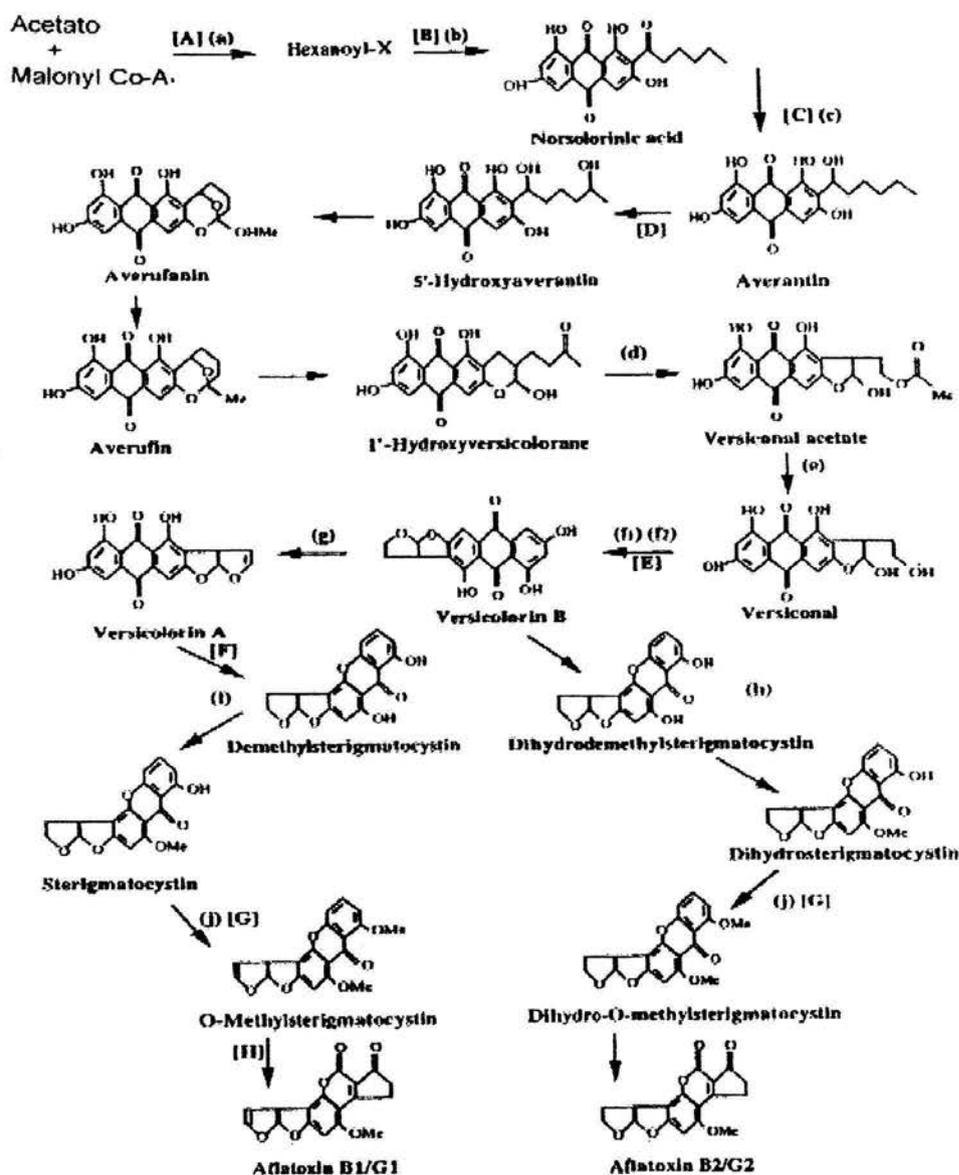


Figura 2.3. Vía biosintética de las aflatoxinas. Enzimas involucradas: (a) ácido graso sintasa, (B) policétido sintasa, (c) ácido norsolorínico reductasa, Hemicetal versiconal acetato reductasa, (e) esterasa, (f1) versicolorin B sintasa, (f2) versiconyl ciclasa, (g) desaturasa, (h) O- metiltransferasa (MT-II), (i) O-metiltransferasa, (j) O-metiltransferasa (MT-I). Genes involucrados: [ A ] *fas-1A* y *fas-2A*, [ B ] *pksA*, [ C ] *nor-1*, *norA*, [ D ] *avnA*, [ E ] *vbs*, [ F ] *ver-1*, [ G ] *omtA* y [ H ] *ord-1* (Sweeney y Dobson, 1998).

Es conocido que la biosíntesis de las aflatoxinas es un proceso complejo que implica reacciones multienzimáticas. Se ha descrito, mediante estudios genéticos, el mecanismo molecular de la biosíntesis de las aflatoxinas B1, en un fragmento de 70 pares de kb de longitud, conteniendo al menos 24 genes estructurales conocidos; incluyendo un gen de regulación positiva como activador de la transcripción. Dichos genes estructurales codifican monoxigenasas del citocromo p450, deshidrogenasas oxidasas, metiltransferasas, una policétido sintetasa y dos sintasas exclusivas de ácidos grasos (Yu *et al.*, 2002).

## **4. FACTORES BIOLÓGICOS**

### **4.1. Variabilidad de la cepa**

Como ya se ha señalado, las aflatoxinas son producidas por las especies *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. Sin embargo, los tipos de toxina producida son específicos de las especies *A. flavus* L. producen principalmente AFB1 y AFB2, mientras que *A. parasiticus* S. produce AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2. Además, no todas las cepas producen aflatoxinas (Ellis *et al.*, 1991), el genotipo de cada cepa determina si es o no aflatoxigénica. Si una cepa tiene el potencial genético para producir aflatoxinas, el nivel de producción dependerá de otros factores, tales como el sustrato, el efecto de la competencia con otros hongos y las condiciones ambientales.

### **4.2. Competencia con la microbiota**

La competencia con la microbiota afecta la producción de aflatoxinas. Se ha observado que *A. parasiticus* S. crece en presencia de *A. candidus* y *A. chevalieri*, pero la producción de aflatoxinas es inhibida por estos hongos (Boller y Schroeder, 1974). Ha sido demostrado que *Aspergillus niger* puede reducir a 3 el pH del sustrato, por la producción del ácido cítrico, y a ese pH se inhibe la formación de aflatoxinas. Por lo tanto, en la competencia con la microbiota se puede alterar el metabolismo del hongo tóxico, inhibiendo la producción de la aflatoxina o también pueden los otros microorganismos metabolizar la aflatoxina producida. También se ha sugerido que la

microbiota no tóxigena, puede competir con el hongo productor de aflatoxinas por el sustrato necesario para la síntesis de estos metabolitos secundarios, o crear condiciones no favorables para la producción de los mismos. La actividad de *Fusarium moniliforme* y *Fusarium proliferatum* en granos de maíz reduce la presencia de *A. flavus* L. (Marín *et al.*, 1998).

#### **4.3. Cantidad de inóculo**

El número de esporas inoculadas, puede también afectar la biosíntesis de aflatoxinas y la producción "*in vitro*". Jinks en 1969, reportó que la producción de aflatoxinas en el laboratorio está relacionada con la diferenciación y ramificación del micelio. Con grandes poblaciones de esporas, se reducen las posibilidades de producción de toxinas, por falta de nutrientes y por la liberación de sustancias de envejecimiento. En cambio, cuando hay pequeñas cantidades de esporas, hay más ramificaciones laterales del micelio, lo que influye en la síntesis y en la alta producción de aflatoxinas.

La fase *lag* incrementa cuando hay menos esporas y hay una correlación lineal entre la fase *log* y la fase *lag* de acuerdo al tamaño del inóculo en *A. flavus* L. (González *et al.*, 1987).

Karunaratne y Bullerman (1990), reportaron que la máxima producción de aflatoxinas ocurre con una carga de esporas de  $10^3$  esporas / ml. En los niveles superiores o menores a este se presenta un decremento en la producción de aflatoxinas a temperaturas de crecimiento óptimo.

### **5. FACTORES QUÍMICOS**

#### **5.1. Sustratos y nutrientes**

El tipo de sustrato también afecta la síntesis y los niveles de producción de aflatoxinas. Los sustratos con altas concentraciones de carbohidratos y ácidos grasos aumentan la producción de aflatoxinas, se ha observado alta producción de aflatoxinas en coco fresco (Arseculeratue *et al.*, 1969). Sustratos altos en proteínas y pobres en

carbohidratos no aumentan la producción de aflatoxinas en el caso de *A. parasiticus* S. Sin embargo, *A. flavus* L. puede utilizar bajas cantidades de carbohidratos y producir cantidades grandes de aflatoxinas.

También se ha señalado que *A. flavus* L. tiene una mayor actividad proteolítica y que *A. parasiticus* S. tiene una mayor actividad lipolítica (El Gendy, 1980).

Con incubación prolongada, a temperaturas de aproximadamente 25°C, las proteínas son degradadas en aminoácidos por las proteasas de los hongos. Algunos de estos aminoácidos sirven como fuente de nitrógeno, mientras otros sirven como una fuente de carbono, si otras fuentes de carbono son limitadas. Cuando los aminoácidos son usados como fuente de carbono, gran cantidad de amonio puede ser liberado y afecta la producción de aflatoxinas, ya que el amonio y otras fuentes de nitrógeno metabolizado inhiben la producción de aflatoxinas.

Los estudios han demostrado que la producción óptima de aflatoxinas óptima ocurre sobre un sustrato sólido rico en carbohidratos como en coco, trigo, arroz y semilla de algodón (Detroy *et al.*, 1971).

El crecimiento de los hongos es un gran problema en los granos de cereales de todo el mundo y puede degradar la calidad de los productos, así como ocasionar efectos adversos para la salud humana y animales, debido a la producción de micotoxinas.

La incidencia natural de aflatoxinas es alta en el maíz y cacahuate, mientras que en granos pequeños (sorgo, avena, trigo, arroz, cebada y centeno) parecen ser menos susceptibles a la contaminación por aflatoxinas (Smith y Moss, 1985).

Las semillas de amaranto son pseudo cereales reconocidos por su valor alimenticio. Estas semillas tienen proteínas de mayor calidad que otros cereales (Bressani, 1989). Bresler en 1995 reportó la incidencia de zearalenona en granos de amaranto cultivados en Argentina y se aislaron cepas de otros hongos toxigénos como *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., así como especies de *Fusarium*, capaces de producir zearalenona.

En cultivo líquido, estos hongos normalmente tienen un período de síntesis activa y acumulación de la aflatoxina en el medio. Estos hongos, también producen las toxinas usando diferentes semillas de alimento como sustrato sólido (Sharma *et al.*, 1994).

La biosíntesis de aflatoxinas y los niveles de producción son influenciados por la composición de nutrientes del sustrato. Los azúcares simples tales como la glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa son la fuente de carbono preferida para la biosíntesis de aflatoxinas en *A. flavus* L. (Davies y Diener, 1968). Pero no por la fuente de carbohidratos tal como peptona, lactosa, sorbosa y ácido oleico (Ellis *et al.*, 1991).

Ha sido demostrado que la manosa y la xilosa estimulan la producción de aflatoxinas en *A. parasiticus* S. Sin embargo, estos dos azúcares inhiben la producción de aflatoxinas en *A. flavus* L. Ciertos aminoácidos como la glicina, glutamato, prolina, aspartato, glutamina, y menos nutrientes tal como  $Cd^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , y  $Zn^{2+}$  han sido todos encontrados para estimular la producción de aflatoxinas (Mateles y Adye, 1965; Davies *et al.*, 1967; Lee *et al.*, 1966).

El zinc, es esencial para el crecimiento celular, el metabolismo y también para la biosíntesis de aflatoxinas. La influencia del  $Zn^{2+}$  se cree que es debida a la regulación de la formación de compuestos intermediarios, tales como el versicolorin A y C (Bennett *et al.*, 1979) implicados en la biosíntesis de las aflatoxinas. También se ha observado que la tiamina y otras vitaminas del complejo B, con excepción de riboflavina, estimulan la biosíntesis de aflatoxinas (Basappa *et al.*, 1967).

El calcio es importante en el crecimiento de los hongos y en la biosíntesis de las aflatoxinas, ya que participa en los procesos intracelulares y si carece de éste, se inhiben el crecimiento y la producción de aflatoxinas (Praveen y Subramanyam, 1999).

## **5.2. Agentes antifungales.**

Ciertos compuestos, inhiben el crecimiento de los hongos. El ácido propiónico es un agente antifungistático efectivo contra *A. flavus* L., pero esta actividad es influenciada por el pH y ciertos ingredientes alimenticios (Dixon y Hamilton, 1981).

El ácido sórbico es también un preservativo de alimentos y ha sido demostrado, que esta sal inhibe el crecimiento y producción de aflatoxinas de *A. flavus* L. y *A.*

*parasiticus* S. Sin embargo se ha reportado que los niveles subinhibitorios del ácido sórbico estimulan la producción de aflatoxinas. Yousef y Marth (1983), sugirieron que el ácido sórbico inhibe la biosíntesis de aflatoxinas, por que inhibe la transferencia de sustancias del medio de crecimiento hacia el interior de la célula. Gareis *et al.* (1984) propusieron que el efecto estimulador de los niveles sub inhibitorios del sorbato puede ser debido a la inhibición del ciclo del ácido tricarbóxico que permite una acumulación o incremento en la concentración del acetil CoA, un precursor requerido para la síntesis de aflatoxinas.

## **6. FACTORES AMBIENTALES**

### **6.1. Temperatura**

El rango de temperatura óptimo para el crecimiento del hongo y la producción de aflatoxinas está entre 25°C a 30°C (Bullerman, 1979). Sin embargo, en la naturaleza, las temperaturas son pocas veces constantes debido a las variaciones estacionales o por calentamiento espontáneo de los granos en los almacenes. Como un resultado de la variación de temperatura, la producción de aflatoxinas puede variar considerablemente. A bajas temperaturas, la cantidad de AFB y AFG son aproximadamente iguales, mientras a altas temperaturas la producción de las AFB es predominante, en comparación con las AFG.

Ha sido demostrado que mientras la AFB1 y la AFG1 fueron producidas en igual cantidad de 15°C hasta 18°C, éstas fueron producidas en una proporción de 12:1 a 32°C (Diener y Davis, 1969). El decremento en la producción de aflatoxinas ha sido atribuido al acelerado catabolismo de la AFG1 a altas temperaturas del almacenamiento (Schroeder y Hein, 1967).

### **6.2. La actividad de agua**

La actividad de agua es la proporción de la presión de vapor de agua del sustrato hasta la presión de vapor de agua pura, en una determinada temperatura y presión.

A baja actividad de agua, el agua es retenida por las sales, azúcares, proteínas y otros solutos, por lo tanto el crecimiento de los hongos no puede ocurrir sin que el agua este presente de forma disponible. La producción de aflatoxinas decrece en valores de actividad de agua abajo de 0.85. Sin embargo el crecimiento del hongo puede todavía ocurrir en valores de actividad de agua de 0.78 hasta 0.80. La mínima actividad de agua para el crecimiento de *A. flavus* L. ha sido reportada como 0.78 a 0.84, mientras la mínima actividad de agua para la producción de la toxina fue encontrada en 0.84. Para *A. parasiticus* S. tiene un mínimo de actividad de agua para su crecimiento de 0.84 y para la producción de aflatoxinas el mínimo de actividad de agua es de 0.87 (Ellis *et al.*, 1991). La actividad de agua óptima para la producción de aflatoxinas para ambos *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. está en el rango de 0.95 hasta 0.99. (Diener y Davis, 1967).

Las diferencias pueden ser atribuidas a diferentes factores, incluyendo la cepa del hongo usada, pero también a la composición de los sustratos, los cuales, de acuerdo a Northolt *et al.* (1976) parecen jugar un papel importante, al igual que la actividad de agua respecto a la producción de aflatoxinas.

### **6.3. Los gases atmosféricos**

Los hongos son organismos aerobios, pero la relación entre los requerimientos de oxígeno y bióxido de carbono varían considerablemente.

Entre especies y cepas, las bajas concentraciones de CO<sub>2</sub> se ha demostrado que son benéficas para la germinación de la spora y son involucrados en el metabolismo del hongo y en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos e intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico. Se ha demostrado que el bióxido de carbono cataliza a el malonil CoA involucrado en la síntesis de los ácidos grasos así como otros compuestos naturales, incluyendo compuestos anillados. Sin embargo a concentraciones de 20% o mayores de CO<sub>2</sub>, se inhibe la germinación de las esporas y a concentraciones mayores a 10% de CO<sub>2</sub> se suprime la producción de toxinas (Tabak y Cooke, 1968). Un decremento en el oxígeno atmosférico de menos del 20%, o un incremento en la concentración del O<sub>2</sub> hasta 90% se ha encontrado que inhibe la formación de aflatoxinas (Landers *et al.*, 1967).

La síntesis de la toxina es inhibida completamente en una atmósfera de 100% de CO<sub>2</sub> y en 100% de N<sub>2</sub>, pero la síntesis de la toxina es suprimida más eficientemente por altas concentraciones de CO<sub>2</sub> que de N<sub>2</sub> (Shih y Marth, 1973). La máxima producción de aflatoxinas depende no solo de la cepa del hongo sino también de la concentración de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, en combinación con la actividad de agua, pH y la temperatura de almacenamiento (Ellis *et al.*, 1993).

#### 6.4. La luz

Los efectos de la luz sobre la producción de aflatoxinas para *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. han sido estudiados por Bennett *et al.* (1978) quienes reportaron que mientras los conidios fueron producidos en luz y en oscuridad, los conidióforos fueron más abundantes en los hongos que fueron expuestos a la luz. Igualmente, observaron que la región azul de la luz blanca fue más efectiva en la foto respuesta de los hongos.

Bennett *et al.*(1978), también reportaron que la foto respuesta de los hongos fue influenciada por la temperatura, la cual afecta la producción de aflatoxinas. Ellos demostraron que la producción de aflatoxinas es inhibida por la luz, en cualquiera de las temperaturas bajas y altas, pero no para las temperaturas intermedias, entre 20 y 25°C. El tipo de sustrato también afecta la foto respuesta y producción de aflatoxinas. Joffe y Lisker (1969) señalaron que la producción de aflatoxinas fue inhibida en medio Czapek en presencia de luz. La intensidad de luz juega un papel importante en la destrucción de las aflatoxinas; Shantha *et al.* (1986), reportaron un incremento en la degradación de aflatoxina B1 con el incremento de la intensidad de luz.

#### 6.5. El pH

Durante el crecimiento de los hongos, el pH del sustrato puede fluctuar entre 4 hasta 5 como resultado de la actividad de los hongos. *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. son capaces de crecer sobre un amplio rango de valores de pH con un crecimiento óptimo en los rangos de 5 hasta 8 de pH. Lie y Marth (1968) reportaron que *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. fueron capaces de crecer sobre un rango de pH de 1.7 hasta 9.3, con un crecimiento óptimo de pH entre 3.42 y 5.47. Sin embargo, la producción de

aflatoxinas no ocurre de igual manera en todos los niveles de pH. Por lo tanto, mientras los hongos en general, pueden tolerar mas condiciones ácidas, estas condiciones inhiben la producción de aflatoxinas.

## 7. EFECTO DE LAS AFLATOXINAS

En cuanto a su importancia, se sabe que prácticamente todos los seres vivos son susceptibles a las aflatoxinas. *A. flavus* L. está adaptado a colonizar un amplio espectro de fuentes orgánicas, por ser saprófito, pero también es un organismo patógeno oportunista en plantas, insectos y vertebrados, incluyendo al hombre (Bhatnagar *et al.*, 1994); Sus efectos pueden ser agudos o crónicos dependiendo del organismo afectado, la dosis y la frecuencia de exposición.

La sensibilidad a las aflatoxinas varía entre las especies, la edad y el sexo en los animales, así como la composición de la dieta (Krishna y Sinha, 1991); algunas bacterias se inhiben en su presencia, algunas plantas desarrollan albinismo (plantas sin clorofila), las semillas pierden capacidad de germinación (Peña y Durán, 1990).

Desde hace mas de 30 años se descubrió que las aflatoxinas son sustancias muy potentes inductoras de cáncer en animales de laboratorio (Wogan y Newberne, 1967).

La absorción de AFB1, después de una administración oral, resulta relativamente eficiente y es totalmente dependiente de la especie animal, siendo en general completa. Por otro lado, está demostrado que la absorción de AFB1 a nivel del intestino delgado es mediante difusión pasiva y dependiente de la composición lipídica del epitelio intestinal, sin perder de vista que en el tracto gastrointestinal puede llevarse a cabo una biotransformación, generando AFB1- epóxido, dihidrodiol-AFB1 o AFB2 capaces de interactuar con proteínas intestinales (Hsieh y Wong, 1994).

Las aflatoxinas son consideradas como genotoxinas ya que pueden unirse al ADN del individuo que lo consume y pueden activar elementos genéticos móviles como son provirus y retrovirus del genoma, generando una desestabilización del mismo que conduce a distintas anormalidades (Lillehoj, 1991). De todas las aflatoxinas la B1 se

considera la más tóxica y en orden decreciente le siguen: AFG1, AFB2, AFG2, AFM1 y AFQ1 (Betina, 1989).

En general las aflatoxinas pueden tener serios efectos sobre la salud y vida de los organismos. Estos efectos pueden ser subdivididos dentro de: 1) efectos bioquímicos y 2) efectos biológicos.

## **7.1. Efectos bioquímicos**

### **7.1.1. Energía del metabolismo**

Ha sido demostrado que las AFB1, AFG1 y AFM1 inhiben el transporte de oxígeno a los tejidos porque actúan sobre el sistema de la cadena de transporte de electrones. Son capaces de inhibir la actividad de la enzima adenosina trifosfatasa en diferente grado, resultando en un decremento de la producción de la adenosina trifosfatasa (Ellis *et al.*, 1991).

### **7.1.2. Metabolismo de los carbohidratos y lípidos**

Diferentes estudios han demostrado que los niveles hepaticoglicógenos son reducidos debido a la acción de las aflatoxinas. Esto puede ser debido a los efectos de las aflatoxinas sobre, la inhibición de la glicogénesis, disminución del transporte de la glucosa dentro de las células del hígado y la aceleración de la glicogenólisis (Ellis *et al.*, 1991).

### **7.1.3. Metabolismo de los ácidos nucleicos y proteínas**

Las aflatoxinas pueden unirse al DNA alterando su actividad. Ha sido demostrado que la AFB1 está unida más fuertemente con el DNA que las AFG1 y AFG2. Las AFB1 pueden ser convertidas a forma epóxida, la cual se une al DNA e impide la transcripción de genes. También puede unirse al RNA inhibiendo la síntesis de proteínas (Swensen *et al.*, 1977). La AFB1 forma un aducto con la albúmina de suero en manera de dosis dependiente por unirse a los componentes de la lisina de estas proteínas, resultando en la formación de lisina-AFB1, la cual ha sido usada para probar

los niveles de exposición de AFB1 en humanos (Sabbioni, 1990). La AFB1 puede ser convertida a uno de sus metabolitos, AFB2, la cual reacciona principalmente con grupos amino libres de las proteínas funcionales. La AFB2 no es generalmente considerada una micotoxina y se cree que está en equilibrio con el aldehído, el cual reacciona con el grupo amino libre para formar bases de Schiffs, resultando en reducción de la actividad de la enzima.

## **7.2. Efectos biológicos**

### **7.2.1. Toxicidad**

La toxicidad de las aflatoxinas está ampliamente investigada, esto obedece directamente a la repercusión en la salud humana, así como a las pérdidas materiales y económicas en el sector pecuario, que puede ocasionar una intoxicación aguda como la descrita anteriormente en los años 60's con pavos en Inglaterra (Roebuck y Maxuitenko, 1994).

La exposición crónica a niveles bajos de aflatoxinas es muy probable que ocurra con mayor facilidad que una exposición aguda. En la literatura, existen evidencias de que una exposición crónica de AFB1 en animales de experimentación, produce cáncer e hipertrofia del hígado (Roebuck y Maxuitenko, 1994).

### **7.2.2. Citotoxicidad**

Mediante el uso de cultivos celulares (humanos y de animales), se ha probado la citotoxicidad causada por las aflatoxinas. En general, los efectos se han estudiado en líneas celulares como células embrionarias de pato, células hepáticas de mono, de riñón, células hepáticas de embrión humano, células epiteliales de mono, etc.

También está demostrado que la AFB1 puede afectar el ciclo celular y la mitosis de algunas células, especialmente hepatocitos (Betina, 1989; Roebuck y Maxuitenko, 1994).

### **7.2.3. Efectos inmunosupresores**

Las aflatoxinas pueden afectar al sistema inmune celular y humoral, provocando un aumento en la susceptibilidad de los animales a infecciones causadas por bacterias, hongos y otros parásitos. Además, pueden existir efectos inmunotóxicos sin observarse patologías clínicas aparentes (Coulombe, 1994; Miller y Wilson, 1994).

### **7.2.4. Carcinogénesis**

Las aflatoxinas son conocidas por ser potencialmente carcinógenas y ha sido demostrado que causan cáncer del hígado, del colon y de los riñones en algunos animales, tal como las ratas, patos y monos. La AFB1 es la principal hepatocarcinógena en animales, pero también se ha demostrado que AFB2 y AFG1 causan cáncer, pero con un potencial menor que AFB1.

Los efectos toxicológicos de la AFB1, ocurren después de la activación metabólica de la molécula por el mezclado microsomal función del sistema oxidasa (Sarasin *et al.*, 1977). Estas reacciones enzimáticas involucran el metabolismo y detoxificación. La fase metabólica conduce a la formación de intermediarios reactivos, uno de los cuales es 2,3-epoxy-aflatoxina B1. D' Andrea *et al* (1978) reportaron que la adenina y la guanina pueden servir como blanco para unirse a la actividad microsomal de la AFB1, esta especificidad no ocurre con el DNA desnaturalizado. Las aflatoxinas B1, B2, G1, y G2 pueden también ser convertidas a su forma reactiva por foto activación con luz ultravioleta cercana. La unión de estos intermediarios reactivos al DNA resulta en una alteración de la transcripción, llevando a la proliferación de células anormales.

### **7.2.5. Mutagénesis**

Dentro de los bioensayos empleados para medir mutagenicidad de las aflatoxinas se pueden citar: detección de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos, cultivos pulmonares embrionarios humanos, células de riñón de rata y hámster, células Hela, mutaciones en microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Neurospora crassa*, *Salmonella typhimurium*, *Drosophila melanogaster*,

células T de riñón humano, cultivo de leucocitos humanos e inducción de fagos en bacterias lisógenas. Los estudios de mutagenicidad en bacterias sugieren que el posible mecanismo de AFB1 puede ser iniciado por un proceso de unión AFB1- ADN, llevando a la formación de puntos de unión en una misma cadena de ADN y con ello alterar la actividad de la ADN polimerasa (Ellis *et al.*, 1991).

En el caso de la AFB1 se informa que, aproximadamente, la mitad de los carcinomas hepáticos en regiones con altos niveles de contaminación de alimentos con la toxina, contienen una mutación en el codón 249 del gen supresor del tumor p53. Esta mutación consiste en la sustitución de bases de guanina por timina en la tercera posición de este codón, lo cual provoca la inserción del aminoácido serina en la proteína mutada (Aguilar *et al.*, 1993). Esta simple mutación provocada por la micotoxina puede provocar el desarrollo de tumores.

#### **7.2.6. Teratogenicidad**

Algunas de las aflatoxinas son capaces de interferir en el desarrollo normal de los fetos, y la respuesta depende del estadio del desarrollo del feto, la dosis y la vía de administración. En mamíferos si la administración se realiza durante la organogénesis activa (8 días), ocasiona la muerte fetal y la reabsorción de algunos fetos, siendo posible observar malformaciones en algunos fetos que logran sobrevivir. Si la toxina es aplicada después del 13º día, cuando la organogénesis está casi finalizando, no ocurre malformación de fetos, y la reabsorción y muerte fetal ocurre con baja frecuencia (Hayes, 1981).

La AFB1, se ha sugerido que es teratogénica debido a sus efectos prenatales sobre ciertos animales. Puesto que es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas en células eucarióticas y altera la diferenciación celular. La susceptibilidad a teratógenos varía grandemente durante el curso de la gestación, aunque el embrión es más susceptible durante los estadios tempranos de diferenciación morfológica (Ellis *et al.*, 1991).

## 8. BIOTRANSFORMACION BIOLÓGICA DE LAS AFLATOXINAS

Muchos microorganismos, incluyendo bacterias, *Actinomycetes*, levaduras y hongos pueden biotransformar aflatoxinas. El organismo más activo que se ha descubierto es *Flavobacterium aurantiacum* NRRL B-184, el cual en solución acuosa puede metabolizar irreversiblemente y biotransformar las AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFM<sub>1</sub> (Ciegler *et al.*, 1966; Lillehoj *et al.*, 1971).

Los microorganismos capaces de convertir AFB<sub>1</sub> en aflatoxicol son: *Corynebacterium rubrum*, *Trichoderma viride*, *Dactylium denroides*, *Absidia repens*, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger*, *Mucor ambigus*, *Mucor alternans*, *Mucor griseocyanus*, *Rhizopus oryzae*, *Tetrahymena pyriformis*.

Sin embargo la conversión de AFB<sub>1</sub> a aflatoxicol es muy bajo y un proceso incompleto y puede tomar de 3 a 4 días hasta biotransformar el 60% de AFB<sub>1</sub> a aflatoxicol (Detroy y Hesseltine, 1969; Karunaratne y Bullerman, 1990).

Karunaratne y Bullerman (1990) también demostraron que *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, y *L. plantarum* pueden ser usados para prevenir el crecimiento del hongo y biotransformar las aflatoxinas. La prevención del crecimiento del hongo fue atribuido a un efecto del pH y a la competencia microbiana.

*Lactobacillus casei pseudopantarum* es capaz de inhibir el crecimiento de *A. flavus* L. y la producción de AFB<sub>1</sub> y AFG<sub>1</sub> (Gourama y Bullerman, 1997).

Los hongos capaces de producir aflatoxinas también pueden metabolizarlas. Ha sido demostrado que la producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* S. y *A. flavus* L. llega a un máximo y comienza a biotransformarse durante la incubación continua del cultivo en líquido. Las condiciones para la biotransformación de las aflatoxinas por estos hongos, de acuerdo con Doyle *et al.* (1982) son:

1. La edad del micelio, de 8 a 10 días son muy efectivos para la biotransformación de la aflatoxina B<sub>1</sub>.
2. El micelio fragmentado es más efectivo que el micelio intacto.
3. Las cepas que producen gran cantidad de aflatoxinas generalmente biotransforman mas aflatoxinas.

4. Incrementando la cantidad de micelio en el medio de crecimiento se incrementa la velocidad de la degradación de la aflatoxina.
5. La máxima actividad degradativa ocurre a los 28°C.
6. La máxima actividad degradativa es alrededor de un pH de 5 hasta 6.5.

Se piensa que estas reacciones de biotransformación ocurren por la actividad enzimática y que estas enzimas producen finalmente productos o subproductos que reaccionan con las aflatoxinas. Se ha especulado que la peroxidasa era una de las enzimas que catalizan la descomposición de los hidroperóxidos, hasta producir radicales libres (Richardson, 1976), los cuales pueden reaccionar con las aflatoxinas.

Además, ciertas peroxidosas, tal como mieloperoxidasas producen hipoclorito y oxígeno únicamente en presencia del peróxido de hidrógeno y el ion cloro (Allen, 1975). Doyle y Marth en 1979 demostraron que *A. parasiticus* S. es capaz de producir peroxidosas y biotransformar la AFB1.

## 9. BIOCONTROL

Dorner *et al.* (2003) reportaron que utilizando cepas no toxigénicas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. se reduce la contaminación de aflatoxinas en cacahuete antes de la cosecha. Ellos encontraron que la concentración de aflatoxinas en cacahuete, fue reducida en un 92% durante dos años en suelos donde se aplicó arroz fermentado en estado sólido con conidios de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. no toxigénicos.

Los extractos de ciertas especies y hierbas de importancia medicinal tienen propiedades antifungales. Estos agentes antifungales naturales pueden ser potencialmente explotados para controlar el crecimiento de los hongos y por lo tanto inhibir la formación de aflatoxinas. Selvi *et al.* (2003) reportaron que el extracto de *Garcinia indica* tiene propiedades antifungales y antioxidantes, este extracto puede ser explotado y aplicado comercialmente para algunos alimentos para evitar el desarrollo de hongos y producción de aflatoxinas. Ellos encontraron que inhibe a *A. flavus* L. y a la producción de aflatoxinas en cacahuete, hasta el 100%, en una concentración del extracto de *Garcinia indica* de 3,000 ppm.

Passone *et al.* (2003) reportaron que los antioxidantes fenólicos controlan la germinación conidial, el crecimiento micelial y la producción de aflatoxinas en *Aspergillus flavus* L. y *A. parasiticus* S. en cacahuate.

## 10. LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS EN MAÍZ

Uno de los factores que reducen la calidad nutricional y sanitaria de los granos de maíz, es la contaminación de éstos con metabolitos tóxicos producidos por hongos toxigenicos.

La prevención es el principal enfoque que se le debe dar al problema de la contaminación de los granos con los metabolitos de estos hongos. Sin embargo, prevenir la producción de aflatoxinas en el campo no es una tarea fácil; dicho riesgo puede ser aminorado mediante la aplicación de ciertas prácticas de cultivo desfavorables para el establecimiento del *Aspergillus flavus* L. en la mazorca de maíz (Lisker y Lillehoj, 1991; Rodríguez-del-Bosque, 1996).

Otra manera de controlar los hongos productores de aflatoxinas es el uso de fungicidas; sin embargo, se ha encontrado que las sustancias (sales de ácidos orgánicos) que pueden ser usadas en granos alimenticios imparten a los granos olores y sabores desagradables al hombre y su uso está orientado a la preservación de maíz destinado a la alimentación del ganado (Raeker *et al.*, 1992; Sauer y Burroughs, 1974). Por otra parte, hay investigación que muestra el beneficio de tratar las semillas de maíz con ciertos fungicidas para proteger su viabilidad de la acción de los hongos de almacén, pero su uso está restringido solamente a las semillas por su alta toxicidad y no pueden ser utilizados en granos destinados a la alimentación (Moreno y Ramírez, 1985).

Considerando todo lo anterior, y teniendo en cuenta que en ciertas regiones del país, tanto por cuestiones climáticas como tecnológicas se dificulta el almacenar los granos con bajos contenidos de humedad, se ha considerado importante explorar otras alternativas para el almacenamiento de granos destinados a la alimentación del hombre, entre ellas, el almacenamiento hermético. La efectividad de este método se

basa en el consumo del oxígeno y en la producción de bióxido de carbono por la respiración de los insectos, los hongos y del mismo grano, lo cual crea una atmósfera letal para los insectos e inhibitoria para los hongos (Hyde, 1965; Banks, 1981; Kawasugi *et al.*, 1994).

La presencia de aflatoxinas es inevitable en algunos lotes de maíz, dada las condiciones en las que las micotoxinas se forman, tanto en la planta en pie, en el campo, como durante el manejo poscosecha, hasta su utilización. Además, la presencia de aflatoxinas en este cereal no está limitada a una región climática o geográfica y no se encuentran en todo el maíz que se produce o se almacena. Por tanto, las agencias gubernamentales de muchos países, ligadas a la salud y calidad de los alimentos, importadores o exportadores de maíz, han establecido normas y restricciones para algunas micotoxinas en la cadena alimentaria.

Es importante poner atención a los almacenamientos y a los transportes para evitar que niveles peligrosos de aflatoxinas lleguen a la población. También es importante destacar que las aflatoxinas tienen efecto acumulativo en los animales, por lo que no se debe despreciar la presencia de aflatoxinas aun en niveles por debajo de los establecidos en las normas (García *et al.*, 2001).

### **10.1 Prevención de la contaminación del maíz con aflatoxinas en el campo**

La prevención mediante el control antes de la cosecha es el primer paso para asegurar un producto final.

La invasión de *Aspergillus flavus* L. y producción de aflatoxinas ocurre frecuentemente en el campo, cuando el maíz es atacado por los gusanos de la mazorca. Una vez infectado el cultivo en las condiciones reinantes en el campo, la proliferación de los hongos proseguirá durante las etapas posteriores a la cosecha y el almacenamiento. Por consiguiente, el control antes de la cosecha está orientado a afrontar factores críticos que potencian la producción de micotoxinas. Algunas de las principales estrategias utilizadas son las siguientes:

- A) Manejo adecuado de riesgo y el estado del suelo (temperatura y una humedad relativa elevadas son esenciales para la germinación de las esporas y la

proliferación fungosa).

- B) Desarrollo de maíces comerciales resistentes a la invasión de los hongos toxígenos y a la síntesis de las aflatoxinas. Zuber *et al.* (1983); Widstrom *et al.* (1987); Zeringue y McCormick (1990); Zeringue *et al.* (1996) demostraron que diferentes genotipos de maíz tienen compuestos químicos volátiles que afectan significativamente el crecimiento de los hongos y la producción de aflatoxinas. En los genotipos resistentes se ha encontrado que tienen más altas concentraciones de ácido linoleico y ácido oleico que en las variedades susceptibles (Zeringue *et al.*, 1996). Wright *et al.* (2000) demostraron que en *A. parasiticus* S. el camfeno y el limoneno inhiben la producción de estas toxinas en un 33 y 90%, respectivamente. El 1-nonanol inhibe completamente la biosíntesis de las aflatoxinas. Estos compuestos volátiles inhiben el crecimiento de *A. flavus* L. y la producción de toxinas como una respuesta de la planta ante una infección por estos hongos (Zeringue *et al.*, 1996). La producción de aldehídos volátiles por la planta hospedera, es utilizada como resistencia a hongos que producen aflatoxinas. Sin embargo, no todos los compuestos volátiles son útiles contra la invasión de los hongos.
- C) Manejo adecuado de los residuos agrícolas, destrucción de malezas (medio apropiado para la supervivencia de esporas de hongos) y la práctica de la rotación de cultivos.
- D) Control de la infestación por insectos de los granos y prevención de daños mecánicos de los productos; daños que facilitan la entrada de *Aspergillus flavus* L. y *A. parasiticus* S. y por lo tanto la posterior producción de aflatoxinas.
- E) Cosechar tan pronto se alcance la madurez fisiológica del maíz, de tal manera que se evite que el grano permanezca mucho tiempo en el campo.

## 10.2. Control durante la cosecha

La cosecha debe llevarse a cabo sin dañar mecánicamente el grano; ese daño facilita el establecimiento de los hongos. La cosecha debe de ser rápida, ya que

algunos estudios han indicado que los cultivos que se dejan en el campo durante más tiempo presentan niveles más altos de contaminación con aflatoxinas.

### **10.3. Control después de la cosecha y descontaminación**

Es esencial que el producto esté suficientemente seco para evitar la proliferación de hongos durante el almacenamiento.

Aunque la prevención es la mejor estrategia de control, no siempre es posible lograrlo, y habrá contaminaciones con aflatoxinas. Por consiguiente, los procedimientos de control después de la cosecha y de descontaminación representan un medio importante para evitar la exposición de los consumidores. Entre los criterios específicos para la evaluación y aceptación de determinados procedimientos de reducción de las micotoxinas o de descontaminación se incluyen los siguientes:

- a. Inactivar, o eliminar las toxinas.
- b. En los productos, como el maíz para el ganado, no deben quedar toxinas por arriba de los límites establecidos por las normas.
- c. Conservar el valor nutritivo y la aceptabilidad del producto para alimento animal.
- d. No alterar de modo apreciable las propiedades físicas y nutricionales del producto.
- e. Si es posible, destruir las esporas de los hongos toxigénicos, que no vayan en el alimento descontaminado.

## **11. DESCONTAMINACIÓN DE LOS ALIMENTOS CON AFLATOXINAS**

El riesgo provocado por el posible consumo de aflatoxinas, ha llevado al desarrollo de métodos para su eliminación. En la detoxificación se han propuesto varios métodos, que incluyen tratamientos químicos y físicos o ambos. No se debe ocasionar alteraciones organolépticas ni nutricionales en los alimentos.

La molécula de la AFB1 muestra dos sitios importantes de actividad tóxica, el primero se localiza en el doble enlace de la posición 8, 9 del anillo furano y el segundo sitio reactivo se encuentra en el anillo de la lactona, el cual es fácilmente hidrolizable, y

es el responsable de la fluorescencia. Lo que sugiere que al remover el doble enlace o abrir el anillo de la lactona, se puede degradar la molécula (Samarajeewa *et al.*, 1990).

### **11.1. Tratamientos químicos**

Se ha demostrado que la reducción de la contaminación de alimentos con aflatoxinas es factible y práctica, si se hace por medio de tratamientos químicos. Para éstos se han empleado diversos agentes químicos, los más eficientes son los agentes colorantes, oxidantes e hidrolíticos. Es importante señalar que la mayoría de los estudios se han realizado con la AFB1 pura. Dichas sustancias actúan en alguno de los sitios activos de la molécula de la AFB1 (residuo de cumarina y doble enlace terminal en el furano), provocando con ello su degradación.

#### **11.1.1. Alcalinización**

Se ha postulado que el tratamiento alcalino provoca la degradación de la AFB1 y esto lo hace abriendo (hidrólisis) el anillo de lactona presente en la molécula (Samarajeewa *et al.*, 1990).

#### **11.1.2. Amoniaco.**

El amoniaco en estado gaseoso o en soluciones, con o sin aplicación de temperaturas, y con o sin presión, parece ser la forma más eficiente para descontaminar materiales con aflatoxinas.

Este medio puede reducir los niveles de aflatoxinas en maíz y sus productos hasta en un 90%. Sin embargo, aun cuando el proceso de amoniación incrementa el nivel total de nitrógeno, el contenido de lisina y metionina se ven disminuidos, lo que le confiere menor valor nutricional al alimento (Samarajeewa *et al.*, 1990).

#### **11.1.3 Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Este compuesto ha sido empleado como técnica común para la descontaminación oxidativa de pastas de cacahuate contaminadas con aflatoxinas. La adición de compuestos básicos facilita la degradación oxidativa de la toxina y ello ocurre

por el ataque del peróxido al anillo de furano que facilita que se reduzca el doble enlace en la molécula de toxina.

Un 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ha sido empleado en maíz para reducir los niveles de aflatoxinas de 397 ppb a menos de 20 ppb, además las pérdidas de proteínas y lípidos son menores de 6% (Ellis *et al.*, 1991). Se ha observado que los residuos presentes en alimentos tratados con este químico no son tóxicos por si solos (Samarajeewa *et al.*, 1990).

#### **11.1.4. Peroxidasa**

La AFB1 producida por *A. flavus* L. , fue detoxificada *in vitro* , hasta un 60% por la peroxidasa de rabano comercial. Se extrajeron y purificaron parcialmente peroxidases de la raíz del rábano fresco, se agregaron sobre la toxina *in vitro* con la reducción aproximadamente entre 30 y 38% en los niveles de ésta. La reacción enzimática óptima ocurre en un buffer de fosfato a una temperatura de 20°C, pH6, en un tiempo de incubación de 60 min. y presión normal (Das y Mishra, 2000).

#### **11.1.5 Hipoclorito de sodio**

Se ha demostrado que este compuesto tiene efectos positivos en la degradación de aflatoxinas en alimentos. Se han probado soluciones con diferentes concentraciones y se encontró una degradación casi total tanto cuando se utilizó la AFB1 pura, como en alimentos para ganado (Mann *et al.*, 1970). Sin embargo la presencia de cloro residual en alimentos tratados, la producción de grasas modificadas y proteínas con toxicidad desconocida debidas al tratamiento aplicado deben ser estudiadas más a fondo para evitar daño a la salud (Samarajeewa *et al.*, 1990).

#### **11.1.6. Ozono**

Es un agente oxidante muy poderoso, por lo que tiene un potencial elevado para la degradación de aflatoxinas mediante el ataque al doble enlace 8, 9 del anillo furano.

Se ha informado que el ozono reduce los niveles hasta en un 91% en semillas de algodón (con 22% de humedad), tratamiento que degradó la calidad nutricia, ya que el

contenido de lisina se vió disminuido, siendo esto una desventaja de este método (Samarajeewa *et al.*, 1990).

#### **11.1.7. Otros sustancias químicas**

Una variedad de otros químicos han sido probados para evaluar su habilidad en la destrucción de aflatoxinas. De ellos se han preparado soluciones conteniendo diferentes concentraciones de metanol, aldehídos, peróxido de benzoilo, permanganato de potasio, los cuales son notablemente eficientes, sin embargo su aplicación en alimentos es restringida por problemas de salud que pueden causar los residuos químicos (Samarajeewa *et al.*, 1990).

### **11.2. Tratamientos físicos**

#### **11.2.1 Temperatura**

Las aflatoxinas pueden ser destruidas parcialmente por tostado o rostizado, estando directamente relacionado con la temperatura empleada, el tiempo y el contenido de humedad. En cuanto a otros tratamientos térmicos (pasteurización, horneado, esterilización, etc.) los datos son contradictorios (Purchase *et al.*, 1972; Stoloff *et al.*, 1975). La AFB1 es estable a 260°C, siendo su punto de fusión, y aunque la temperatura de descomposición es de 269°C, se ha observado que en algunos alimentos se necesitan temperaturas tan altas como 300°C para eliminar la toxina. Las temperaturas necesarias van a depender de las condiciones ambientales a las que estén expuestas las aflatoxinas (Samarajeewa *et al.*, 1990). Por lo tanto debe tenerse especial cuidado en las condiciones bajo las cuales se cultiva el maíz, así como en las prácticas de almacenamiento de los granos; ésto es, en su etapa de poscosecha.

#### **11.2.2. Radiaciones**

Bajo condiciones apropiadas de luz, las aflatoxinas pueden ser degradadas, especialmente con la luz ultravioleta. La luz solar ha sido utilizada para reducir los niveles de aflatoxinas en pastas de cacahuete y aceites vegetales (Rustom, 1997).

La luz ultravioleta ha sido ampliamente utilizada en la degradación de AFB1 en leche, el proceso puede llegar a eliminar toda la toxina de la leche y lo hace más eficiente en presencia de peróxido de hidrógeno (Yousef y Marth, 1987). La AFB1 absorbe radiación UV en su mayoría a 362 nm en la cual su actividad aumenta haciéndose más susceptible a su degradación, siendo afectada en la parte terminal del anillo furano. Sin embargo, pruebas de laboratorio indican un uso limitado ya que los compuestos de degradación parecen ser tóxicos (Samarajeewa *et al.*, 1990).

La radiación gama aplicada a semillas de *Nigella sativa* invadida de *Aspergillus flavus* L., se indicó que ninguna cepa radioresistente puede producir micotoxinas, encontrando que estaban libres de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2. La radiación gama en una dosis de 6.0 kG hizo que las semillas estuvieran libres de hongos. La radiación gama causa inhibición de la germinación de las esporas y como consecuencia decrece el peso seco del micelio (El-Bazza *et al.*, 2001).

### **11.2.3. Atmósferas modificadas**

Una atmósfera modificada es aquella en la cual la composición normal del aire ha sido cambiada; regularmente se disminuye la cantidad de O<sub>2</sub> mientras que se aumentan las concentraciones de CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>. Este tipo de tratamientos ha sido utilizado para controlar el crecimiento de *A. flavus* L. y con ello la producción de aflatoxinas (Moreno *et al.*, 1987; Ellis *et al.*, 1991; Dharmaputra *et al.*, 2000 ).

### **11.2.4. Adsorción**

Masimango *et al.* (1978) mostraron que la AFB1 en solución era adsorbida por la bentonita cuando ésta se adicionaba a la solución, de tal forma que al remover la bentonita se observó que gran parte del contenido de la aflatoxina presente era removida de la solución. La característica de la bentonita de adsorber y retener las aflatoxinas, depende del tamaño de la partícula y de la temperatura del tratamiento (Ellis *et al.*, 1991).

Los aluminio-silicatos de sodio y de calcio tienen una alta afinidad por las AFB1. En un estudio se observó que el 80% de las aflatoxinas se removieron en la solución.

Además en estudios *in vivo* se demostró que los aluminio-silicatos previenen la mutagenicidad y la toxicidad de la AFB1 (Rustom, 1997).

## **12. METODOS PARA DETECTAR Y CUANTIFICAR AFLATOXINAS EN MAIZ**

### **12.1. La luz negra**

El maíz contaminado con *A. flavus* L. producen una característica fluorescencia verde-amarillo brillante cuando es examinado en un cuarto oscuro bajo una longitud de onda corta de luz ultravioleta que es comúnmente llamada luz negra (254 nm). Esta fluorescencia es el resultado de las propiedades del ácido kójico que es otro compuesto producido por *A. flavus* L., y que no está relacionado directamente con la aflatoxina. La prueba de luz negra es una prueba presuntiva y asume la presencia de aflatoxinas, por la presencia del ácido kójico que indica que *A. flavus* L. está presente. Este método no determina la cantidad de aflatoxinas totales.

Prueba de minicolumna o prueba de minicolumna de Holiday. Esta es una prueba para determinar aflatoxinas. Esta es rápida y relativamente económica. Es comúnmente empleada para determinar si las aflatoxinas en el maíz excede de 20 ppb. si la muestra utilizada para el análisis es representativa de la carga completa. Este método es aceptado para determinar si la carga es aceptada o rechazada.

### **12.2. Cromatografía de capa fina (TLC)**

La técnica de cromatografía de capa fina determina las aflatoxinas y es más precisa la medida para determinar la concentración de aflatoxinas en maíz. El método de extracción y extracción de aflatoxinas es aceptado por la AOAC (1995). Este método es empleado en pruebas de laboratorio. Detecta niveles bajos como 1ng/g.

### **12.3. Kits de pruebas rápidas**

Con estas pruebas se puede determinar las concentraciones de aflatoxinas en maíz como son Aflatest (20-30 min), Agri-Screen (30-40 min) Ez-Screen y Quick-Card (30 min).

#### **12.4. Cromatografía líquida (HPLC)**

Es similar al TLC en muchos aspectos, incluye una aplicación, una fase estacionaria y una fase móvil. Los métodos de cromatografía líquida determinan las aflatoxinas en los alimentos, incluyen una fase normal, una fase reversa y una prederivatización antes de pasar por la columna. La fase reversa es seguida por una post columna, la fase reversa es en donde se hace la detección electroquímica y por fluorescencia.

#### **12.5. Inmunoafinidad en columna con anticuerpos monoclonales**

Este método consiste en el uso de anticuerpos inmovilizados para aislar AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, y AFM1 de extractos de forrajes, alimentos, granos, leche y sus productos (Vicam, 1999).

Los anticuerpos están químicamente ligados a pequeñas esferas de vidrio y empacados en una columna, éstos actúan selectivamente atrapando a las aflatoxinas y todos los demás componentes se eluyen de la columna mediante lavados. Finalmente las aflatoxinas son removidas empleando un solvente, y una vez separadas, la medición se hace directamente en un fluorómetro, ó por HPLC o también por TLC (Vicam, 1999).

La ventaja analítica más importante del Aflatest, es la rapidez en eliminar todas las interferencias en el primer paso, así como los bajos niveles de detección que son de 0.5 ppb (Hansen, 1990). Sin embargo, una de las limitantes de este método (hecho expreso para granos), es que no puede ser empleado en el análisis de aflatoxinas en otros productos, como tejidos animales, debido a compuestos presentes en los extractos los cuales pueden causar interferencia, pudiendo bloquear los sitios de unión de los anticuerpos, haciendo prácticamente imposible la determinación.

### 13. LEGISLACIÓN INTERNACIONAL

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

Producto	Límite máximo de aflatoxinas (µg/kg)
Masa	12
Tortilla de maíz nixtamalizado.	12
Tostada de maíz nixtamalizado.	12
Harina de maíz nixtamalizado para preparar tortillas y tostadas.	12
Tortillas de trigo.	20
Tortillas integrales.	20
Harinas para preparar tortillas de trigo.	20
Harinas integrales para preparar tortillas.	20

#### Niveles permitidos de aflatoxinas en diferentes alimentos de consumo humano. (Secretaria de Salud en Italia, 1999).

AFLATOXINAS	PRODUCTO	µg/Kg
Aflatoxinas B1	Condimentos	10
Aflatoxinas B1	Hierbas de té	5
Aflatoxinas totales (B1, B2, G1, G2)	Comida para bebé	0.1
Aflatoxinas totales (B1, B2, G1, G2)	Condimentos	20

Reglamento técnico Mercosur sobre límites máximos de aflatoxinas admisibles en leche, maní y maíz .

**LIMITES MÁXIMOS ADMISIBLES DE CONCENTRACIÓN DE AFLATOXINAS**

<b>ALIMENTO</b>	<b>AFLATOXINA</b>	<b>LÍMITE</b>
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 (entero, partido, aplastado)	B1+B2+G1+G2	20 µg/kg
2.2. Harinas o sémolas de maíz		
3. Maní		
3.1. Maní B1+B2+G1+G2 (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)		

**MERCOSUR/GMC/RES. Nº 25/02**

**Límites permitidos para consumo animal en Estados Unidos (FDA).**

<b>Especie/ etapa de producción</b>	<b>Limite Máximo µg/Kg</b>
Humanos	20
Aves	20
Aves adultas /excepto de engorda)	100
Ganado lechero	20
Cerdos de engorda:	
Entre 25 y 45 Kg	100
Mayores de 45 Kg	200
Adultos destinados a reproducción	100
Rumiantes:	
Adultos destinados a reproducción	100
De engorda en etapa de finalización (para carne)	300

## JUSTIFICACIÓN.

En México no se han realizado estudios específicos en las especies nativas del grupo *A. flavus* Link, concernientes a la relación de las características morfológicas de estas especies con la producción de aflatoxinas. Así mismo, se creyó conveniente estudiar comparativamente la producción de diferentes cepas de las dos especies *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare; aisladas de productos de consumo normal en el mercado nacional.

Por otra parte, se consideró importante el estudiar el efecto de diferentes condiciones de humedad, temperatura y de sustrato, líquido y sólido, sobre la producción de aflatoxinas; considerando que aún se requiere de esta información para definir el rango de condiciones ambientales que permiten el desarrollo de estos hongos y la producción de aflatoxinas que representan un alto riesgo para la salud humana y animal.

### III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### **Objetivo General**

Caracterizar las cepas de *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare en relación a su morfología y a su producción de aflatoxinas.

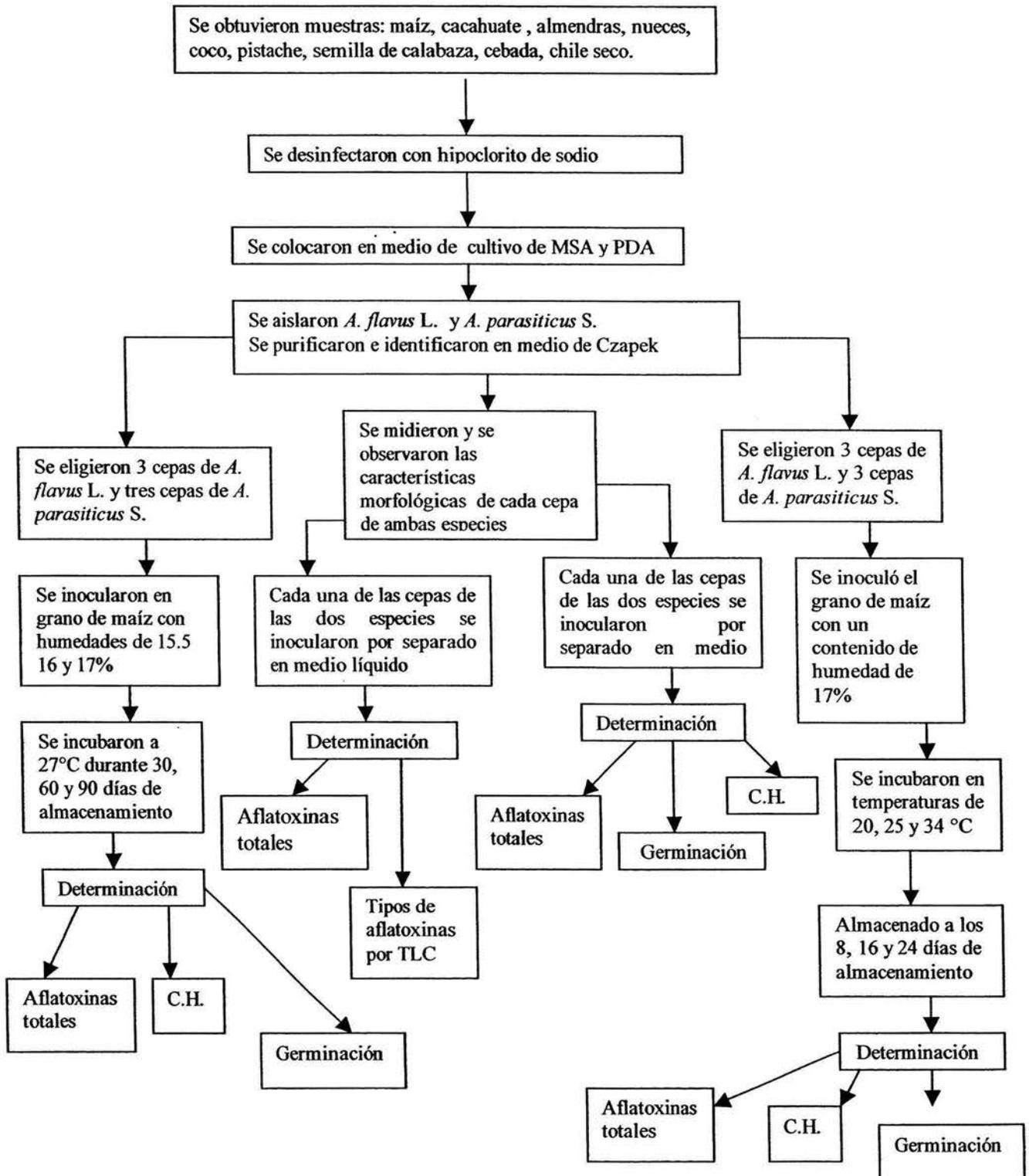
#### **Objetivos Específicos:**

- a) Obtener diferentes cepas de *Aspergillus flavus* Link y *A.parasiticus* Speare de diferentes sustratos.
  
- b) Estudiar la relación de la morfología externa de los hongos *Aspergillus flavus* Link y *A.parasiticus* Speare y la producción o no producción de aflatoxinas.
  
- c) Evaluar la capacidad de producción de aflatoxinas de cada cepa en condiciones óptimas, en medio líquido y medio sólido ( granos de maíz).
  
- e) Determinar el efecto de la humedad, de la temperatura y del tiempo de incubación en la producción de aflatoxinas entre tres cepas de *Aspergillus flavus* Link y tres cepas de *Aspergillus parasiticus* Speare.
  
- f) Estudiar el efecto de la actividad de las especies de *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare productoras de aflatoxinas y no productoras sobre la germinación de los granos de maíz.

## HIPÓTESIS

Las cepas nativas de *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare presentan una alta diversidad en la producción de aflatoxinas, en diferentes condiciones de almacenamiento en granos de maíz y en medio de cultivo líquido. Así como notables diferencias morfológicas entre las cepas de la misma especie.

## DIAGRAMA DE TRABAJO



## IV. MATERIALES Y METODOS

### 1. Aislamiento e identificación de cepas de *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare

#### 1.1. Cepas de *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare

Se aislaron diferentes cepas de *Aspergillus flavus* L. y *A. parasiticus* S. provenientes de diversos productos comerciales como maíz, cacahuete, chile, coco, nuez, pistache, almendra y semillas de calabaza. Las semillas o granos fueron desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, durante un minuto, para ser "sembradas" en cajas de petri, con los medios de cultivo malta-salagar (MSA, 6% de cloruro de sodio) y de papa dextrosa agar (PDA). La temperatura de incubación fue de 27°C durante 7 días. Después se aislaron las cepas y se purificaron en MSA.

#### 1.2. Identificación y características morfológicas de cada cepa aislada

La identificación de las cepas se realizó en el medio de cultivo Czapek recomendado por Raper y Fennell (1965). Las esporas de cada cepa se colocaron en el centro de la caja de petri con el medio de cultivo de Czapek. Cada cepa se dejó crecer durante 10 días a 27 °C y se identificó mediante la medición del tamaño de la colonia; el tamaño y color de los esclerocios, el tamaño de los conidios, y se tomó en cuenta el color de la colonia, la forma de la cabezuela, si es biseriada o monoseriada, crecimiento de la colonia y el micelio para identificarlas de acuerdo a las características señaladas por Raper y Fennell (1965), para las especies del grupo *Aspergillus flavus*. Durante el tiempo de experimentación y para su conservación, las cepas de *Aspergillus flavus* L. y *A. parasiticus* S. se mantuvieron a 4°C en medio de cultivo de MSA, PDA y tierra.

## **2. Cultivo de las cepas de *Aspergillus flavus* L. y *A. parasiticus* S. en medio líquido de arroz y maíz, para caracterizar las cepas en función de la producción de aflatoxinas**

### **2.1. Suspensión de esporas para inocular en medio líquido con harina arroz**

Para definir la capacidad productora de aflatoxinas de cada especie en medio líquido de harina de arroz, se procedió a preparar el inóculo para agregarlo al medio de cultivo mencionado para observar la producción de aflatoxinas de cada una de las cepas, tanto de *A. flavus* L. como de *A. parasiticus* S., aisladas de los diversos productos alimenticios arriba señalados.

De cada cepa cultivada en el medio de Czapek, se obtuvo con el sacabocado del número 2, una porción de agar con el hongo, la que se colocó en un tubo de ensaye con 20 ml de agua destilada estéril y tween 80 al 0.05 %; el tubo se agitó para homogenizar las esporas en el agua. Posteriormente, se realizó el conteo de esporas (aproximadamente 364,000 esporas / ml) con la cámara de Neubauer (French y Teddy, 1982). Esta suspensión con esporas se utilizó para inocular tanto los granos de maíz como el medio líquido con arroz.

### **2.2. Medio líquido para la producción de aflatoxinas**

El medio líquido que se usó para estudiar la capacidad productora de aflatoxinas de las cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. fue el recomendado por Misra y Sinha (1979). Para lo cual, se añadió 40 g de harina de arroz en 500 ml de agua destilada y se hirvió durante 15 minutos; después se filtró a través de una gasa, y se agregaron 30 g de sacarosa, 1 g de extracto de levadura, aforándose con agua destilada hasta obtener 1000 ml. Una vez que el material se disolvió perfectamente, se colocaron 50 ml en matraces de 250 ml. El medio se esterilizó en el autoclave durante 15 minutos a 120°C. Cada matraz conteniendo el medio de arroz líquido, se inoculó con 1 ml de la

suspensión de esporas (364,000 esporas/ ml aproximadamente); a la suspensión se le agregó tween 80 (0.05%) para romper la tensión superficial de las esporas y así permitir una distribución más homogénea de las esporas en la suspensión. Los matraces con el medio inoculado, se incubaron a 27°C durante 7 días; agitándose manualmente dos veces al día. A los 7 días se esterilizaron los matraces en autoclave durante 15 minutos a 120 °C y 15 lb. de presión.

### **2.3. Cuantificación de la producción de aflatoxinas en medio líquido de arroz, de cada cepa de las dos especies de *Aspergillus***

Se colocaron 25 ml del medio líquido de cada cepa, mas 25 ml de metanol al 80 % y 2.5 g de NaCl, se agitó durante tres minutos manualmente, se filtró con papel filtro aflautado; del filtrado se tomaron 10 ml y se agregaron 40 ml de agua destilada. Posteriormente, se filtró con papel fibra de vidrio, del filtrado se tomaron 10 ml y se pasaron por la columna del AflaTest-p, se lavó la columna con 10 ml de agua destilada dos veces y por la columna se pasó posteriormente 1 ml de metanol grado HPLC, recolectándose en un tubo, al cual se le agregó 1 ml de la solución reveladora (bromo) al 1% y se tomó la lectura en el fluorómetro de VICAM serie 4 (Candlish *et al.*, 1991). Todo esto, de acuerdo al método para harina de arroz de AflaTest (VICAM, 1999).

### **3. Producción de aflatoxinas por las diferentes cepas de *Aspergillus flavus* L. y *A. parasiticus* S. en medio sólido (grano de maíz)**

#### **3.1. Maíz**

Se utilizaron granos de maíz blanco AS-900 proporcionado por la Asociación de Productores de Semilla del Estado de México, S.A de C.V. El maíz a su arribo al laboratorio, se almacenó en bolsas de polietileno a una temperatura de 7°C, hasta su utilización.

### **3.2. Contenido de humedad del maíz**

Se procedió de acuerdo al método 44-19 de la AACC (1983). Cuatro gramos de muestra de maíz (grano entero) se colocaron en cajas de aluminio en una estufa con circulación forzada de aire a 103°C durante 72 hrs. Las mediciones se hicieron por triplicado.

### **3.3. Suspensión de esporas para inocular el medio sólido (grano de maíz)**

La suspensión de esporas se realizó como se menciona en el punto 2.1

### **3.4. Inoculación del grano de maíz con las cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., para la producción de aflatoxinas**

Para cada una de las dos especies productoras de aflatoxinas, se tuvo un lote de 114 unidades experimentales de 200 g cada una de maíz, con un contenido de humedad de 18% (con tres repeticiones por cepa); las cuales fueron preparadas de la siguiente manera:

Las muestras de 200 g de maíz fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2% durante 1 minuto, se secaron los granos de maíz en una campana de flujo laminar para evitar que se contaminaran. Una vez secas y conociendo su contenido de humedad, los granos de maíz fueron colocadas en frascos estériles de 250 ml. El contenido de humedad fue ajustado a 18% mediante la adición de agua destilada estéril de acuerdo al método de Pixtón (1982).

Durante el proceso de ajuste de la humedad a 18%, se llevo acabo la inoculación con la suspensión de esporas (aproximadamente 364,000 esporas /ml), tanto de las cepas de *Aspergillus flavus* L. como de las cepas de *Aspergillus parasiticus* S., todo esto por separado, es decir, en cada lote de unidades experimentales de cada especie de *Aspergillus*.

Para mantener la humedad del maíz a un contenido de humedad de 18% los frascos con maíz fueron colocados en cajas de plástico (cámara húmeda) que contenían una solución sobresaturada de cloruro de potasio (2000 ml de agua y 500 g de cloruro de potasio); las que se almacenaron a una temperatura de 27°C, durante 30 días, con tres repeticiones de cada cepa. En cada muestreo se determinó el contenido de humedad del grano, su germinación y contenido de aflatoxinas.

### **3.5. Prueba de germinación en maíz**

Se realizó una prueba de germinación para cada muestra de maíz inoculado con cada cepa de *Aspergillus flavus* L. y *Aspergillus parasiticus* S., para ver el efecto fitopatogénico de las cepas productoras y de cepas no productoras de aflatoxinas. La germinación de los granos de maíz se determinó con doscientas semillas (cuatro repeticiones de 50 semillas) de cada unidad experimental, en toallas de papel húmedas enrolladas, incubadas a 25° C durante siete días (ISTA, 1996).

### **3.6. Determinación de aflatoxinas totales en grano de maíz**

Para la determinación de aflatoxinas totales se procedió de acuerdo al método 991.31 de la AOAC (1995), (aplicable para la determinación de AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 a concentraciones mayores o iguales a 10 ppb en maíz o crema de cacahuate).

**Extracción de la muestra:** Se pesaron 50 gr de maíz de cada muestra, más 5 gr de sal (NaCl) y se colocaron en un vaso de licuadora, después se añadieron 100 ml de metanol al 80% (80:20 de agua). Se molió por 1 min a alta velocidad. Se vació el extracto en un embudo con papel filtro Whatman No. 1 aflautado y se colectó el filtrado en una probeta de 100 ml.

**Dilución del extracto:** Se tomaron 10 ml del extracto filtrado. Se colocó en un vaso de precipitado con 40 ml de agua destilada. Se mezcló bien. El filtrado del extracto diluido se pasó por un filtro de fibra de vidrio y se colectó este filtrado en un vaso de

precipitado. Se pasaron 10 ml del filtrado del extracto diluido (10 ml =1.0 g muestra equivalente) a través de la columna de afinidad AflaTest-P con anticuerpos monoclonales en una proporción de 1-2 gotas por segundo. Se pasaron 10 ml de agua destilada a través de la columna en una proporción de 2 gotas por segundo.

Se repitió este paso. Se eluyó en la columna de afinidad pasando 1 ml de metanol grado HPLC a través de la columna en una proporción de 1-2 gotas por segundo y se colectó toda la muestra eluída (1 ml) en una cubeta de vidrio. Se añadió 1.0 ml del revelador AflaTest para eluir en la cubeta. Se mezcló bien y se colocó la cubeta en el fluorómetro VICAM serie 4, calibrado previamente y se tomó la lectura después de 60 segundos de la concentración de aflatoxinas (Candlish *et al.*, 1991).

### **3.7. Determinación de aflatoxinas totales realizando dilución**

Método para la determinación de aflatoxinas en maíz, granos y alimentos (para muestras con mas de 300 ppb), se procedió de la siguiente manera:

**Extracción de la muestra:** Se pesaron 50 gr de la muestra con 5 gr de NaCl y se licuó con 100 ml de metanol al 80% (80:20% de agua), durante 1 minuto a alta velocidad. Se filtro con papel filtro Whatman del No.1.

**Dilución del extracto:** Se agregó 1.0 ml del filtrado en un vaso de precipitado con 49 ml de metanol al 15% (15:85% agua). Se mezcló bien la solución y después se filtró con un filtro de fibra de vidrio. Posteriormente se pasó 1.0 ml del filtrado por las columnas de AflaTest-p con anticuerpos monoclonales (1 ml= 0.1g de la muestra ). Se lavó dos veces la columna con 5 ml de agua, se obtuvieron las aflatoxinas agregando 1.0 ml de metanol grado HPLC y se colectó en una cubeta de vidrio y se añadió 1.0 ml del revelador AflaTest, se agitó por un minuto y se leyó en el fluorómetro marca VICAM serie 4. **Nota:** El resultado se multiplicó por 20 para obtener las partes por billón de aflatoxinas totales de los 50 gr del extracto de la muestra.

### **3.8. Cromatografía en capa fina (TLC) para determinar las aflatoxinas**

Para obtener y purificar las aflatoxinas se utilizó con la técnica de AflaTest. El eluido final que se obtuvo en las columnas de aflaTest-p con metanol y aflatoxinas, se colocaron en viales y se secaron con nitrógeno (99.9%) en baño María y después fueron guardados en el congelador hasta la realización del análisis.

**Método para el análisis de aflatoxinas (García,1989):** A los viales con la aflatoxina se les agregaron 200 µl de benceno/ acetonitrilo (98: 2), se agitaron en un vortex. Después a cada muestra se le aplicó la solución con una micro jeringa sobre placas de cromatografía de sílica gel 60 de 20x 20 cm (MERCK), la cual se activó previamente a 105°C. Cada muestra se hizo por triplicado y también se aplicó en la placa el estándar de aflatoxinas (B1 5 µg, B2 1.5 µg, G1 5 µg, G2 1.5 µg) Sigma Chemical Co. Ltd (St Louis, MO, USA).

En la cámara de desarrollo se agregó el solvente de desarrollo de acetona/ cloroformo (1:9), hasta cubrir dos centímetros de la cámara, posteriormente se colocaron las placas de sílica gel con las muestras aplicadas y se permitió que corriera el solvente en la placa durante 30 min. aproximadamente. Se deja evaporó el solvente de la placa y se observaron las aflatoxinas con luz ultravioleta de onda larga (360 nm).

**Pruebas confirmatorias:** Las manchas en la placa de cromatografía se asperjaron con una solución de ácido sulfúrico /agua destilada (1/3 v/v). Con esta solución las manchas de aflatoxinas viran a un tono amarillo al ser observadas bajo luz ultravioleta de onda larga (360 nm), método 26.083 del AOAC (1984).

### **3.9 Análisis estadístico**

Referente a la producción de aflatoxinas en medio líquido con harina de arroz y grano de maíz, el diseño experimental utilizado fue un diseño completamente al azar y

su análisis se llevó a cabo bajo el mismo diseño en el paquete estadístico SAS versión 6.12 (1989), siendo el modelo lineal el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Valor Observado.  
 $\mu$  = Efecto de la media.  
 $G_i$  = Efecto de las cepas.  
 $\varepsilon_{ij}$  = Error experimental.

Los valores de producción de los granos de maíz fueron transformados en valores de raíz cuarta ( $\sqrt[4]{XX}$ ) (Steele y Torrie, 1986), con la finalidad de reducir los coeficientes de variación. La estimación del coeficiente de variación se calculó mediante la formula:

$$C.V. (\%) = \frac{\sqrt{CMEE}}{\text{Media general}} * 100$$

CMEE = Cuadrado medio del error experimental.

La comparación de medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Scheffe al nivel de 0.05 de probabilidad para aquellas variables que presentaron diferencias estadísticas.

#### **4. Producción de aflatoxinas en grano de maíz con diferentes contenidos de humedad**

##### **4.1. Maíz**

Se utilizó maíz del mismo lote de AS-900 señalado en el punto 3.1.

##### **4.2. Contenido de humedad del maíz**

Se procedió de acuerdo al método 44-19 de la AACC (1983). Mencionado en el punto 3.2.

#### **4.3. Suspensión de esporas, para inocular el grano de maíz**

Las 3 cepas seleccionadas de *Aspergillus flavus* L. y 3 cepas de *A. parasiticus* S., fueron sembradas por separado en cajas de petri con medio de Czapek y se dejaron crecer durante 7 días a 27 °C. Posteriormente, a cada una de estas cajas de petri se les agregó 10 ml de agua destilada estéril con tween 80 al 0.05% y se rasparon las colonias para desprender el hongo, posteriormente se filtró (papel poro mediano) hasta completar 50 ml de la suspensión, se agitó para que se homogenizaran las esporas en el agua. El conteo de las esporas en la suspensión se realizó en una cámara de Newbauer (aproximadamente 725,000 esporas por ml). Esta suspensión fue utilizada para inocular en maíz que se almacenó con diferentes contenidos de humedad.

#### **4.5. Almacenamiento del maíz inoculado con tres cepas de *A. flavus* Link y tres cepas de *A. parasiticus* Speare con diferente capacidad para producir aflatoxinas**

El maíz se inoculó con una suspensión de 725,000 esporas/ml con cada una de las cepas de *Aspergillus* y fue almacenado con un contenido de humedad ajustado al 15.5, 16.0 y 17.0% de acuerdo a Pixton (1982).

Para mantener la humedad del grano de maíz alrededor de 15%, durante el período de almacenamiento, se colocaron los frascos con maíz en cajas de plástico (cámaras húmedas) que contenían una solución sobresaturada de cloruro de sodio (1500 ml de agua y 1800 g de cloruro de sodio); para la humedad de 16% , se utilizó una solución sobresaturada de sulfato de amonio (con 1500 ml de agua y 800 g de sulfato de amonio) y para el contenido de humedad de 17%, se utilizaron cámaras sobresaturadas de cloruro de potasio ( 2000 ml de agua y 600 gr. de cloruro de potasio), cada frasco, o unidad experimental, se tapó con plástico delgado y se le hicieron 10 perforaciones con un alfiler, con la finalidad de evitar la posible acumulación de bióxido de carbono. Las cámaras húmedas con las unidades experimentales

conteniendo el grano de maíz, fueron almacenadas a una temperatura de 27°C; temperatura que favorece la producción de aflatoxinas. El período de almacenamiento fue de 90 días, con muestreos a 0, 30, 60 y 90 días. En cada muestreo se determinó la humedad, germinación y producción de aflatoxinas.

#### **4.6. Prueba de germinación en maíz**

Se realizó una prueba de germinación para cada muestra de maíz inoculado con cada cepa de *Aspergillus flavus* L. y *A. parasiticus* S. para ver el efecto fitopatogénico de las cepas consideradas como altamente productoras, medianamente productoras y no productoras en las semillas almacenadas a diferentes humedades. La germinación de los granos de maíz se determinó como se mencionó en el punto 3.5.

#### **4.7. Determinación de aflatoxinas totales**

Para la determinación de aflatoxinas totales se procedió de acuerdo al método 991.31 de la AOAC (1995) como se mencionó en el punto 3.6.

#### **4.8. Determinación de aflatoxinas totales realizando dilución**

Método para maíz, granos y alimentos (para muestras con mas de 300 ppb). Esta metodología se mencionó en el punto 3.7.

#### **4.9 Análisis estadístico**

El diseño experimental utilizado fue un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial, donde el factor "A" correspondió a los contenidos de humedad de las semillas almacenadas y el factor "B" fue para las cepas de *Aspergillus* estudiadas, ambos para cada tiempo de muestreo. El análisis se llevó a cabo bajo el mismo diseño en el paquete estadístico SAS versión 6.12 (1989), siendo el modelo lineal utilizado:

$$Y_{ij} = \mu + H_i + C_j + HC_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Valor Observado.

$\mu$  = Efecto de la media.

$H_i$  = Efecto de los contenidos de humedad de las semillas almacenadas.

$C_j$  = Efecto de las cepas.

$HC_{ij}$  = Efecto de la interacción de los contenidos de humedad y cepas de *Aspergillus*.

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental.

Los valores de producción de aflatoxinas fueron transformados en valores de raíz cuarta ( $\sqrt[4]{XX}$ ) (Steele y Torrie, 1986), con la finalidad de reducir los coeficientes de variación. Mientras que los valores de germinación y contenido de humedad no fueron transformados. El cálculo del coeficiente de variación se realizó mediante la fórmula siguiente:

$$C.V. (\%) = \frac{\sqrt{C.M.E.E.}}{\text{Media general}} * 100$$

C.M.E.E. = Cuadrado medio del error experimental.

La comparación de medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Scheffe al nivel de 0.05 de probabilidad para aquellas variables que presentaron diferencias estadísticas.

## **5. Producción de aflatoxinas en maíz a diferentes temperaturas de almacenamiento.**

### **5.1. Maíz**

Se utilizaron granos de maíz blanco del lote de AS-900, mencionado en el punto 3.1.

### **5.2. Contenido de humedad del maíz**

Se procedió de acuerdo al método 44-19 de la AACC (1983) referido anteriormente en el punto 3.2.

### **5.3. Suspensión de esporas, para inocular el grano de maíz**

Las 3 cepas seleccionadas de *Aspergillus flavus* L. y 3 cepas de *A. parasiticus* S., se sembraron en cajas de petri con medio de Czapek y se dejaron crecer durante 7 días a 27 °C. Posteriormente, a cada una de estas cajas de petri se les agregó 10 ml de agua destilada estéril con tween 80 al 0.05% y se rasparon las colonias para desprender el hongo, posteriormente se filtró (papel poro mediano) hasta completar 50 ml de la suspensión, se agitó para que se homogenizaran las esporas en el agua. El conteo de las esporas en la suspensión se realizó en una cámara de Newbauer (aproximadamente 725,000 esporas por ml). Esta suspensión fue utilizada para inocular el maíz que se almacenó a diferentes temperaturas.

### **5.4. Almacenamiento del maíz a temperaturas de 20, 27 y 34 °C e inoculado con cepas e las dos especies de *Aspergillus* en estudio, con diferente capacidad de producción de aflatoxinas**

Para esta parte de la investigación, el maíz utilizado fue superficialmente desinfectado con hipoclorito de sodio al 2% durante un minuto. En este caso, el contenido de humedad del maíz se ajustó a 17%, e igualmente se inoculó con cepas de diferente capacidad productora de aflatoxinas, una altamente productora; una cepa medianamente productora y otra cepa no productora para cada especie de *Aspergillus*. Al momento de ajustar el contenido de humedad se inoculó con una suspensión de esporas de 725, 000 esporas/ml. Para mantener la humedad del maíz, las unidades experimentales fueron colocadas en una cámara húmeda conteniendo una solución sobresaturada de cloruro de potasio, como ya se describió anteriormente. Cada uno de los frascos fue tapado con un plástico delgado, al que se le hicieron 10 perforaciones con un alfiler y se almacenaron a temperaturas de 20, 27 y 34°C. El período de almacenamiento fue de 24 días con muestreos a 0, 8, 16 y 24 días; con tres repeticiones de cada una de las dos especies de hongos toxigénicos. En cada muestreo

se determinó contenido de humedad de los granos de maíz, su germinación y producción de aflatoxinas.

#### **5.5. Prueba de germinación del maíz inoculado con cepas de *Aspergillus* con diferente capacidad productora de aflatoxinas.**

Se realizó una prueba de germinación de cada unidad experimental inoculada con cada cepa de *Aspergillus flavus* L. y *A. parasiticus* S., esto para observar la patogenicidad de las cepas productoras y de cepas no productoras de aflatoxinas sobre los granos de maíz, expresada esa patogenicidad en la pérdida de viabilidad de los granos de maíz. Todo ello bajo la influencia de diferentes temperaturas de almacenamiento. La germinación del maíz se determinó con doscientos granos de maíz (cuatro repeticiones de 50 semillas) de cada unidad experimental, en toallas de papel húmedas enrolladas, incubadas a 25° C durante siete días (ISTA, 1996).

#### **5.6 Determinación de aflatoxinas totales.**

Para la determinación de aflatoxinas totales se procedió de acuerdo al método 991.31 de la AOAC (1995) como se mencionó anteriormente en el punto 3.6.

#### **5.7. Determinación de aflatoxinas totales realizando dilución.**

Método para maíz, granos y alimentos (para muestras con más de 300 ppb), esta metodología se menciona en el punto 3.7.

#### **5.8 Análisis estadístico**

El diseño experimental utilizado fue un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial, donde el factor "A" correspondió a las temperaturas de almacenamiento y el factor "B" fue para las cepas de *Aspergillus* estudiadas, ambos para cada tiempo de

muestreo. El análisis se llevó a cabo bajo el mismo diseño en el paquete estadístico SAS versión 6.12 (1989), siendo el modelo lineal utilizado:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + C_j + TC_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = Valor Observado.

$\mu$  = Efecto de la media.

$T_i$  = Efecto de la temperatura de almacenamiento de las semillas.

$C_j$  = Efecto de las cepas.

$TC_{ij}$  = Efecto de la interacción de la temperatura de almacenamiento y cepas de *Aspergillus*.

$\varepsilon_{ij}$  = Error experimental.

Los valores de producción de aflatoxinas fueron transformados en valores de raíz cuarta ( $\sqrt[4]{XX}$ ) (Steele y Torrie, 1986), con la finalidad de reducir los coeficientes de variación. Mientras que los valores de germinación y contenido de humedad no fueron transformados. El cálculo del coeficiente de variación se realizó mediante la fórmula siguiente:

$$C.V. (\%) = \frac{\sqrt{C.M.E.E.}}{\text{Media general}} * 100$$

C.M.E.E. = Cuadrado medio del error experimental.

La comparación de medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Scheffe al nivel de 0.05 de probabilidad para aquellas variables que presentaron diferencias estadísticas.

## V. RESULTADOS

### 1. Morfología de las cepas de *Aspergillus flavus* Link, en estudio

En el Cuadro 5.1. se presenta el porcentaje de hongos que estaban presentes en las diferentes muestras que se analizaron y de donde originalmente se aislaron las cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. De estas muestras analizadas se aislaron 31 cepas de *Aspergillus flavus* Link de los siguientes sustratos: de granos de maíz, 19 cepas; de cacahuete, 3 cepas; de chile seco (árbol, ancho y guajillo) 3 cepas; de cebada, papa, almendra, coco, nuez y semilla de calabaza, se aislaron 1 cepa en cada uno de estos sustratos.

En el Cuadro 5.2 se presentan las características morfológicas de las 31 cepas de *Aspergillus flavus* Link que fueron aisladas de los diferentes sustratos antes mencionados y cultivadas en medio Czapek, durante 10 días a 27°C. La identificación de estas cepas se llevó de acuerdo a lo señalado en los materiales y métodos; haciendo uso de todas las características morfológicas que a continuación se describen.

El tipo de crecimiento en la mayoría de las colonias de *A. flavus* L. en los diferentes sustratos fue radial y flocosa (algodonosa o lanosa), mientras que algunas de las cepas evaluadas presentaron un crecimiento radial y zonado (bandas en círculo o zonas de distinta apariencia, debido a diferencias en color y textura); como son las cepas 2, 6, 20, 27, 35 y 38. El tipo de micelio que presentaron la mayoría de las cepas, fue de tipo aéreo y escaso, así como micelio en los márgenes de la colonia; también se apreció que ciertas cepas presentaron micelio profundo y escaso, así como micelio en los márgenes de la colonia; como las cepas 1, 2, 3, 7, 9, 10, 11, 27 y 35.

Por lo que respecta al tamaño de las colonias; las cepas de mayor crecimiento fueron la 31 (7.53 cm), 28, 37, 21, 25 y 1, todas ellas con un crecimiento superior a los 7.25 cm de diámetro, mientras que la cepa que tuvo el menor crecimiento fue la 2, con un diámetro de 6.08 cm. El color característico de las colonias observadas a simple vista, fue de un verde-amarillo (Foto 1), clásico de *A. flavus* Link.

La mayoría de las cepas presentaron esclerocios (Foto 2 y 4), con excepción de las siguientes; 5, 11, 17, 27, 28, 30, 32 y 33, las que presentaron esclerocios, algunas formaron esclerocios elongados verticalmente, otros globosos o subglobosos, el color de los esclerocios también varió, desde un color café rojizo, otros negros y en otras cepas, de un color café oscuro. El tamaño de los esclerocios varía de cepa a cepa, la cepa que presentó los esclerocios más pequeños fue la 14 (313  $\mu\text{m}$ , de diámetro); la cepa con los esclerocios más grandes, fue la 20 (1,342  $\mu\text{m}$ , de diámetro).

Las cepas de *A. flavus* L. presentaron cabezuelas de forma radiada, tanto monoseriada (Foto 6, 7) como biseriada (Foto 3, 5, 6, 7,8, 9).

El tamaño de los conidios de *A. flavus* L. en las diferentes cepas oscilo entre 3.96 a 4.92  $\mu\text{m}$ ; la cepa 15 formó los más grandes, mientras que las cepas 8, 18 y 25 formaron los conidios mas pequeños (Foto 10).

**Cuadro 5.1. Porcentaje de los diferentes hongos que estaban presentes en las muestras analizadas de donde se aislaron las cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S.**

Muestra	Origen	<i>A.niger</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Mucor</i>	<i>A.flavus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>A.glaucus</i>	<i>A.ocraceus</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Nigrospora</i>	<i>A.clavatus</i>
1.Cacahuete salado	Comercial	3	3	0	0	0	2	2	0	0	0	0	0
2.Cacahuete clásico	Comercial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.Cacahuete enchilado	Comercial	0	2	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0
4.Cacahuete japonés	Comercial	0	0	2	0	2	0	7	0	0	0	0	0
5.Cacahuete enchilado	Comercial	0	0	7	0	7	0	7	0	0	0	0	0
6.Cacahuete tostado	Comercial	0	0	20	0	0	0	0	7	0	0	0	0
7.Cacahuete con picante	Comercial	2	0	7	0	0	7	0	7	17	0	0	0
8.Cacahuete salado	Comercial	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
9.Cacahuete enchilado	Comercial	2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
10.Cacahuete tostado con sal	Comercial	0	0	0	0	7	2	2	0	0	0	0	0
11.Cacahuete estilo japonés	Comercial	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
12.Cacahuete Japonés	Comercial	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13.Almendras enteras	Comercial	10	7	0	0	17	0	0	53	0	2	0	0
14.Almendras enteras	Comercial	10	13	0	0	7	0	0	57	0	0	0	0
15.Coco rayado	Comercial	7	0	7	0	3	0	0	17	3	0	0	0
16.Coco rayado	Comercial	7	7	13	0	3	0	0	40	7	0	0	0
17.Mazapán	Comercial	3	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0
18. Pepitas y cacahuates)	Comercial	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0
19.Crema de cacahuete	Comercial	0	3	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0
20.Nuez en mitad	Comercial	7	7	10	0	13	0	0	37	0	0	0	0
21.Pistache	Comercial	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
22.Arroz procesado	Comercial	7	0	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0

Continuación del Cuadro 5.1

Muestra	Origen	<i>A.niger</i>	<i>Rhizopus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Mucor</i>	<i>A.flavus</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>A.glaucus</i>	<i>A.ocraceus</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Nigrospora</i>	<i>A.clavatus</i>
23.Maíz procesado	Comercial	0	3	0	0	0	0	13	3	0	0	0	0
24.Maíz procesado	Comercial	0	0	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0
25.Chile ancho	Comercial	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
26.Chile de árbol	Comercial	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27.Chile guajillo	Comercial	0	0	0	7	0	0	3	3	0	3	0	0
28.Chile ancho	Comercial	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3
29.Chile mulato	Comercial	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	0	3
30.Chile guajillo	Comercial	3	0	3	3	7	0	0	0	0	3	0	0
31.Chile ancho	Comercial	3	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
32.Chile árbol	Comercial	3	20	0	11	13	0	3	3	0	14	0	0
33.Harina de maíz	Comercial	3	0	3	0	3	0	0	3	0	0	0	0
34.Harina de maíz	Comercial	0	7	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0
35.Harina de maíz	Comercial	0	0	3	0	7	0	0	13	0	0	0	0
36. Maíz A	Tamaulipas	0	0	7	0	53	23	0	0	0	0	0	0
37. Maíz B	Tamaulipas	0	0	0	0	50	20	0	0	0	0	0	0
38. Maíz C	Tamaulipas	0	0	10	0	27	10	3	0	0	0	7	0
39. Maíz D	Tamaulipas	0	0	0	0	7	40	0	13	0	0	0	0
40. Maíz E	Tamaulipas	0	0	0	0	37	17	0	0	0	0	7	0
41. Maíz	Campeche	0	0	0	0	33	38	0	0	0	0	0	0
42. Maíz	Guadaluajara	7	0	0	0	27	30	0	7	7	0	0	0
43. Maíz	Sinaloa	20	0	0	0	13	13	3	7	3	0	0	0
44. Maíz	Chiapas	27	0	0	0	20	10	0	13	0	0	0	0
45. Maíz	Conasupo	0	0	0	0	14	30	0	7	0	0	0	0
46. Cebada	Bajío	0	7	0	0	8	0	3	0	0	5	7	0

**Cuadro 5.2. Características morfológicas de las 30 cepas de *Aspergillus flavus* Link, aisladas de diferentes sustratos y cultivadas durante 10 días en medio Czapek, a 27°C.**

No. Cepa	Género y especie	Sustrato	Crecimiento de la colonia	Micelio	Tamaño de la colonia en cm.	Color de la colonia	Forma y tamaño de los esclerocios. (diámetro µm)	Tamaño de los conidios en µm	Mono-seriado	Bi-seriado	Forma de la cabezuela
1	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia	7.25	Verde amarillo	Abundante producción de esclerocios verticalmente elongado y globosos ,negros. 639 µm	4.2	si	si	Radiada
2	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y zonada	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.08	Verde amarillo	Abundante producción, verticalmente elongado y globosos , café rojizo. 604 µm	4.4	si	si	Radiada
3	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.8	Verde amarillo	Grandes inmaduros en el centro de la colonia y maduros en las orillas de forma globosos y color café oscuro, abundante producción. 842 µm	4.2	si	si	Radiada
4	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Aéreo y escaso en el centro de la colonia	7.03	Verde amarillo	Muy poca producción e inmaduros, subglobosos y de color café oscuro. 737 µm	4.25	si	si	Radiada
5	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Aéreo y escaso en el centro de la colonia	6.68	Verde amarillo	Sin esclerocios	4.20	si	si	Radiada
6	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y zonada	Aéreo y escaso en el centro de la colonia	6.3	Verde amarillo	Abundantes verticalmente elongados y globosos , color negro. 648 µm	4.2	si	si	Radiada
7	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.93	Verde amarillo	Escasa producción, inmaduros en los márgenes de la colonia, globosos y café rojizo 586 µm	4.2	si	si	Radiada

Cont.... Cuadro 5.2.)

No. Cepa	Género y especie	Sustrato	Crecimiento de la colonia	Micelio	Tamaño de la colonia en cm.	Color de la colonia	Forma y tamaño de los esclerocios. (diámetro µm)	Tamaño de los conidios en µm	Mono-seriado	Bi-seriado	Forma de la cabezuela
8	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Aéreo y escaso en el centro de la colonia	7.03	Verde amarillo	La mayoría inmaduros con escasa producción, elongados verticalmente, color negro. 638 µm	3.96	si	si	Radiada
9	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.55	Verde amarillo	Escasa producción, verticalmente elongado y globosos ,negros. 634 µm	4.32	si	si	Radiada
10	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia	7.1	Verde amarillo	Escasa producción, globosos y de color negro. 691 µm	4.2	si	si	Radiada
11	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.8	Verde amarillo	Sin esclerocios	4.56	si	si	Radiada
12	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Aéreo y escaso en el centro de la colonia	7.13	Verde amarillo	Escasa producción, globosos y café rojizo. 645 µm	4.32	si	si	Radiada
13	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.9	Verde amarillo	Abundante producción, globosos y verticalmente elongados, negros. 825 µm	4.44	si	si	Radiada
14	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Aéreo y abundante en el centro de la colonia	6.6	Verde amarillo	Abundante producción, pequeños, café oscuro, globosos y subglobosos. 313 µm	4.2	si	si	Radiada
15	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Aéreo y escaso en el centro de la colonia	7.03	Verde amarillo	Esclerocios inmaduros y abundantes en los márgenes de la colonia, globosos y café rojizo. 671 µm	4.92	si	si	Radiada

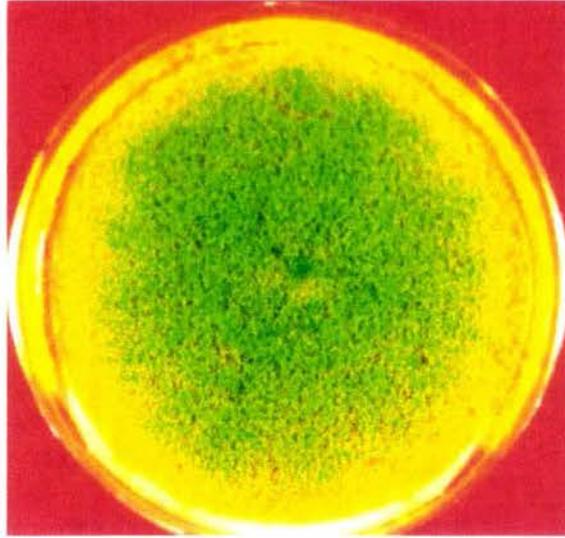
(Cont..... Cuadro 5.2.)

No. Cepa	Género y especie	Sustrato	Crecimiento de la colonia	Micelio	Tamaño de la colonia en cm.	Color de la colonia	Forma y tamaño de los esclerocios. (diámetro $\mu\text{m}$ )	Tamaño de los conidios en $\mu$	Mono-seriado	Bi-seriado	Forma de la cabezuela
16	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Cebada	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	7.13	Verde amarillo	Abundantes en los márgenes de la colonia, verticalmente elongados y globosos, color café rojizo. 741 $\mu\text{m}$	4.56	si	si	Radiada
17	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Papa	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.63	Verde amarillo	Sin esclerocios	4.32	si	si	Radiada
18	<i>Aspergillus flavus</i> L.	-Maíz	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.63	Verde amarillo	Abundante producción, sub globosos, de color café rojizo. 682 $\mu\text{m}$	3.96	si	si	Radiada
20	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Cacahuete	Radial y zonada	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.6	Verde amarillo	Escasa producción, globosos y café rojizo. 1342 $\mu\text{m}$	4.32	si	Si	Radiada
21	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Cacahuete	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	7.27	Verde amarillo	Mediana producción, forma sub globosos y verticalmente elongados, color negro 737 $\mu\text{m}$	4.20	si	Si	Radiada
25	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Cacahuete	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	7.25	Verde amarillo	Escasa producción, de color café rojizo, globosos. 798 $\mu\text{m}$	3.96	si	si	Radiada
27	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Almendra	Radial y zonada	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.2	Verde amarillo	Sin esclerocios	4.2	si	si	Radiada
28	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Coco	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	7.4	Verde amarillo	Sin esclerocios	4.62	si	si	Radiada

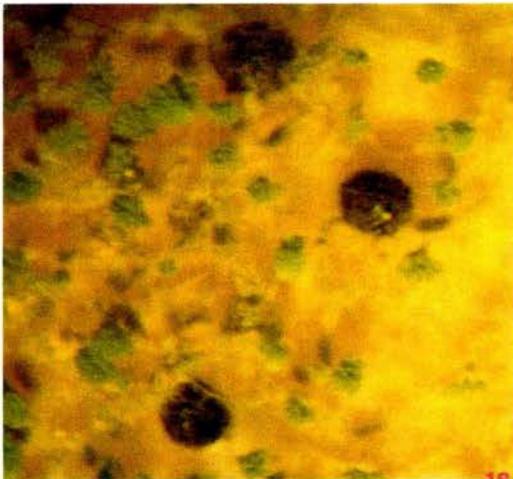
(Cont..... Cuadro 5.2.)

No. Cepa	Género y especie	Sustrato	Crecimiento de la colonia	Micelio	Tamaño de la colonia en cm.	Color de la colonia	Forma y tamaño de los esclerocios. (diámetro µm)	Tamaño de los conidios en µm	Mono-seriado	Bi-seriado	Forma de la cabezuela
30	<i>Aspergillus flavus</i> L.	H.de maíz	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	7.06	Verde amarillo	Sin esclerocios	4.44	si	si	Radiada
31	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Nuez	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	7.53	Verde amarillo	Escasa producción, globosos y negros. 822 µm	4.32	si	si	Radiada
33	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Chile	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	7.1	Verde amarillo	Sin esclerocios	4.65	si	si	Radiada
34	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Chile	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	7.02	Verde amarillo	Esclerocios en los márgenes de la colonia y muy abundantes, forma subglobosos y verticalmente elongados, color café. 736 µm	4.5	si	si	Radiada
35	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Semilla de calabaza	Radial y zonada	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.3	Verde amarillo	Abundante producción, globosos y café rojizo 639 µm	4.2	si	si	Radiada
37	<i>Aspergillus flavus</i> L.	Maíz	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	7.3	Verde amarillo	La mayoría inmaduros, Verticalmente elongados y subglobosos de color café, abundante producción 629 µm	4.32	si	si	Radiada
38	<i>Aspergillus flavus</i> L.	-Maíz	Radial y zonada	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.6	Verde amarillo	Muy abundantes, globosos de color negro. 658 µm	4.44	si	si	Radiada

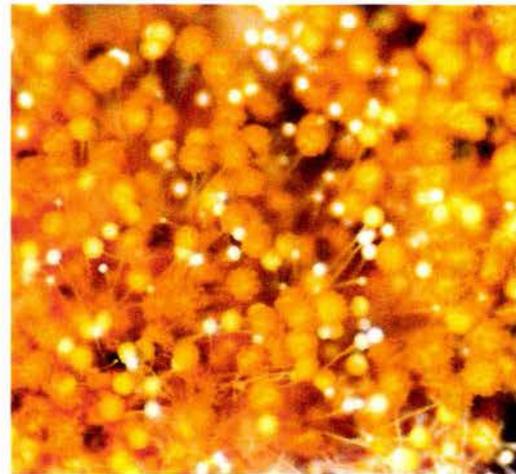
**FOTOS DE ALGUNAS CEPAS DE *A. flavus* Link**



**Foto 1. Crecimiento radial y color de la colonia Verde amarillo de *Aspergillus flavus* Link**



**Foto 2. Cabezuelas y esclerocios vistos en estereoscopio 10X cepa 1 de *A. flavus* Link**



**Foto 3. Cabezuelas maduras e inmaduras vistas en estereoscopio 10X cepa 1 de *A. flavus* Link**

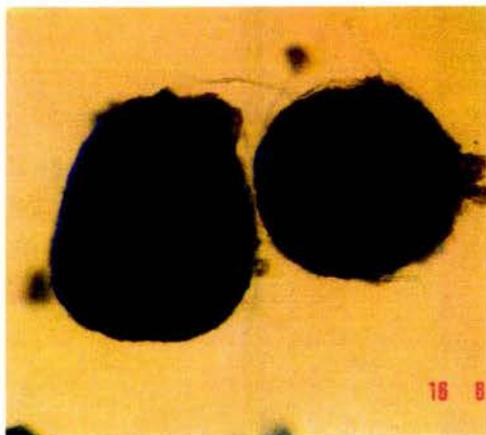


Foto 4 . Esclerocios  
vistos en microscopio a 10X  
Cepa 8 de *A. flavus* L.

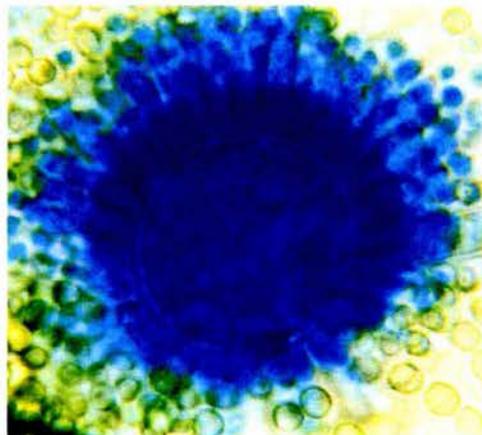


Foto 5. Cabezuela biseriada  
vista en Microscopio a 100X  
Cepa 28 *A. flavus* L.

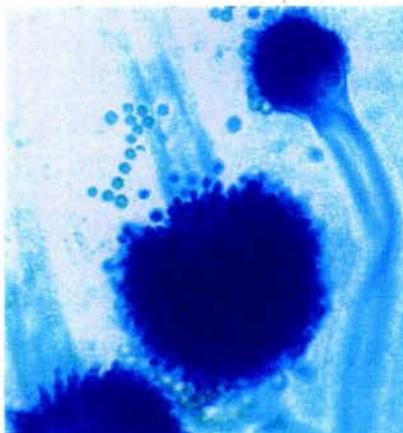
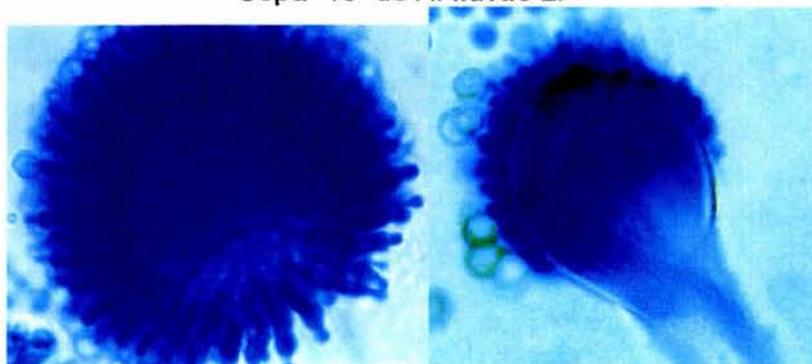


Foto 6. Cabezuelas biseriada y monoseriada  
Vistas en el microscopio a 40X  
Cepa 18 de *A. flavus* L.



**Cabezuela biseriada**

**Cabezuela monoseriada**

Foto 7. Cabezuelas vistas en el microscopio a 100X cepa 18 de *A. flavus* L.

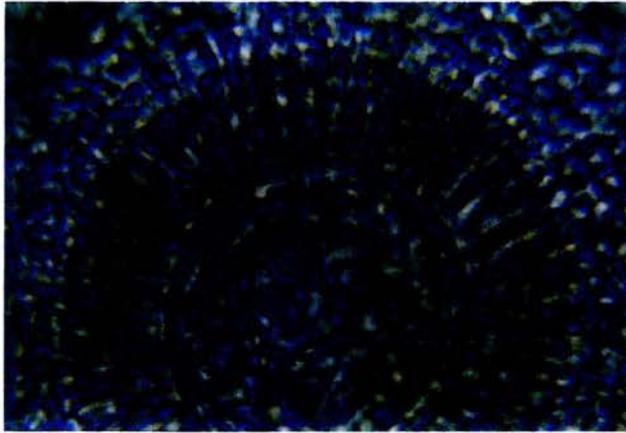


Foto 8 .Cabezuela biseriada  
Vista en el microscopio a 100X  
Cepa 25 de *A. flavus* L.

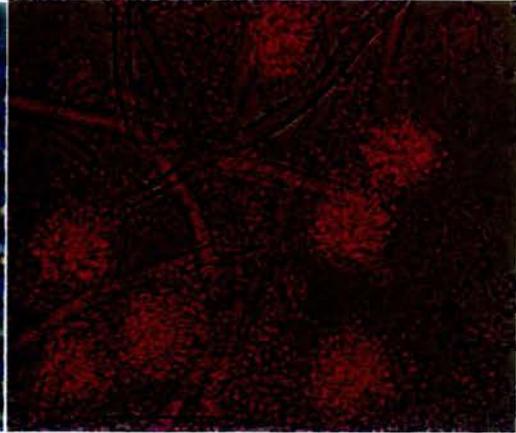


Foto 9. Cabezuelas  
Vistas en el microscopio a 20X  
Cepa 25 de *A. flavus* L.



Foto 10. Conidios  
vistos en microscopio a 100X  
Cepa 28 de *A. flavus* L.

## 2. Características morfológicas de *Aspergillus parasiticus* Speare

En el Cuadro 5.3 se muestran las características morfológicas de siete cepas de *Aspergillus parasiticus* Speare, aisladas de sustratos de cacahuate, almendras, pistache y harina de maíz. El crecimiento de las colonias de *A. parasiticus* en las siete cepas fueron de tipo radial y flocosa. El micelio fue aéreo y escaso, presentando micelio en el margen de la colonia en las cepas 19, 23 y 29, mientras que las cepas 22, 24, 26 y 36, el micelio fue profundo y escaso.

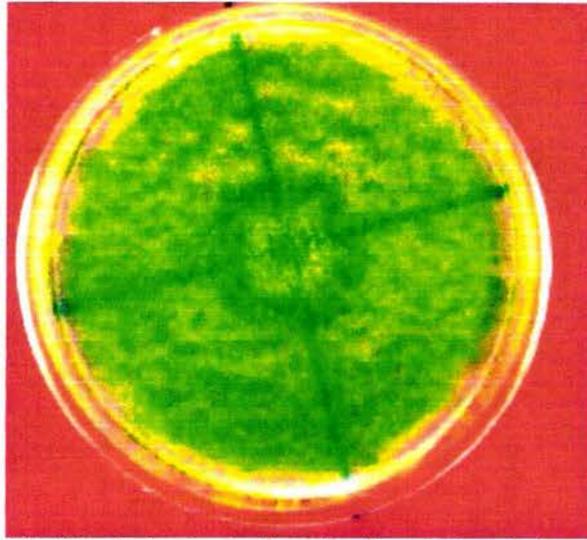
El tamaño de la colonias de *A. parasiticus* a los 10 días de incubación en medio de cultivo Czapek, oscilo de 5.64 a 7.4 cm de diámetro. La cepa que tuvo el mayor crecimiento fue la 36 y la de menor tamaño la cepa 26.

El color de las colonias fue verde seco (Foto 11). Las cepas de *A. parasiticus* no formaron esclerocios, los conidios mas grandes fueron de la cepa 29 (5.4  $\mu\text{m}$ ) y las cepas que formaron los conidios más pequeños fueron la 19, 22 y 36, con 4.44  $\mu\text{m}$  (Foto 15). La forma de la cabezuela en *A. parasiticus* es radiada y monoseriada ( Foto 12,13 y 14), y no presentó cabezuelas biseriadas como las presenta *A. flavus*.

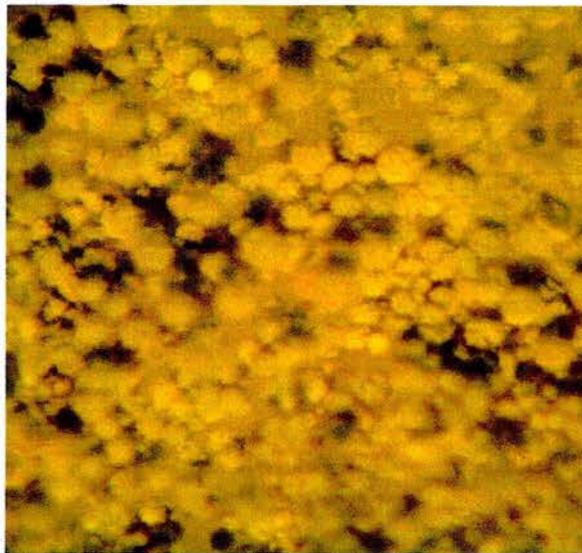
**Cuadro 5.3. Características morfológicas de 7 cepas de *Aspergillus parasiticus* Speare aisladas de diferentes sustratos y cultivadas durante 10 días en medio de Czapek a 27°C.**

No. Cepa	Género y especie	Sustrato	Crecimiento de la colonia	Micelio	Tamaño de la colonia en cm.	Color de la colonia	Forma y tamaño de los esclerocios. (diámetro $\mu\text{m}$ )	Tamaño de los conidios en $\mu\text{m}$	Mono-seriado	Bi-seriado	Forma de la cabezuela
19	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Cacahuete	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.93	Verde opaco	Sin esclerocios	4.44	Sí	no	radiada
22	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Cacahuete	Radial y flocosa	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia		Verde seco	Sin esclerocios	4.44	Sí	no	radiada
23	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Cacahuete	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.98	Verde seco	Sin esclerocios	4.56	Sí	no	radiada
24	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Cacahuete	Radial y flocosa	Profundo y escaso, los márgenes de la colonia	6.7	Verde seco	Sin esclerocios	4.56	Sí	no	radiada
26	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Almendra	Radial y flocosa	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia	5.64	Verde seco	Sin esclerocios	4.8	Sí	no	radiada
29	<i>Aspergillus parasiticus</i>	H.de maíz	Radial y flocosa	Aéreo y escaso, en los márgenes de la colonia	6.48	Verde seco	Sin esclerocios	5.4	Sí	no	radiada
36	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Pistache	Radial y flocosa	Profundo y escaso, en los márgenes de la colonia	7.4	Verde seco	Sin esclerocios	4.44	Sí	no	radiada

**FOTOS DE ALGUNAS CEPAS DE *A. parasiticus* Speare.**



**Foto 11. Crecimiento de la colonia y color de la colonia  
Verde seco de *Aspergillus parasiticus* S**



**Foto 12. Cabezuelas  
vistas en estereoscopio 10x  
cepa 24 de *A. parasiticus* S**

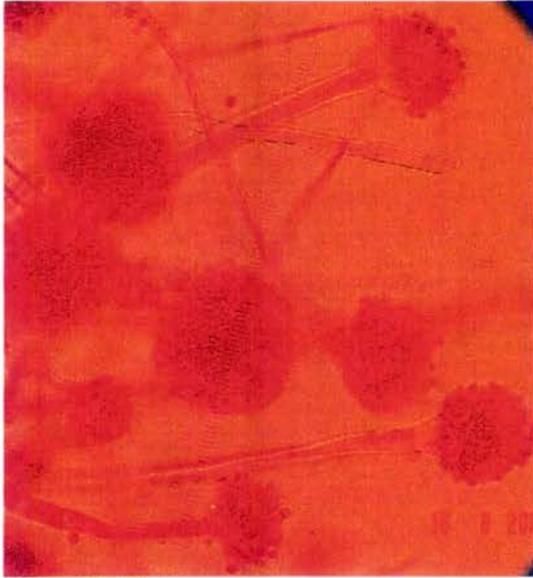


Foto 13. Cabezuelas  
vistas en microscopio a 20X  
Cepa 23 de *A. parasiticus* S

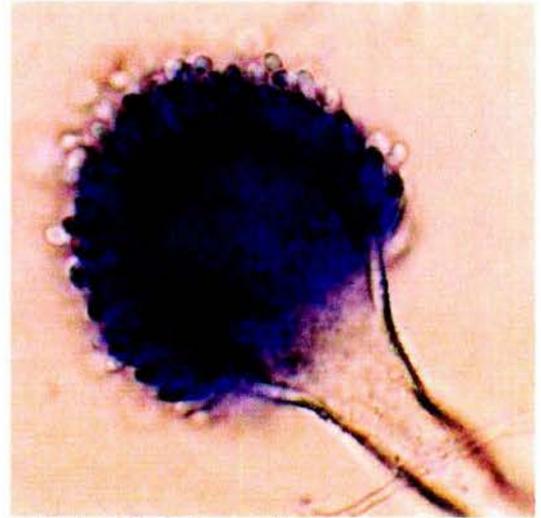


Foto 14. Cabezuela monoseriada  
vista en microscopio a 40X  
Cepa 23 de *A. parasiticus* S.

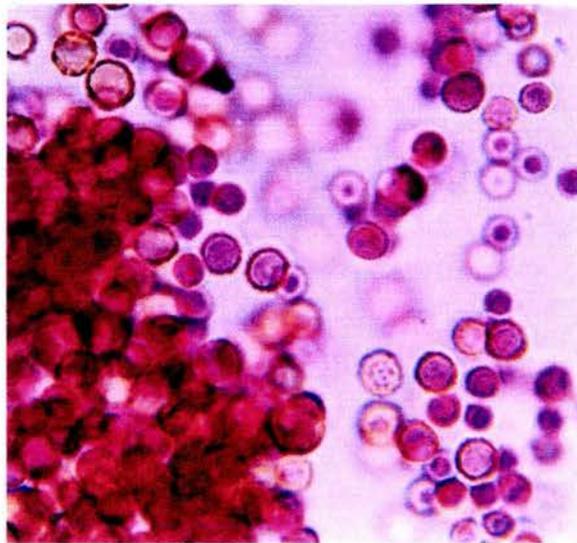


Foto 15. Conidios  
vistas en microscopio a 100 X  
Cepa 23 de *A. parasiticus* S.

### **3. Producción de aflatoxinas en medio líquido de arroz y en medio sólido (granos de maíz) de las 30 cepas de *Aspergillus flavus* Link y 7 cepas de *A. parasiticus* Speare y su efecto en la germinación del maíz.**

Se presentan los cuadrados medios del análisis de varianza de los datos en la producción de aflatoxinas, tanto en el medio líquido con arroz, como en el grano de maíz; inoculados con diferentes cepas de *A. flavus* L. (Cuadro A-1) (ver cuadros de A1 a A10 en Apéndice) y *Aspergillus parasiticus* S. (Cuadro A-2). Se encontraron diferencias altamente significativas ( $p=0.01$ ) entre las cepas aisladas y en relación a la producción de aflatoxinas, tanto en el medio líquido, como en el grano de maíz para ambas especies (Cuadro A-1 y Cuadro A-2). En medio líquido, el período de incubación fue de 7 días y en medio sólido (granos de maíz) se almacenó durante 30 días. Así mismo se presentaron diferencias altamente significativas ( $p=0.01$ ) para las variables de germinación y contenido de humedad del grano. Los coeficientes de variación para la especie *Aspergillus flavus* L. (Cuadro A-1) oscilaron entre 0.76 a 21.44%, donde el valor más alto correspondió a la germinación del maíz y el valor más bajo al contenido de humedad del maíz. Los coeficientes de variación para la especie *Aspergillus parasiticus* S. oscilaron de 1.38 a 22.12%, el valor más bajo correspondió al contenido de humedad y el valor más alto a la producción de aflatoxinas en maíz (Cuadro A-2).

La variabilidad aportada por las diferencias en cepas es de alrededor del 98% del total (Cuadro A-3) en medio líquido y 94% en medio sólido (Cuadro A-4). Por ende a partir de este conjunto de datos es difícil separar a las especies, ya que no se detectan diferencias entre las especies con base a conteos promedios.

#### **3.1 Comparación de Medias**

Debido a la significancia mostrada en el análisis de varianza para las variables de cepas, en los Cuadros 5.4, 5.5, 5.6 y 5.7 se muestran las comparaciones de medias para la producción de aflatoxinas, tanto del medio líquido en arroz, como en el grano de maíz, así como la germinación y el contenido de humedad de los granos inoculados con cada cepa de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S.

### 3.2. Producción de aflatoxinas en medio líquido con arroz.

En el Cuadro 5.4 se observa gran variabilidad en la producción de aflatoxinas entre las cepas de *Aspergillus flavus* L. en medio líquido, Se presentaron 6 grupos estadísticos, incluyéndose en el último grupo las cepas que no producen aflatoxinas de ningún tipo, como las cepas 3, 10, 13, 17, 20, 27, 30, 33, 37 de *Aspergillus flavus* L. y el tratamiento del testigo, en el cual el grano de maíz no fue inoculado. El resto de las cepas presentaron diferentes niveles de aflatoxinas, la cepa con mayor producción de aflatoxinas fue la cepa 25 de *A. flavus* L. con 5,033.3 ppb y la de menor producción de aflatoxinas fue la cepa 35 de *A. flavus* L. con 31.3 ppb.

En el Cuadro 5.5 podemos observar que la producción de aflatoxinas en medio líquido por *A. parasiticus* S. también fue variable entre las cepas de este hongo. Se presentaron 3 grupos estadísticos, en el último grupo están las cepas que no producen aflatoxinas como son las cepas 22, 23, 26, 29 de *A. parasiticus* S. y el grano de maíz testigo que no fue inoculado con el hongo tóxico. La cepa de *A. parasiticus* S. con mayor producción fue la cepa 36 con 2000 ppb y la de menor producción fue la cepa 24 con una producción de 293.3 ppb.

Es importante mencionar que de los resultados obtenidos en la producción de aflatoxinas de cada cepa en este medio, se seleccionaron tres cepas de *A. flavus* L. y tres cepas de *A. parasiticus* S. Las cuales se utilizaron en el experimento de diferentes humedades y en el experimento de diferentes temperaturas que se mencionaran más adelante. A la cepa 25 de *A. flavus* L y la cepa 36 de *A. parasiticus* S. se les mencionará como altamente productoras, a la cepa 35 de *A. flavus* L. y la cepa 24 de *A. parasiticus* S. como medianamente productoras, y a las cepas 37 de *A. flavus* L y 26 de *A. parasiticus* S como no productoras, este término se les dió de acuerdo a su capacidad de producir aflatoxinas en el medio líquido con arroz incubado a 27°C, durante 7 días.

**Cuadro 5.4. Comparación de medias de la producción de aflatoxinas en medio líquido inoculado con cepas de *A. flavus* Link, incubadas a 27°C durante 7 días.**

CEPAS <i>A. flavus</i> L.	Producción de aflatoxinas en medio líquido (ppb)
25	5033.3 <sup>a</sup>
18	4700.0 <sup>a</sup>
21	4000.0 <sup>ab</sup>
11	2580.0 <sup>abc</sup>
12	2386.7 <sup>abc</sup>
28	2400.0 <sup>abc</sup>
34	2066.7 <sup>abc</sup>
15	1630.0 <sup>abcd</sup>
2	1130.7 <sup>abcde</sup>
9	1050.0 <sup>abcde</sup>
4	886.7 <sup>abcde</sup>
5	810.0 <sup>abcde</sup>
14	643.3 <sup>abcde</sup>
6	573.3 <sup>abcde</sup>
1	363.3 <sup>bcde</sup>
8	326.7 <sup>bcde</sup>
38	312.0 <sup>cde</sup>
31	309.3 <sup>cdef</sup>
7	278.0 <sup>cdef</sup>
16	66.7 <sup>def</sup>
35	31.3 <sup>ef</sup>
3	0.0 <sup>f</sup>
10	0.0 <sup>f</sup>
13	0.0 <sup>f</sup>
17	0.0 <sup>f</sup>
20	0.0 <sup>f</sup>
27	0.0 <sup>f</sup>
30	0.0 <sup>f</sup>
33	0.0 <sup>f</sup>
37	0.0 <sup>f</sup>
Testigo	0.0 <sup>f</sup>

\*En la columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes, (Scheffe, p = 0.05).

**Cuadro 5.5. Comparación de medias de la producción de aflatoxinas en medio líquido inoculado con cepas de *A. parasiticus* Speare, incubadas a 27°C durante 7 días.**

CEPAS DE <i>A. parasiticus</i> S.	Producción de aflatoxinas en medio líquido (ppb)
36	2000.0 <sup>a</sup>
19	336.7 <sup>b</sup>
24	293.3 <sup>b</sup>
22	0.0 <sup>c</sup>
23	0.0 <sup>c</sup>
26	0.0 <sup>c</sup>
29	0.0 <sup>c</sup>
Testigo	0.0 <sup>c</sup>

\*En la columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p = 0.05).

### **3.3. Producción de aflatoxinas en granos de maíz.**

La producción de aflatoxinas de las cepas de *A. flavus* L. en maíz fue constante y no hubo variación estadísticamente significativa entre ellas (Cuadro 5.6). Se presentaron solo 2 grupos estadísticos, en el primero están las cepas que sí producen y en el segundo las cepas que no producen como son las cepas de *A. flavus* L. 3, 10, 13, 17, 27, 30, 33, 37 y el testigo. La cepa con mayor producción de aflatoxinas fue la cepa 28 de *A. flavus* L. con 7,667 ppb y la de menor producción fue la cepa 27 de *A. flavus* L. con 1 ppb.

Las cepas de *A. parasiticus* S. (Cuadro 5.7) también tuvieron altos niveles de producción de aflatoxinas en maíz; presentando dos grupos estadísticamente diferentes, en el primero están las cepas que sí produjeron aflatoxinas y en el segundo las cepas no productoras, como son las cepas 26 y 29 de *A. parasiticus* S. y el grano de maíz del testigo, no inoculado con el hongo. La cepa con mayor producción fue la cepa 19 de *A. parasiticus* S. con 2,650 ppb y la de menor producción fue la cepa 22 de *A. parasiticus* S. con 0.3 ppb. Las cepas 22 y 23 de *A. parasiticus* S. (cuadro 5.7) quedaron en el grupo de las no productoras por los bajos niveles de aflatoxinas producidos (0.3 y 7ppb respectivamente); sin embargo deben de ser consideradas como productoras.

### **3.4. Efecto de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. en la germinación del maíz con un contenido de humedad de 18 %.**

En la comparación de medias para la variable de germinación del grano de maíz inoculado con *A. flavus* L. (Cuadro 5.6) y *A. parasiticus* S. (Cuadro 5.7), Se presentaron tres grupos significativamente diferentes (Scheffe  $p= 0.05$ ), en ambas especies. En el primer grupo se encuentra el testigo quien registró la máxima germinación con 61%, esta germinación marcó la diferencia con la baja germinación del maíz inoculado con las diferentes cepas de *Aspergillus flavus* L. y *Aspergillus parasiticus* S. La germinación

del maíz inoculado, varió de 6 a 28%, correspondiente a las cepas 35 y 31 de *A. flavus* L. (Cuadro 5.6), respectivamente y en maíz inoculado con *A. parasiticus* S. varió de 12% a 32% en la cepa 23 y cepa 24 de *A. parasiticus* S. respectivamente (Cuadro 5.7).

**Cuadro 5.6. Comparación de medias de las variables evaluadas en los granos de maíz inoculados con cepas de *A. flavus* Link incubados a 27°C, durante 30 días.**

CEPAS DE <i>A. flavus</i> L.	CONTENIDO DE HUMEDAD (%)	GERMINACIÓN (%)	PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS (ppb)
28	18.0 <sup>abc*</sup>	18 <sup>abc*</sup>	7667.0 <sup>a*</sup>
31	18.0 <sup>abc</sup>	28 <sup>b</sup>	6517.0 <sup>a</sup>
11	18.5 <sup>ab</sup>	10 <sup>bc</sup>	5800.0 <sup>a</sup>
35	18.3 <sup>ab</sup>	6 <sup>c</sup>	5333.0 <sup>a</sup>
18	18.1 <sup>abc</sup>	10 <sup>bc</sup>	4400.0 <sup>a</sup>
34	18.2 <sup>abc</sup>	12 <sup>bc</sup>	4240.0 <sup>a</sup>
2	18.2 <sup>abc</sup>	14 <sup>bc</sup>	4117.0 <sup>a</sup>
38	18.2 <sup>abc</sup>	19 <sup>bc</sup>	3733.0 <sup>a</sup>
6	18.2 <sup>abc</sup>	20 <sup>bc</sup>	3533.0 <sup>a</sup>
15	18.2 <sup>abc</sup>	14 <sup>bc</sup>	3400.0 <sup>a</sup>
4	18.0 <sup>abc</sup>	14 <sup>bc</sup>	3380.0 <sup>a</sup>
8	18.6 <sup>a</sup>	21 <sup>bc</sup>	3310.0 <sup>a</sup>
16	18.3 <sup>abc</sup>	8 <sup>bc</sup>	3133.0 <sup>a</sup>
7	18.5 <sup>ab</sup>	19 <sup>bc</sup>	2800.0 <sup>a</sup>
1	18.2 <sup>abc</sup>	16 <sup>bc</sup>	2680.0 <sup>a</sup>
14	17.7 <sup>bc</sup>	14 <sup>bc</sup>	2280.0 <sup>a</sup>
5	18.4 <sup>ab</sup>	14 <sup>bc</sup>	2267.0 <sup>a</sup>
12	18.0 <sup>abc</sup>	26 <sup>bc</sup>	2213.0 <sup>a</sup>
25	18.0 <sup>abc</sup>	24 <sup>bc</sup>	2040.0 <sup>a</sup>
21	18.5 <sup>ab</sup>	12 <sup>bc</sup>	1580.0 <sup>a</sup>
9	18.1 <sup>abc</sup>	18 <sup>bc</sup>	1470.0 <sup>a</sup>
27	18.1 <sup>abc</sup>	13 <sup>bc</sup>	1.0 <sup>b</sup>
3	18.0 <sup>ab</sup>	21 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>
10	18.6 <sup>a</sup>	7 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>
13	18.0 <sup>abc</sup>	19 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>
17	18.3 <sup>ab</sup>	15 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>
20	18.2 <sup>abc</sup>	17 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>
30	18.3 <sup>ab</sup>	20 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>
33	18.6 <sup>a</sup>	9 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>
37	17.5 <sup>c</sup>	22 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>
<b>Testigo</b>	18.3 <sup>ab</sup>	61 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>

\*En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p= 0.05)

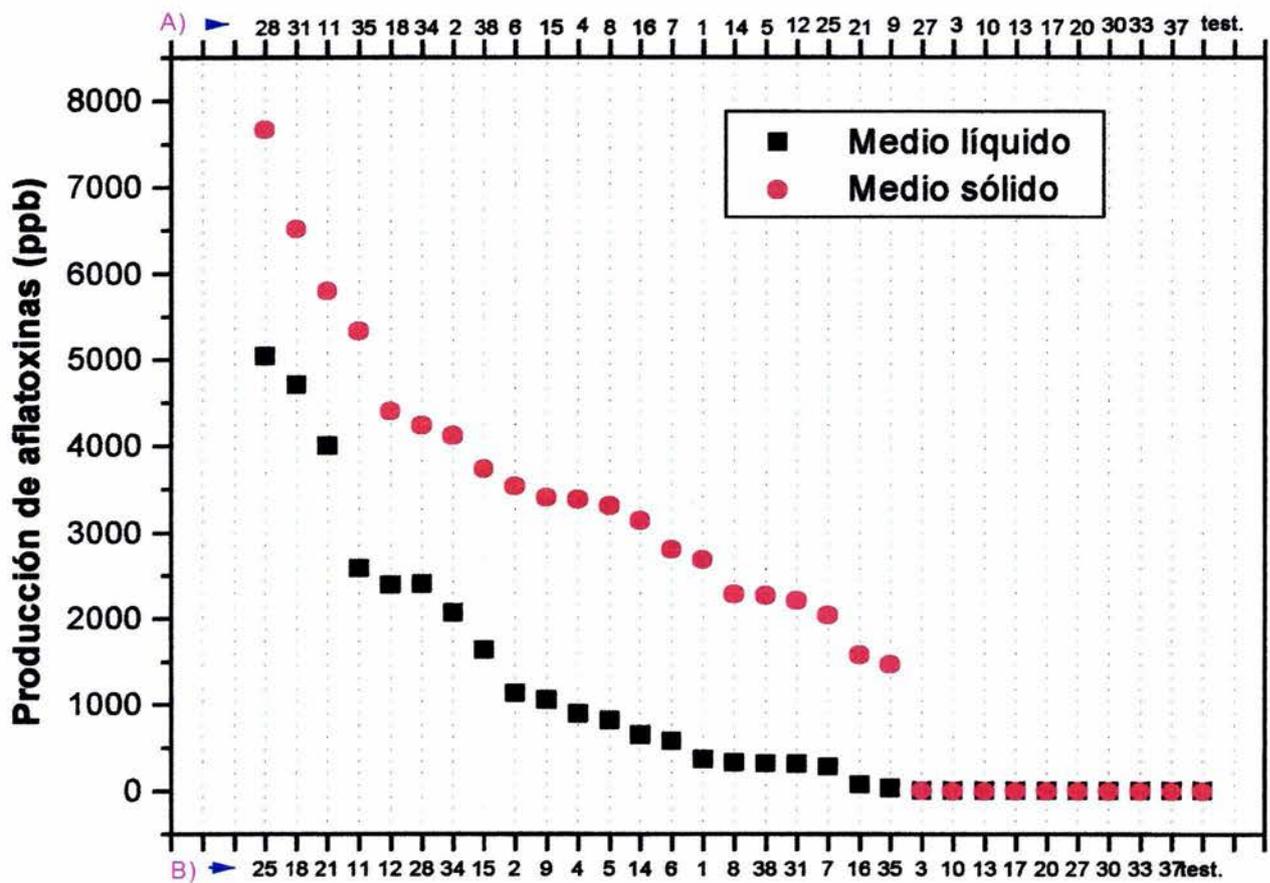
**Cuadro 5.7. Comparación de medias de las variables evaluadas en los granos de maíz inoculados con cepas de *A. parasiticus* Speare incubados a 27°C, durante 30 días.**

CEPAS DE <i>A. parasiticus</i>	CONTENIDO DE HUMEDAD (%)	GERMINACIÓN (%)	PRODUCCIÓN DE AFLATOXINAS (ppb)
19	18.8 <sup>a</sup>	15 <sup>bc</sup>	2650.0 <sup>a</sup>
36	18.2 <sup>ab</sup>	14 <sup>bc</sup>	1960.0 <sup>a</sup>
24	18.1 <sup>ab</sup>	32 <sup>b</sup>	707.0 <sup>a</sup>
23	18.1 <sup>ab</sup>	12 <sup>c</sup>	7.0 <sup>b</sup>
22	18.4 <sup>ab</sup>	14 <sup>bc</sup>	0.3 <sup>b</sup>
26	17.7 <sup>b</sup>	31 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>
29	18.1 <sup>ab</sup>	27 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>b</sup>
TESTIGO	18.3 <sup>ab</sup>	61 <sup>a</sup>	0.0 <sup>b</sup>

\*En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p = 0.05)

En la gráfica de la figura 5.1. se muestra la producción de aflatoxinas de cada una de las cepas de *A. flavus* L. en medio líquido y medio sólido, se ordenó desde la cepa más productora a la menos productora de aflatoxinas en ambos medios, en esta gráfica se observa que hubo mayor producción de aflatoxinas en medio sólido que en medio líquido, pero esto se debió al tiempo de almacenamiento. Los valores aquí presentados son los mismos que están por separados en los cuadros 5.4 y 5.6.

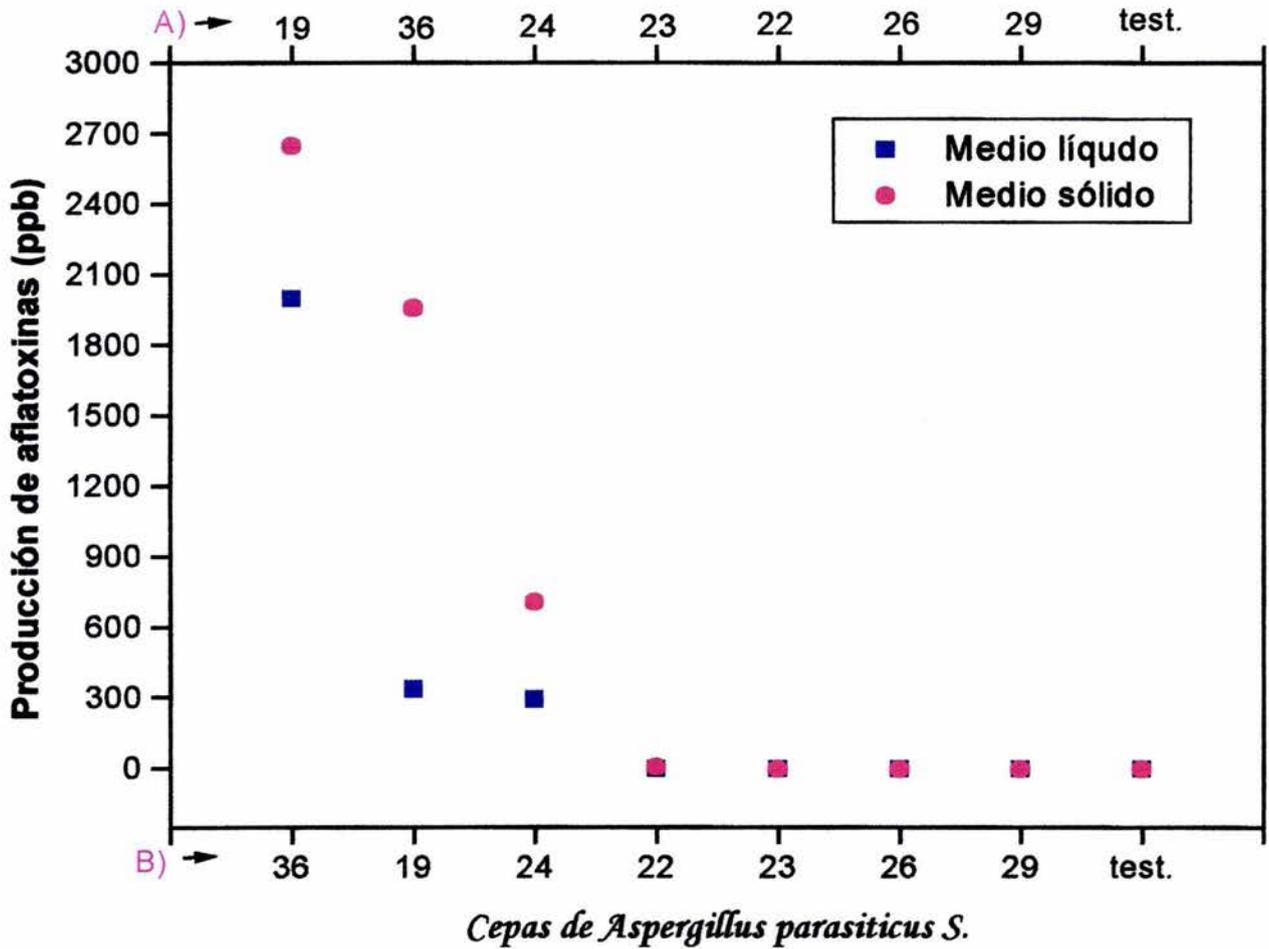
En la gráfica de la figura 5.2 se presenta la producción de aflatoxinas de las cepas de *A. parasiticus* S. en medio líquido y medio sólido nuevamente, las cepas fueron ordenadas en orden decreciente con respecto a su producción de aflatoxinas. La producción de aflatoxinas fue mayor en medio sólido y medio líquido, pero se debe al periodo de almacenamiento que fue diferente para cada medio. Los datos de esta gráfica son los mismos que el de los cuadros 5.5 y 5.7, pero aquí se agruparon los dos medios.



*Cepas de Aspergillus flavus L.*

- A) cepas en orden de producción de aflatoxinas de mayor a menor en medio sólido.
- B) cepas en orden de producción de aflatoxinas de mayor a menor en medio líquido.

**Figura 5.1. Producción de aflatoxinas (ppb) de cada una de las cepas de *A. flavus* Link en medio de cultivo líquido con arroz incubadas a 27°C durante 7 días y en medio sólido (granos de maíz) incubadas a 27°C por 30 días.**



- A) cepas en orden de producción de aflatoxinas de mayor a menor en medio sólido  
 B) cepas en orden de producción de aflatoxinas de mayor a menor en medio líquido.

Figura 5.2. Producción de aflatoxinas (ppb) de cada una de las cepas de *A. parasiticus* Speare en medio de cultivo líquido con arroz incubadas a 27°C durante 7 días y en medio sólido (granos de maíz) incubadas a 27°C por 30 días.

### **3.5. Contenido de humedad**

Para el contenido de humedad del grano de maíz inoculado con *A. flavus* L. (Cuadro 5.6), se mostraron mediciones relativamente homogéneas, sin embargo, en la comparación de medias se presentaron tres grupos significativamente diferentes (Scheffe  $p=0.05$ ), donde el maíz inoculado con las cepas 8, 10 y 33 de *A. flavus* L. presentaron el valor más alto y el maíz con menor contenido de humedad fue el que se inoculó con la cepa 37 de *A. flavus* L.

El contenido de humedad en el maíz inoculado con las cepas de *A. parasiticus* S. (Cuadro 5.7), también fue relativamente homogéneo; En este se presentaron dos grupos estadísticos significativamente diferentes (Scheffe  $p= 0.05$ ), el maíz con mayor contenido de humedad fue el inoculado con la cepa 19 de *A. parasiticus* S. y el de menor contenido de humedad fue el que se inoculó con la cepa 26 de *A. parasiticus* S.

### **4. Tipos de aflatoxinas que produce cada cepa**

En el Cuadro 5.8 se presentan los tipos de aflatoxinas que cada cepa de *Aspergillus flavus* L. y *A. parasiticus* S. produjeron en maíz, lo cual se determinó por el método de cromatografía de capa fina. Por los resultados obtenidos, las cepas productoras de aflatoxinas producen AFB1 principalmente en ambas especies y en mayor cantidad que la AFB2. En algunas cepas de *A. flavus* L. productoras de AFB1, como la 1, 5, 6, 7, 8, 9, 18 y 28, no hubo presencia de AFB2, siendo estas cepas de *A. flavus* L., En las cepas en que se encontró producción de AFB1 y AFB2, fueron las cepas 2, 12, 15, 16, 21, 25, 31, 34, 35, 38 (*A. flavus* L) y 19, 22, 24 y 36 (*A. parasiticus* S).

Algunas cepas produjeron AFB1 y otras, solo trazas de AFB2 (Cuadro 5.8), como lo fueron las cepas 4, 11 y 14. En las cepas que no se identificó ningún tipo de estas dos toxinas (AFB1 y AFB2), son las cepas que se consideran no productoras de aflatoxinas como son las cepas de *A. flavus* L. 3, 10, 13, 17, 20, 27, 30, 33, 37 y en las cepas 26 y 29 (*A. parasiticus* S). Los resultados obtenidos por los métodos de AflaTest

y con la cromatografía en capa fina, fueron coincidentes, en cuanto a las cepas productoras, como en las no productoras.

**Cuadro 5.8. Tipos de aflatoxinas producidas por cada una de las cepas de *Aspergillus flavus* L. y de *Aspergillus parasiticus* S., identificadas por cromatografía de capa fina (TLC) en 20 µl del extracto.**

Cepas	Aflatoxina B1	Aflatoxina B2
1 ●	+	ND
2 ●	+	+
3 ●	ND	ND
4 ●	+	Trazas
5 ●	+	ND
6 ●	+	ND
7 ●	+	ND
8 ●	+	ND
9 ●	+	ND
10 ●	ND	ND
11 ●	+	Trazas
12 ●	+	+
13 ●	ND	ND
14 ●	+	Trazas
15 ●	+	+
16 ●	+	+
17 ●	ND	ND
18 ●	+	ND
19 ♣	+	+
20 ●	ND	ND
21 ●	+	+
22 ♣	+	+
23 ♣	ND	ND
24 ♣	+	+
25 ●	+	+
26 ♣	ND	ND
27 ●	ND	ND
28 ●	+	ND
29 ♣	ND	ND
30 ●	ND	ND
31 ●	+	+
33 ●	ND	ND
34 ●	+	+
35 ●	+	+
36 ♣	+	+
37 ●	ND	ND
38 ●	+	+

● *Aspergillus flavus* Link.    ♣ *Aspergillus parasiticus* Speare    ND = No detectada    + =presencia de la toxina

## **5. Efecto de las cepas de *Aspergillus flavus* L. y *A. parasiticus* S. en el maíz almacenado en tres contenidos de humedad y la producción de aflatoxinas y germinación**

### **5.1. Producción de Aflatoxinas**

En el Cuadro A-5 se presentan los cuadrados medios del análisis de varianza en la producción de aflatoxinas en maíz inoculado, con cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, y almacenado bajo tres contenidos de humedad (15.5, 16.0 y 17.0%); durante 30, 60 y 90 días. En este cuadro, se puede observar que en las fuentes de variación correspondientes a las cepas, al contenido de humedad y a la interacción humedad x cepas las diferencias fueron altamente significativas (Scheffe  $p=0.01$ ) en la producción de aflatoxinas a los 30 y 60 días de almacenamiento, mientras que en la fuente de cepas, a los 90 días resultó ser altamente significativa. Los coeficientes de variación en la producción de aflatoxinas durante los tres tiempos de muestreo resultaron ser de 37.79, 32.89 y 31.52, respectivamente.

### **5.2. Comparación de Medias**

La prueba de comparación de medias (Scheffe  $p=0.05$ ), mostró que la producción de aflatoxinas en maíz a los 30 días de almacenamiento, con un contenido de humedad de 17%, produjo 139.5 ppb (Cuadro 5.9), siendo la mayor producción de aflatoxinas que aquellos granos que tuvieron 15.5 y 16.5% de humedad, los que presentaron 10.8 y 17.4 ppb. A los 60 días de almacenamiento, la menor producción de aflatoxinas se presentó en los granos de maíz almacenados con un 15.5% de humedad (539.5 ppb), siendo estadísticamente inferior a la de los granos con una humedad de 16 y 17%, los cuales fueron estadísticamente iguales entre si con 2,729.5 y 3,456.2 ppb de aflatoxinas, respectivamente. En cambio, a los 90 días de almacenamiento no se presentaron diferencias estadísticas en la producción de aflatoxinas entre los diferentes contenidos de humedad del maíz, sin embargo, los niveles de aflatoxinas a los 90 días de almacenamiento fueron inferiores a los registrados a los 60 días de almacenamiento, a la vez que en cada período de almacenamiento, la producción de aflatoxinas siempre

fue mayor en aquellos granos de maíz que tuvieron mayor contenido de humedad. La prueba de Scheffe, es una comparación de medias estricta, lo que hace que las diferencias entre medias deben ser mayores para poder ser estadísticamente diferentes.

**Cuadro 5.9. Comparación de medias en la producción de aflatoxinas (ppb) en los granos de maíz inoculados con cepas *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. almacenados con tres contenidos de humedad durante 30, 60 y 90 días.**

CONT. HUMEDAD (%)	DÍAS DE ALMACENAMIENTO		
	30	60	90
15.5	10.8 <sup>b*</sup>	539.5 <sup>b*</sup>	91.4 <sup>a*</sup>
16.0	17.4 <sup>b</sup>	2729.5 <sup>a</sup>	49.5 <sup>a</sup>
17.0	139.5 <sup>a</sup>	3456.2 <sup>a</sup>	106.7 <sup>a</sup>

\*En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe,  $p = 0.05$ ).

En el Cuadro 5.10 se presenta la comparación de medias de las cepas de *A. flavus* L. y de *A. parasiticus* S. en la producción de aflatoxinas en los granos de maíz almacenados por 30, 60 y 90 días. Se aprecia que tanto el testigo, así como la cepa *A. flavus* L. de 37 y la 26 de *A. parasiticus* S no produjeron aflatoxinas durante los 30, 60 y 90 días de almacenamiento, mientras que las cepas 35 de *A. flavus* L. y la 36 de *A. parasiticus* S. fueron de las que registraron niveles altos de aflatoxinas durante los tres tiempos de muestreos. Por otro lado, las cepas 25 (5.6 ppb) de *A. flavus* L. y la 24 (3.1 ppb) de *A. parasiticus* S. a los 30 días de almacenamiento presentaron niveles bajos de aflatoxinas, la cepa 36 de *A. parasiticus* S. fue la de mayor producción de aflatoxinas con un promedio de 231.4 ppb y la cepa 24 de *A. parasiticus* S. fue de mediana producción de aflatoxinas, todo ello a los 30 días de almacenamiento. Sin embargo a los 60 y 90 días de almacenamiento, estos niveles se incrementaron considerablemente oscilando estos de 2638 a 4978 ppb. Es importante señalar que a los 90 días de almacenamiento, los niveles de aflatoxinas fueron inferiores a los registrados a los 60 días.

**Cuadro 5.10. Comparación de medias en la producción de aflatoxinas (ppb) en maíz inoculado con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. en tres contenidos de humedad almacenado durante 30, 60 y 90 días.**

CEPAS	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
	30	60	90
TESTIGO	0.0 <sup>b*</sup>	0.0 <sup>b*</sup>	0.0 <sup>b*</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◊	5.6 <sup>b</sup>	4873.0 <sup>a</sup>	188.9 <sup>a</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	151.3 <sup>a</sup>	3203.0 <sup>a</sup>	193.3 <sup>a</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◊	231.4 <sup>a</sup>	4978.0 <sup>a</sup>	131.1 <sup>a</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24☼	3.1 <sup>b</sup>	2638.0 <sup>a</sup>	64.4 <sup>a</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>

\*En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p = 0.05).

◊ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

En las Cuadro 5.11 y Figura 5.3 se muestra la comparación de medias de la interacción contenido de humedad x cepas en la producción de aflatoxinas a los 30 días de almacenamiento, donde se observó que la cepa 35 (*A. flavus* L.) a 15.5 y 16.0% de humedad presentó la mayor cantidad de aflatoxinas con 70.5 y 90 ppb en comparación con las demás cepas, mientras que en la humedad de 17% fue menor la producción de aflatoxinas (293.2 ppb) en relación a la cepa 36 (*A. parasiticus* S.), que registró 657.3 ppb. Lo anterior, muestra que *A. flavus* L. (medianamente productora) mostró mayor producción a niveles bajos de humedad que *A. parasiticus* S. (altamente productora) a los 30 días de almacenamiento. Por lo que respecta al resto de las cepas y el testigo en la semilla con humedades de 15.5 y 16%, estas no presentaron aflatoxinas; en cambio la cepa 25 de *A. flavus* L. y 24 de *A. parasiticus* S., en la humedad de 17% presentaron niveles de aflatoxinas de 16.8 y 9.3 ppb respectivamente.

**Cuadro 5.11. Comparación de medias de la interacción cepas x contenido de humedad en la producción de aflatoxinas (ppb) en granos de maíz inoculados con tres cepas de *A. flavus* L. (25, 35, 37) y 3 cepas de *A. parasiticus* S. (36, 24, 26), almacenados durante 30 días a 27°C y en tres contenidos de humedad.**

CEPAS	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
	15.5%	16%	17%
TESTIGO	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◊	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>	16.8 <sup>bcde</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	70.5 <sup>abcd</sup>	90.0 <sup>abc</sup>	293.2 <sup>ab</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◊	4.8 <sup>de</sup>	31.9 <sup>bde</sup>	657.3 <sup>a</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24☼	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>	9.3 <sup>cde</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>

\*Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p = 0.05).

◊ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

En la interacción cepas x contenido de humedad del maíz almacenado durante 60 días a 27°C (Cuadro 5.12 y Figura 5.3), se pudo observar que en la humedad de 15.5 y 16.0%, la cepa 36 de *A. parasiticus* S. fue la que presentó los niveles más altos de aflatoxinas con 3,006.6 y 8,466.6 ppb respectivamente, mientras que las cepas 24 de *A. parasiticus* S. y 35 de *A. flavus* L. en las mismas humedades presentaron una producción que oscila entre 220 a 6,066 ppb. En el contenido de humedad del 17%, las cepas 24 de *A. parasiticus* S., 25 de *A. flavus* L., 35 de *A. flavus* L. y 36 de *A. parasiticus* S., presentaron niveles de aflatoxinas que van desde 1,626 a 14,133 ppb, siendo la cepa 25 de *A. flavus* L. la que registró la mayor producción de aflatoxinas en esta humedad, mientras que en niveles de 15.5 y 16% de humedad del grano de maíz, los niveles fueron de 60 y 426.6 ppb. Con lo que respecta a las cepas 26 de *A. flavus* L. y 37 de *A. parasiticus* S., no presentaron producción de aflatoxinas en los tres niveles de humedad en que fueron almacenadas, condiciones similares a las que fueron almacenadas los testigos, los cuales tampoco registraron producción de aflatoxinas, ambas fueron estadísticamente inferiores al resto de las cepas evaluadas. Cabe hacer la observación, de que en este tiempo de almacenamiento se presentaron niveles altos en relación a la producción de aflatoxinas registrados a los 90 días de almacenamiento y en los tres niveles de humedad de almacenamiento.

**Cuadro 5.12. Comparación de medias de la interacción cepas x contenido de humedad en la producción de aflatoxinas (ppb) en granos de maíz inoculados con tres cepas de *A. flavus* L. (25, 35, 37) y 3 cepas de *A. parasiticus* S. (36, 24, 26), almacenados durante 60 días a 27°C y en tres contenidos de humedad.**

CEPAS	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
	15.5%	16%	17%
TESTIGO	0.0 <sup>e*</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◇	60.0 <sup>fg</sup>	426.6 <sup>defg</sup>	14133.3 <sup>a</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	490.0 <sup>cdefg</sup>	4146.6 <sup>bcde</sup>	4973.3 <sup>abcd</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◇	3006.6 <sup>abcde</sup>	8466.6 <sup>ab</sup>	3460.0 <sup>bcdef</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24☼	220.0 <sup>efg</sup>	6066.6 <sup>abc</sup>	1626.6 <sup>bcdef</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>

\*Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p = 0.05).

◇ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

En la comparación de medias de la interacción cepas x humedad en los granos de maíz almacenados a 90 días (Cuadro 5.13 y Figuras 5.3), se observó una menor producción de aflatoxinas en relación a los dos tiempos de almacenamiento anteriores (30 y 60 días). En maíz con 15.5% de humedad, la producción de la cepa 36 registró 173.3 ppb y la cepa 35 tuvo 406.6 ppb, ambos valores fueron estadísticamente diferentes en comparación con el testigo y con las cepas de 37 y 26, en las cuales no hubo producción de aflatoxinas. Las cepas 25 de *A. flavus* L. y 24 de *A. parasiticus* S. tuvieron una producción de aflatoxinas de 26.6 y 33.3 ppb, respectivamente.

La cepa 36 en maíz y con un contenido de humedad de 16%, a los 90 días de almacenamiento fue la que presentó mayor producción de aflatoxinas con una media de 166.6 ppb, ésta a su vez fue numéricamente superior en la producción de aflatoxinas que las registradas en las cepas 25, 35 y 24 (*A. parasiticus* S). La producción de aflatoxinas en la cepa 25 fue la que tuvo el mayor promedio con 506 ppb en el contenido de humedad de 17%, mientras que la cepa de menor producción de aflatoxinas fue la 36, con una media de 53.3 ppb, esta cepa fue igual estadísticamente a la cepa 35, la cual produjo 66.6 ppb de aflatoxinas. La ausencia de aflatoxinas se registra tanto en el testigo como en las cepas 37 y 26, sin embargo estas tres últimas son estadísticamente iguales.

**Cuadro 5.13. Comparación de medias de la interacción cepas x contenido de humedad en la producción de aflatoxinas (ppb) en los granos de maíz inoculados con cepas 3 de *A.flavus* L. (25, 35, 37) y 3 cepas de *A.parasiticus* S. (36, 24, 26), almacenados durante 90 días, a 27°C y en tres contenidos de humedad.**

CEPAS	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
	15.5%	16%	17%
TESTIGO	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◇	26.6 <sup>bc</sup>	33.3 <sup>abc</sup>	506.6 <sup>a</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	406.6 <sup>a</sup>	106.6 <sup>ab</sup>	66.6 <sup>abc</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◇	173.3 <sup>a</sup>	166.6 <sup>ab</sup>	53.3 <sup>abc</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24 ☼	33.3 <sup>abc</sup>	40.0 <sup>abc</sup>	120.0 <sup>ab</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>

\*Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p = 0.05).

◇ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

### 5.3. Germinación de los granos de Maíz

En el Cuadro A-6 se muestran los cuadrados medios y significancia del análisis de varianza para la germinación de los granos de maíz inoculados con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., observándose diferencias altamente significativas para las fuentes de humedad, cepas y la interacción humedad x cepas para los 30, 60 y 90 días de almacenamiento, con excepción de la fuente de cepas a los 30 días de almacenamiento, la cual resultó ser no significativa. Los coeficientes de variación no fueron transformados a valores angulares, ya que estos valores resultaron ser mayores a los registrados en forma original, sin embargo, estos coeficientes fueron entre 14.86 a 44.14%.

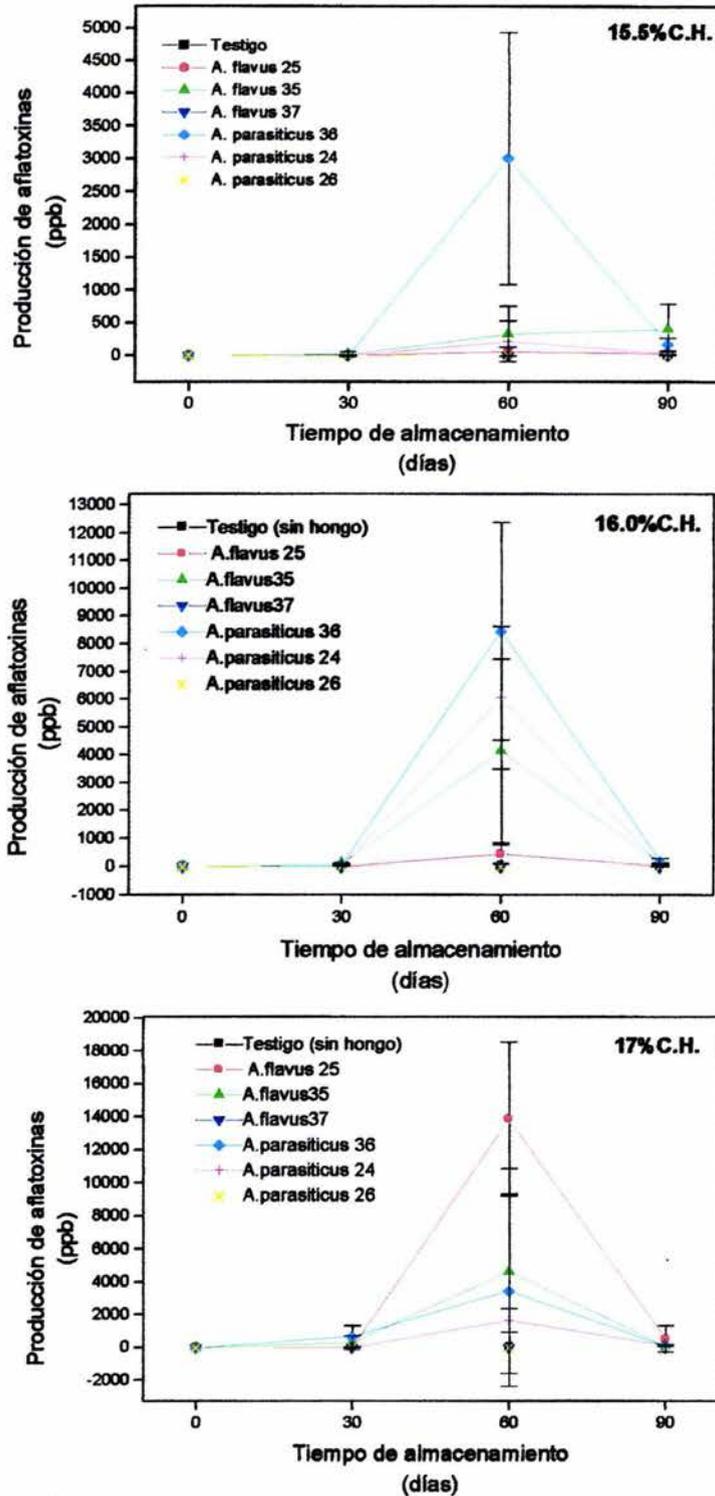


Figura 5.3. Producción de aflatoxinas de 3 cepas de *A. flavus* L y 3 cepas de *A. parasiticus* S en grano de maíz en las humedades 15.5, 16 y 17 %, incubadas a 27°C, durante 0, 30, 60 y 90 días.

#### 5.4. Comparación de Medias de la germinación

En la comparación de medias para la fuente de humedad y el comportamiento de la germinación (Cuadro 5.14), se observó que a medida que se incrementa el período de almacenamiento, la germinación disminuía considerablemente, de igual manera se observó también que a medida que se incrementó el contenido de humedad de los granos de maíz se reducía el poder germinativo. En este sentido, los granos de maíz almacenados a contenidos de humedad de 15.5% mantuvieron los porcentajes más altos de germinación a través del periodo de almacenamiento, con un promedio de 87, 44 y 26%, a los 30, 60 y 90 días respectivamente; mientras que en los granos almacenados con 17% de humedad a los 30, 60 y 90 días presentaron valores de 33, 1 y 0% de germinación, siendo estos valores los más bajos en relación a los granos de maíz almacenados a 16.0 % de humedad.

En cuanto a las cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. (Cuadro 5.15) sobre el efecto de la germinación de los granos de maíz almacenados a los 30 días, los datos muestran que la cepa 25 presentó una germinación de 68%, siendo el más alto numéricamente, sin embargo, no difiere estadísticamente del resto de las cepas, ya que presentaron valores de 56 (testigo) a 64% respectivamente.

**Cuadro 5.14. Comparación de medias en la germinación de los granos de maíz Inoculados con cepas de *A.flavus* L. y *A.parasiticus* S., almacenados bajo tres contenidos de humedad durante 30, 60 y 90 días.**

C.H. (%)	PORCENTAJE DE GERMINACIÓN		
	días de almacenamiento		
	30	60	90
15.5	87 <sup>a</sup>	44 <sup>a</sup>	26 <sup>a</sup>
16.0	64 <sup>b</sup>	14 <sup>b</sup>	9 <sup>b</sup>
17.0	33 <sup>c</sup>	1 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>

\*En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p = 0.05).

A los 60 días de almacenamiento (Cuadro 5.15), el testigo fue el que presentó el porcentaje más alto de germinación (49%), seguido por las cepas 35 (24%), 26 (23%) y 25 (16%), mientras que las cepas 36 y 24 inoculadas en los granos de maíz fueron las que presentaron los porcentajes más bajos con 11 y 6%.

De igual manera, a los 90 días de almacenamiento (Cuadro 5.15), el testigo volvió a mostrar el mayor porcentaje de germinación con una media de 43%, siendo estadísticamente superior y diferente al resto de las germinaciones de maíz inoculadas con el resto de las cepas, mientras que las cepas 24, 37 y 36 registraron las germinaciones más bajas con 2, 3 y 0%, siendo estas tres estadísticamente iguales.

**Cuadro 5.15. Comparación de medias del porcentaje de germinación del maíz inoculado con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. almacenado durante 90 días y diferentes contenidos de humedad.**

CEPAS	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
	30	60	90
TESTIGO	56 <sup>a</sup>	49 <sup>a</sup>	43 <sup>a</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◇	68 <sup>a</sup>	16 <sup>bc</sup>	7 <sup>cd</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	61 <sup>a</sup>	24 <sup>b</sup>	10 <sup>bc</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	57 <sup>a</sup>	9 <sup>bc</sup>	3 <sup>de</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◇	64 <sup>a</sup>	11 <sup>bc</sup>	0 <sup>e</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24 ☼	63 <sup>a</sup>	6 <sup>c</sup>	2 <sup>de</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	61 <sup>a</sup>	23 <sup>b</sup>	15 <sup>bc</sup>

\*En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p = 0.05).

◇ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

En las Figuras 5.4, 5.5 y 5.6 se presenta el comportamiento de la germinación de los granos de maíz a través del tiempo de almacenamiento con diferentes humedades y los tipos de cepas utilizadas en la inoculación de los granos. En la Figura 5.4, se muestran el maíz almacenado a los 30 días, donde los granos de maíz del testigo con 15.5 de humedad, presentaron el mayor porcentaje con 99%, y fue estadísticamente igual a las germinaciones registradas en los granos de maíz inoculados con las cepas

26 (98%) y superiores a las cepas 25, 35 y 37, las cuales presentaron 91, 86 y 90% respectivamente; mientras que la menor germinación fue para la cepa 36 con un promedio de 71%.

En las germinaciones de los granos de maíz almacenados a 16% de humedad durante 30 días, inoculados con la cepa 35 fueron los que registraron la mayor germinación con 84%, siendo significativamente diferentes a los resultados obtenidos en la germinación de los granos de maíz del testigo y con la cepa 26 con 52 y 57%. En la humedad de 17%, la germinación de los granos de maíz disminuyó significativamente en comparación con la humedad de los granos de 15.5 y 16%, donde la germinación del maíz inoculado con la cepa 35 fue de 13%, seguida por la germinación del testigo y de los granos de maíz inoculados con la cepa 37, quienes tuvieron 16 y 18%, mientras que los valores más altos fueron para los granos de maíz inoculados con las cepas 25, 36 y 24 con 52, 57 y 49%, respectivamente.

En la germinación de los granos de maíz almacenados a 60 días y con un contenido de humedad de 15.5% (Figura 5.5), el testigo registró el valor más alto con un 89%, siendo superior a las germinaciones registradas con las diferentes cepas inoculadas en el maíz. La cepa que menos afectó la germinación en esta humedad fue la 35 con 54%, seguida de las cepas 26, 25 y 36, quienes tuvieron 50, 44 y 31%, mientras que el menor valor fue para la cepa 24 con 16% de germinación.

En la humedad de almacenamiento del 16%, se observó que el testigo presentó un 50% de germinación, siendo estadísticamente diferente a los granos de maíz inoculados con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. La cepa 26 en maíz presentó una media de 21%, siendo la que menos afectó la germinación, mientras que la cepa 36 y 37 registraron la menor germinación con un 1%. A 17% de humedad en los granos de maíz, la germinación disminuyó drásticamente, ya que la germinación de los granos de maíz del testigo fue de 9%, mientras que la germinación en las semillas inoculadas con el resto de las cepas, fue nula.

En las medias de germinación de los granos de maíz almacenados durante 90 días y en tres diferentes contenidos de humedad (Figura 5.6), se observó que en la humedad de 15.5%, la germinación más alta fue para el grano de maíz del testigo, el cual tuvo una media de 90% y fue estadísticamente superior y diferente a las germinaciones registradas en los granos de maíz inoculados con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., en donde las cepas 25, 35 y 26 presentaron una media de 21, 27 y 26% respectivamente; en cambio los granos de maíz que presentaron una menor germinación fueron aquellos granos de maíz inoculados con las cepas 37, 24 y 36 con 8, 7 y 1%.

La germinación de los granos de maíz del testigo con un contenido de humedad de 16% registraron un 40%, resultando ser mayor que los granos de maíz inoculados, los cuales disminuyeron considerablemente su germinación, estando éstas por debajo del 18%. En cambio, en la humedad de 17%, la germinación de los granos de maíz inoculados con las diferentes cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., al igual que el testigo almacenado a 90 días, fue de 0%, esto se debió principalmente a la acción de la humedad (en el caso del testigo) y de los hongos.

### **5.5. Contenido de humedad de los granos de maíz**

En el Cuadro A-7 se refiere a los cuadrados medios del análisis de varianza de los datos del contenido de humedad registrados durante la prueba de almacenamiento de la semilla de maíz inoculadas con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., en donde la fuente de variación de humedad resultó ser altamente significativa ( $p=0.01$ ) a los 30, 60 y 90 días de almacenamiento, comportamiento similar presentó la fuente de variación de cepas, mientras que en la interacción humedad x cepas a los 30 y 60 días fueron altamente significativas ( $p=0.01$ ), mientras que a los 90 días fue significativa ( $p=0.05$ ). Los coeficientes de variación en el contenido de humedad se consideran bastante bajos, ya que oscilaron entre 2.3 a 2.8%.

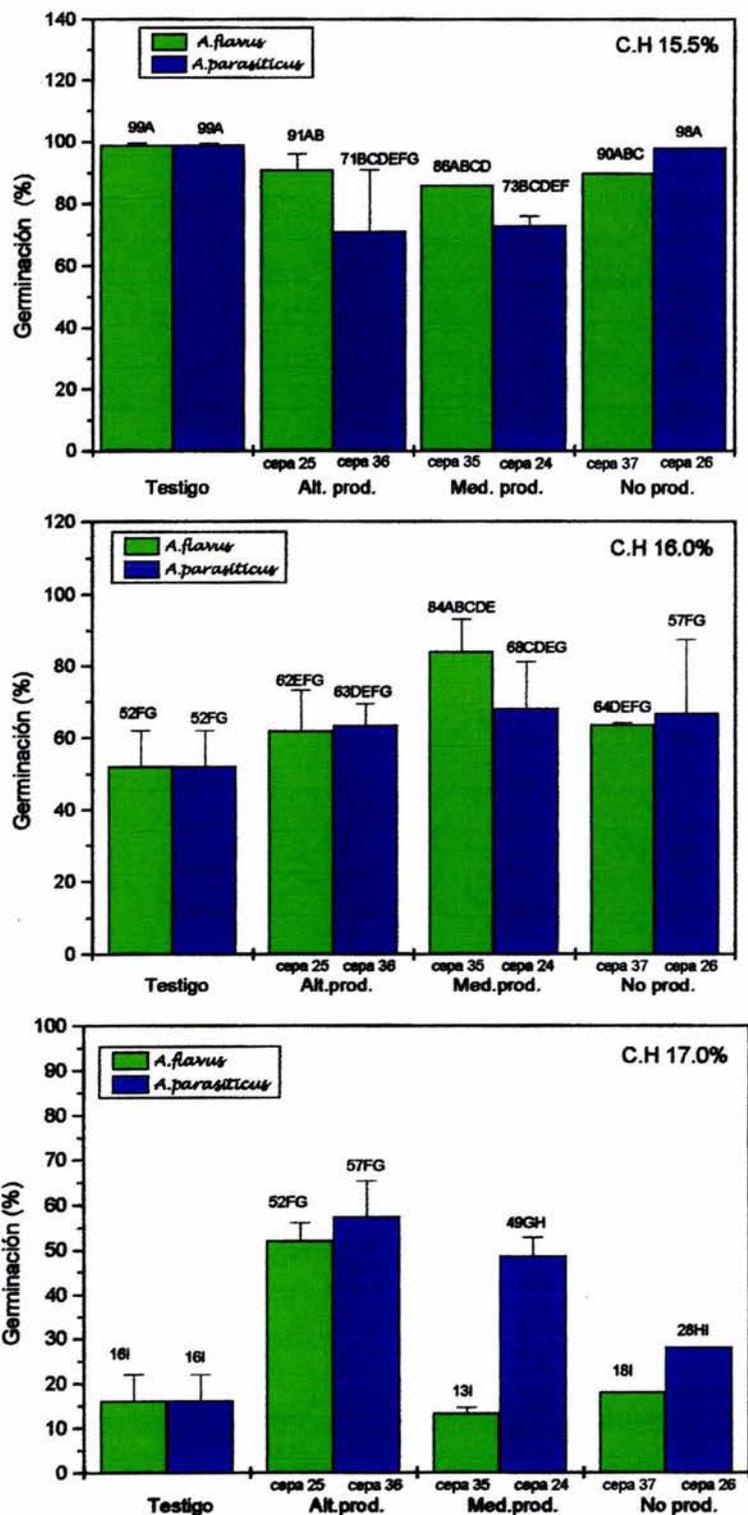
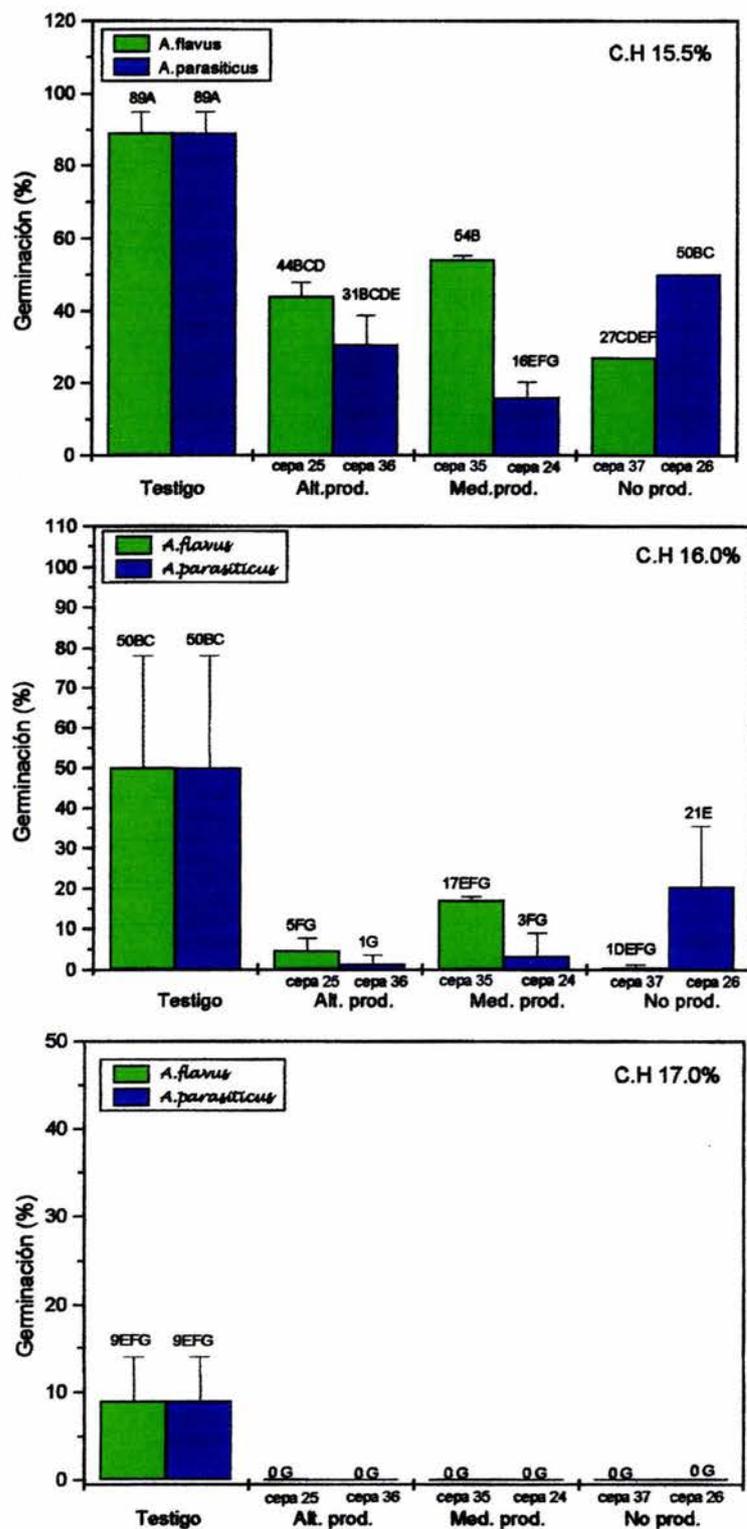


Figura 5.4. Comparación de medias de la germinación de los granos de maíz con tres contenidos de humedad inoculados con cepas de *A. flavus* L. (25, 35, 37) y *A. parasiticus* S. (36, 24, 26), almacenados durante 30 días.



**Figura 5.5. Comparación de medias de la germinación de los granos de maíz con tres contenidos de humedad inoculados con cepas de *A. flavus* L. (25, 35, 37) y *A. parasiticus* S. (36, 24, 26), almacenados durante 60 días.**

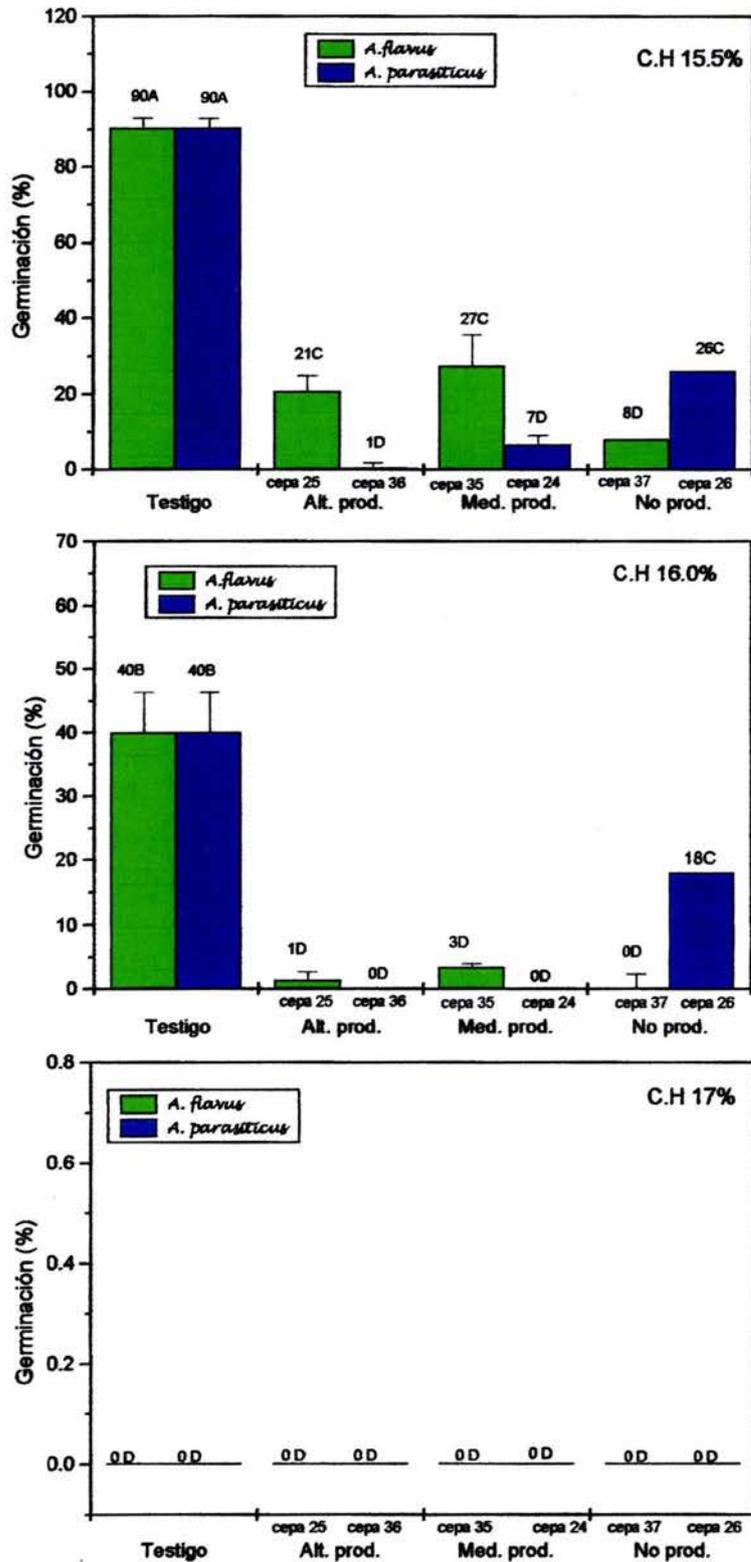


Figura 5.6. Comparación de medias de la germinación de los granos de maíz con tres contenidos de humedad inoculados con cepas de *A. flavus* L. (25, 35, 37) y *A. parasiticus* S. (36, 24, 26), almacenados 90 días.

## 5.6. Comparación de medias del contenido de humedad de los granos de maíz

El contenido de humedad del grano no presentó variación significativa a partir de los 30 días de almacenamiento (Cuadro 5.16). Sin embargo, las humedades evaluadas mostraron un incremento gradual durante los primeros 30 días de almacenamiento en relación a sus humedades originales, esto probablemente ocasionado por el efecto de la inoculación de los hongos y a su actividad metabólica, más la acción respiratoria de los granos de maíz.

En cuanto a la comparación de medias en la humedad de los granos de maíz por medio de la acción de las cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. en el maíz almacenado a los 30 días, no presentaron diferencias entre sí, ya que estas humedades oscilaron entre 16.96 a 17.62% (Cuadro 5.17).

**Cuadro 5.16. Comparación de medias del contenido de humedad (%) de los granos de maíz inoculados con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., almacenados a tres contenidos de humedad durante 30, 60 y 90 días.**

CONT. DE HUMEDAD (%)	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
	30	60	90
15.5	16.38 <sup>c</sup>	16.12 <sup>c</sup>	16.07 <sup>c</sup>
16	17.17 <sup>b</sup>	16.82 <sup>b</sup>	17.20 <sup>b</sup>
17	18.11 <sup>a</sup>	17.76 <sup>a</sup>	18.18 <sup>a</sup>

\*En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, P = 0.05).

Mientras que a los 60 días, el testigo presentó el menor porcentaje de humedad en los granos de maíz, con una media de 15.9%, siendo estadísticamente inferior al resto de las cepas, en donde la cepa 24 presentó el porcentaje más alto de humedad, mientras que a los 90 días, el testigo fue el que registró el menor porcentaje de humedad con 16.37 esto es debido a que la actividad metabólica de los hongos no fue tan alta (Cuadro 5.17).

**Cuadro 5.17. Comparación de medias de contenido de humedad (%) de los granos de maíz inoculados con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., almacenados a tres contenidos de humedad durante 30, 60 y 90 días.**

CEPAS	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
	30	60	90
TESTIGO	17.28 <sup>a*</sup>	15.90 <sup>c*</sup>	16.37 <sup>b*</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◇	17.14 <sup>a</sup>	17.05 <sup>ab</sup>	17.26 <sup>a</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	17.07 <sup>a</sup>	16.69 <sup>b</sup>	17.44 <sup>a</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	16.96 <sup>a</sup>	17.09 <sup>ab</sup>	16.91 <sup>bc</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◇	17.46 <sup>a</sup>	17.29 <sup>ab</sup>	17.48 <sup>a</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24☼	17.62 <sup>a</sup>	17.46 <sup>a</sup>	17.59 <sup>a</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	17.02 <sup>a</sup>	16.82 <sup>ab</sup>	16.99 <sup>ab</sup>

\*En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p = 0.05).

◇ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

En los Cuadros 5.15, 5.16 y 5.17. Se presentan las medias de los contenidos de humedad de los granos de maíz almacenados a 30, 60 y 90 días para la interacción cepas x humedad. A los 30 días de almacenamiento (Cuadro 5.18) y en el contenido de humedad de 15.5%, el valor mayor en la humedad fue para los granos de maíz inoculados con la cepa 24 (*A. parasiticus* S.) con una media de 16.70%; y el valor menor fue el de la cepa 37 con una media de 16.05%. Para el contenido de humedad de 16 y 17%, no hubo diferencia estadística entre ambas humedades.

**Cuadro 5.18. Comparación de medias del contenido de humedad (%) de los granos de maíz inoculados con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. almacenados en tres contenido de humedad durante 30 días a 27°C.**

CEPAS	C. H. 15.5%	C.H. 16%	C.H. 17%
TESTIGO	16.10 <sup>f</sup>	17.52 <sup>abcde</sup>	18.16 <sup>ab</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◇	16.36 <sup>ef</sup>	17.08 <sup>abcdef</sup>	18.00 <sup>ab</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	16.38 <sup>ef</sup>	16.53 <sup>def</sup>	18.31 <sup>a</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	16.05 <sup>f</sup>	16.92 <sup>bcdef</sup>	17.93 <sup>abc</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◇	16.65 <sup>cdef</sup>	17.68 <sup>abcd</sup>	18.06 <sup>ab</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24☼	16.70 <sup>cdef</sup>	18.06 <sup>ab</sup>	18.11 <sup>ab</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	16.36 <sup>ef</sup>	16.45 <sup>def</sup>	18.25 <sup>a</sup>

\*Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe p = 0.05).

◇ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

A los 60 días de almacenamiento, se muestra que en la humedad de 15.5%, el testigo presentó el menor contenido con 15.42% y fue estadísticamente igual al contenido de humedad de los granos de maíz inoculados con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. (Cuadro 5.19), a excepción de los granos de maíz inoculados con la cepa 24 (*A. parasiticus* S.), quien presentó una media de 16.69%, siendo el valor más alto en esta humedad.

Los granos de maíz con 16% de contenido de humedad, del testigo presentaron una humedad de 16.02%, por lo que fue estadísticamente diferente a las humedades de los granos de maíz inoculados con las cepas 36 y 24 (*A. parasiticus* S.), que tuvieron 17.61 y 17.71% respectivamente (Cuadro 5.19). Para el contenido de humedad de 17%, los granos de maíz con el menor contenido de humedad fue para el testigo con un promedio de 16.2% y fue estadísticamente diferente a la humedad de los granos de maíz inoculados con el resto de las cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., a excepción de los granos de maíz inoculados con la cepa 35 (*A. flavus* L.), la cual presentó una media de 17.50%.

**Cuadro 5.19. Comparación de medias del contenido de humedad (%) de los granos de maíz inoculados con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. almacenados con tres contenido de humedad durante 60 días a 27°C.**

CEPAS	C. H. 15.5%	C.H. 16%	C.H. 17%
TESTIGO	15.42 <sup>h*</sup>	16.02 <sup>fgh</sup>	16.20 <sup>ef</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◇	16.37 <sup>defgh</sup>	16.84 <sup>cdefgh</sup>	17.94 <sup>ab</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	16.09 <sup>fgh</sup>	16.48 <sup>cdefgh</sup>	17.50 <sup>abcde</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	16.30 <sup>efgh</sup>	16.96 <sup>bcdef</sup>	18.03 <sup>ab</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◇	16.32 <sup>efgh</sup>	17.61 <sup>abcd</sup>	17.94 <sup>ab</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24 ☼	16.69 <sup>cdefg</sup>	17.71 <sup>abc</sup>	18.00 <sup>ab</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	15.66 <sup>gh</sup>	16.09 <sup>fgh</sup>	18.70 <sup>a</sup>

\*Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe p= 0.05).

◇ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

En el Cuadro 5.20 se muestran las medias de la interacción cepas x humedad para el contenido de humedad de 15.5%, los granos de maíz inoculados con la cepa de *A. parasiticus* S. 26, los cuales presentaron una humedad de 15.12%, resultando ser la

menor presentada por los granos de maíz, mientras que la mayor registrada fue para los granos de maíz inoculados por la cepa 36 con 16.81%, por lo que fue superior a la presentada por el testigo y a la cepa 26.

**Cuadro 5.20. Comparación de medias del contenido de humedad de los granos de maíz inoculados con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. almacenados con tres contenidos de humedad durante 90 días a 27°C.**

CEPAS	C. H. 15.5%	C.H. 16%	C.H. 17%
TESTIGO	15.24 <sup>gh*</sup>	16.72 <sup>ef</sup>	17.16 <sup>cde</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◊	16.54 <sup>ef</sup>	17.15 <sup>cde</sup>	18.10 <sup>abc</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	16.35 <sup>efg</sup>	17.30 <sup>bcde</sup>	18.69 <sup>a</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	15.81 <sup>fgh</sup>	16.50 <sup>ef</sup>	18.42 <sup>ab</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◊	16.81 <sup>def</sup>	17.40 <sup>bcde</sup>	18.24 <sup>abc</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24☼	16.65 <sup>ef</sup>	17.95 <sup>abcd</sup>	18.19 <sup>abc</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	15.12 <sup>h</sup>	17.41 <sup>bcde</sup>	18.42 <sup>ab</sup>

\*Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe p = 0.05).

◊ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

Para la humedad de almacenamiento de 16%, los granos de maíz que tuvieron la menor fue para los que se inocularon con la cepa 37 con un 16.5%, e igual estadísticamente a las humedades de los granos de maíz del testigo y a los inoculados con las cepas restantes, y solo difirió estadísticamente de la humedad de los granos de maíz en donde se inocularon con la cepa 24, registrando la mayor humedad con un promedio de 17.95%. Mientras que en la humedad de 17%, los granos de maíz con menor humedad fueron para el testigo con un valor de 17.16%, resultando ser diferente estadísticamente a los granos de maíz inoculados con las cepas 35, 37 (*A. flavus* L.) y 36 (*A. parasiticus* S.), las cuales presentaron un 18.69, 18.42, 18.24%, respectivamente (Cuadro 5.20).

## **6. Efecto del maíz inoculado con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. almacenado en tres temperaturas en la producción de aflatoxinas y la germinación de los granos de maíz**

### **6.1 Producción de aflatoxinas**

En el Cuadro A-8 se presentan los cuadrados medios del análisis de varianza en la producción de aflatoxinas en los granos de maíz inoculados con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., evaluada a los 8, 16 y 24 días con una humedad de 17%. Se observó que en las fuentes de variación de temperatura, cepas y temperaturas x cepas resultaron ser altamente significativas para los tres tiempos de almacenamiento, con excepción de la fuente de temperaturas a los 8 días, la cual resultó ser no significativa. Los coeficientes de variación se consideraron moderadamente altos debido a las características de la variable evaluada, oscilando estas entre 21.68 a 45.81%.

### **6.2. Comparación de Medias**

En el Cuadro 5.21 se muestra la comparación de medias en la producción de aflatoxinas en los granos de maíz inoculados con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. almacenados a 20, 27 y 34 °C, durante 8, 16 y 24 días. En la temperatura de 20°C, durante los tres tiempos de evaluación se presentó la menor producción de aflatoxinas, con una media de 11.95, 1.90 y 2.7 ppb para los 8, 16 y 24 días; sin embargo, a medida que la temperatura de almacenamiento se incrementaba los niveles de aflatoxinas aumentaron, en este caso, en la temperatura de 34°C, y a los 8, 16 y 24 días se registraron niveles de aflatoxinas de 64.52, 577.62 y 1,078.6 ppb respectivamente.

Con relación al tiempo de almacenamiento, a los 8 días y en las tres temperaturas de almacenamiento no existieron diferencias estadísticas en la producción de aflatoxinas, aunque numéricamente en la temperatura de 34°C, el nivel de aflatoxinas fue alto. A los 16 días de almacenamiento solo hubo diferencia estadística en la producción de aflatoxinas en la temperatura de 20°C, comparada con la temperatura de 27 y 34°C. A los 24 días de almacenamiento si hubo diferencia

estadística en la producción de aflatoxinas en las tres temperaturas, en donde la máxima producción fue en la temperatura de 34°C, con una media de 1,078.6 ppb.

**Cuadro 5.21. Comparación de medias en la producción de aflatoxinas (ppb) en los granos de maíz inoculados con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., almacenados a 17% de humedad por 8,16 y 24 días.**

TEMPERATURA (°C)	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
	8	16	24
20	11.95 <sup>a</sup>	1.90 <sup>b</sup>	2.7 <sup>c</sup>
27	18.38 <sup>a</sup>	156.48 <sup>a</sup>	741.0 <sup>b</sup>
34	64.52 <sup>a</sup>	577.62 <sup>a</sup>	1078.6 <sup>a</sup>

\*En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe p = 0.05).

En cuanto a la producción de aflatoxinas de las diferentes cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. inoculadas en los granos de maíz y almacenados a los 8, 16 y 24 días (Cuadro 5.22), se observó que en la cepa 26 (*A. parasiticus* S.) y 37 (*A. flavus* L.) no hubo producción de aflatoxinas, al igual que en el testigo durante los tres tiempos de almacenamiento; Las cepas 25 (*A. flavus* L.) y 36 (*A. parasiticus* S.) a los 8 días de almacenamiento tuvieron producciones de aflatoxinas por debajo de la unidad de ppb. Sin embargo, estas mismas cepas a los 16 y 24 días tuvieron incrementos considerables de aflatoxinas, llegando a 1,684.4 ppb (Cepa 36, *A. parasiticus* S.), que fue la máxima producción registrada. Por otro lado, la cepa 24 (*A. parasiticus* S.) fue la que manifestó los máximos niveles de aflatoxinas cuando estuvo almacenada por 8, 16 y 24 días de almacenamiento con 219.11, 1,226.8 y 1,623.3 ppb respectivamente.

**Cuadro 5.22. Comparación de medias de la producción de aflatoxinas (ppb) en maíz inoculado con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., almacenado a 17% de humedad y en tres temperaturas durante 8, 16 y 24 días.**

CEPAS	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
	8	16	24
TESTIGO	0.00 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>d</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◊	0.22 <sup>b</sup>	45.6 <sup>bc</sup>	260.9 <sup>c</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	1.33 <sup>b</sup>	141.7 <sup>b</sup>	683.2 <sup>c</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	0.00 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>d</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◊	0.67 <sup>b</sup>	303.3 <sup>a</sup>	1684.4 <sup>a</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24☼	219.11 <sup>a</sup>	1226.8 <sup>a</sup>	1623.3 <sup>b</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	0.00 <sup>b</sup>	0.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>d</sup>

\*En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe p= 0.05).

◊ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

En las Cuadro 5.23 y Figura 5.7 se presentan las medias de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. en maíz almacenado a 20, 27 y 34°C, durante 8 días; Se observó que la cepa 24 (*A. parasiticus* S.) fue la que tuvo la mayor producción de aflatoxinas en las temperaturas de 20, 27 y 34°C, con 80.3, 125.3 y 451.6 ppb, mientras que el resto de las cepas tuvieron una producción muy baja de aflatoxinas, la cepa 35 de *A. flavus* L. produjo solo 2.6 ppb; en tanto que las cepas *A. flavus* L. 25, 35, 37 y las cepas de *A. parasiticus* S. 26 y 36, no presentaron producción de aflatoxinas al igual que en el testigo no inoculado, a 34°C.

**Cuadro 5. 23. Comparación de medias de la producción de aflatoxinas (ppb) en maíz inoculado con cepas de *A. flavus* L. (25, 35, 37) y *A. parasiticus* S. (36, 24, 26), incubado a 20, 27y 34°C, durante 8 días.**

CEPAS	TEMPERATURAS		
	20°C	27°C	34°C
TESTIGO	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◊	0.6 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	2.6 <sup>b</sup>	1.3 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◊	0.0 <sup>b</sup>	2.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24☼	80.3 <sup>b</sup>	125.3 <sup>b</sup>	451.6 <sup>a</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>b</sup>

\*Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p = 0.05).

◊ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

Para los 16 días de almacenamiento y 20°C, no se presentó la producción de aflatoxinas tanto en el testigo como en las cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., con la excepción de la cepa *A. parasiticus* S. 24, la cual presentó una producción de aflatoxinas de 13.3 ppb; En cambio, en la temperatura de 27°C, la producción mayor fue en los granos de maíz inoculados con la cepa 36 con una media de 553 ppb (Cuadro 5.24 y Figuras 5.7), seguida por la cepa 35 con una media de 425 ppb, ambas fueron estadísticamente iguales y superiores al testigo, mientras que las cepa 24 presentó la menor producción de aflatoxinas con 0.3 ppb. Para la temperatura de 34°C, la mayor producción de aflatoxinas se detectó en los granos de maíz inoculados con la cepa *A. parasiticus* S. 24 con una media de 3,666.6 ppb, y la cepa que registró la menor producción fue la cepa *A. flavus* L. 25 con una media de 20 ppb, en cambio, la cepa de *A. flavus* L. 35 que es considerada como productora de aflatoxinas no tuvo producción a esta temperatura de almacenamiento. Por otro lado, el testigo y los granos de maíz inoculados con la cepa de *A. flavus* L. 37 y de *A. parasiticus* S. 26 no tuvieron producción de aflatoxinas en ninguna de las tres temperaturas a los 16 días de almacenamiento.

**Cuadro 5.24. Comparación de medias de la producción de aflatoxinas (ppb) en maíz inoculado con Cepas de *A. flavus* L. (25, 35, 37) y *A. parasiticus* S. (36, 24, 26) incubado a 20, 27 y 34°C, durante 16 días.**

CEPAS	TEMPERATURAS		
	20°C	27°C	34°C
TESTIGO	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◊	0.0 <sup>e</sup>	116.6 <sup>cd</sup>	20.0 <sup>de</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	0.0 <sup>e</sup>	425.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>e</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>	356.6 <sup>bc</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◊	0.0 <sup>e</sup>	553.0 <sup>b</sup>	0.0 <sup>e</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24☼	13.3 <sup>de</sup>	0.3 <sup>de</sup>	3666.6 <sup>a</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>	0.0 <sup>e</sup>

\* Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p = 0.05).

◊ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

En las Cuadro 5.25 y Figuras 5.7 se muestran la producción de aflatoxinas en los granos de maíz inoculados con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. a los 24 días de almacenamiento, en donde se observó que en la temperatura de 20°C, hubo baja

producción de aflatoxinas comparado con la que se produjo en las temperaturas de 27 y 34°C., en donde las únicas cepas que tuvieron una producción de aflatoxinas fueron las cepas de *A. flavus* L. 25 y 35 con una media de 2.6 y 16.3 ppb. Esta baja producción de aflatoxinas se debió a que esta temperatura no es la adecuada para producir aflatoxinas; y tanto en el testigo como en las que se inocularon con las cepas *A. flavus* L. 37 y *A. parasiticus* S. 26 tampoco hubo producción de aflatoxinas, sin embargo, estas cepas no son consideradas como productoras de aflatoxinas. En la temperatura de 27°C, sí hubo producción de aflatoxinas en los granos de maíz inoculados con las cepas productoras de aflatoxinas, debido a que esta temperatura es óptima para la producción de éstas. La cepa con mayor producción de aflatoxinas fue la 36 con un promedio de 2,336.6 ppb, seguida por la cepa 35 con una media de 2,033.3 ppb, siendo éstas diferentes estadísticamente a la cepa 24, que produjo niveles menores de aflatoxinas con un promedio de 36.6 ppb.

En la temperatura de 34°C, no hubo producción de aflatoxinas en el maíz inoculado con las cepas *A. flavus* L. 25 y 35, a pesar de que estas dos cepas son consideradas como productoras de aflatoxinas, sin embargo sí hubo crecimiento del hongo. Las cepas que tuvieron producción de aflatoxinas fueron aquellas que se inocularon con las cepas *A. parasiticus* S. 36 y 24 donde hubo una alta producción de aflatoxinas con una media de 2,716.6 y 4,833.3 ppb respectivamente.

**Figura 5.25. Comparación de medias de la producción de aflatoxinas (ppb) en maíz inoculado con cepas de *A. flavus* L. (25, 35, 37) y *A. parasiticus* S. (36, 24, 26), incubado a 20, 27 y 34°C, durante 24 días.**

CEPAS	TEMPERATURAS		
	20°C	27°C	34°C
TESTIGO	0.0 <sup>d</sup>	0.0 <sup>d</sup>	0.0 <sup>d</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◊	2.6 <sup>d</sup>	780.0 <sup>c</sup>	0.0 <sup>d</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	16.3 <sup>d</sup>	2033.3 <sup>bc</sup>	0.0 <sup>d</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	0.0 <sup>d</sup>	0.0 <sup>d</sup>	0.0 <sup>d</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◊	0.0 <sup>d</sup>	2336.6 <sup>bc</sup>	2716.6 <sup>ab</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24 ☼	0.0 <sup>d</sup>	36.6 <sup>d</sup>	4833.3 <sup>a</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	0.0 <sup>d</sup>	0.0 <sup>d</sup>	0.0 <sup>d</sup>

\* Las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p = 0.05).

◊ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

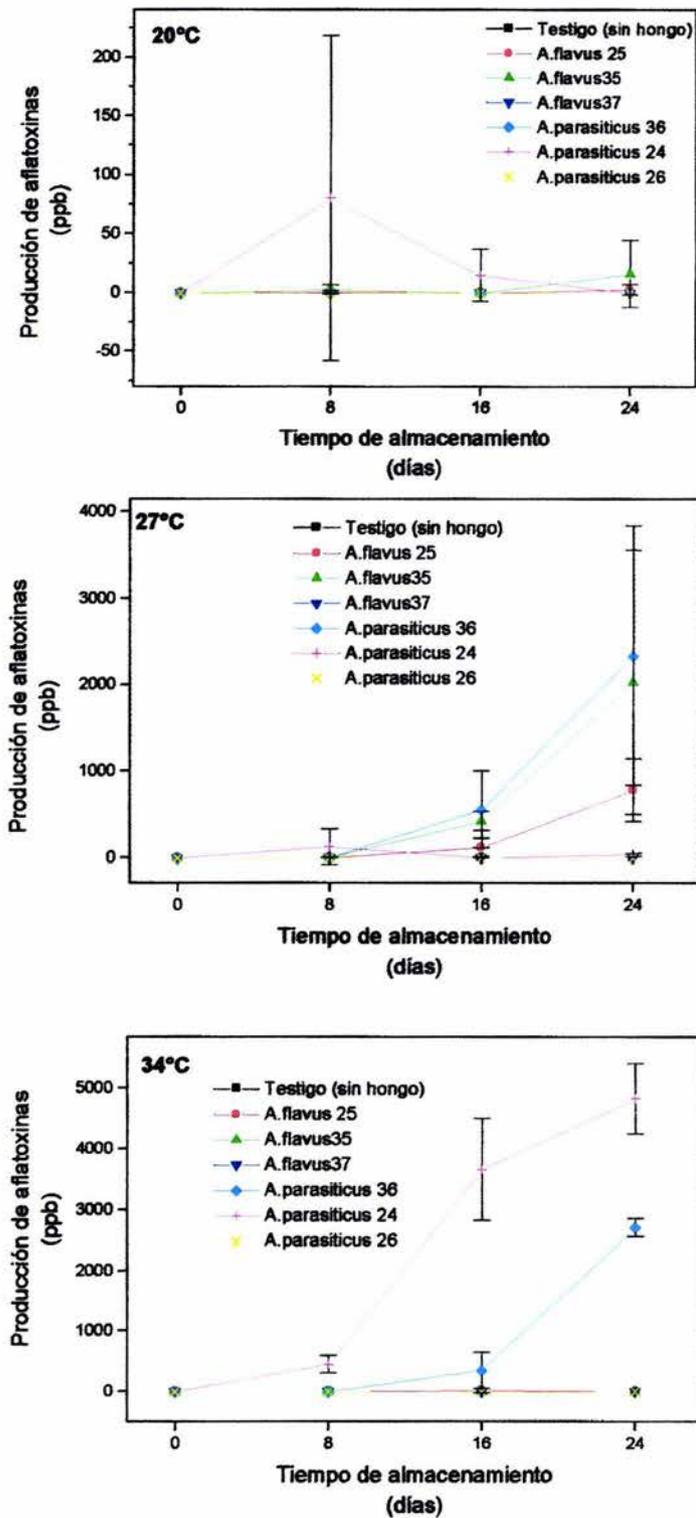


Figura 5.7. Producción de aflatoxinas de 3 cepas de *A. flavus* L y 3 cepas de *A. parasiticus* S en grano de maíz en las humedades 15.5, 16 y 17 %, incubadas a 27°C, durante 0, 30, 60 y 90 días.

### 6.3 Germinación de los granos de maíz

En el Cuadro A-9 se presentan los cuadrados medios y significancia del análisis de varianza para la germinación de los granos de maíz inoculados con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. almacenados bajo tres temperaturas durante 8, 16 y 24 días. Las fuentes de variación de temperatura, cepa y temperaturas x cepas resultaron ser altamente significativas para los tres tiempos de evaluación, lo que demuestra que las cepas y temperaturas tienen diferentes comportamientos en la manifestación de la germinación. Los coeficientes de variación se encuentran en valores aceptables, ya que éstos oscilan entre 6.24 y 13.71%.

En el Cuadro 5.26 se presentan las medias de germinación en las diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento, en donde la germinación a los 8 días de almacenamiento fue mayor en las temperaturas de 20 y 27°C, con un promedio de 98 y 95%, y en la temperatura de 34°C, la germinación disminuyó hasta 64%, siendo ésta estadísticamente inferior y diferente a los dos valores de germinación mencionados anteriormente. A los 16 días de almacenamiento, las germinaciones de los granos de maíz resultaron ser diferentes estadísticamente entre sí para cada temperatura evaluada, donde la germinación más alta fue en la temperatura de 20°C, con un 98% y la germinación mas baja fue en los granos de maíz que estuvieron almacenados a 34°C, con un 39%. Mientras que a los 24 días de almacenamiento, la germinación más alta fue para aquellos granos de maíz almacenados a 20°C, con 97% y a 34°C, fue de 30%.

**Cuadro 5.26. Comparación de medias del porcentaje de germinación de los granos de maíz inoculados con cepas de *A.flavus* L. y *A.parasiticus* S., almacenados durante 8,16 y 24 días con tres contenidos de humedad.**

TEMPERATURA (°C)	Porcentaje de germinación		
	Días de almacenamiento		
	8	16	24
20	98 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>
27	95 <sup>a</sup>	86 <sup>b</sup>	64 <sup>b</sup>
34	64 <sup>b</sup>	39 <sup>c</sup>	30 <sup>c</sup>

\*En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe p = 0.05).

En el Cuadro 5.27 se muestran las medias de los porcentajes de germinación de los granos de maíz, cuando éstos fueron inoculados con diferentes cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. y almacenados a 8, 16 y 24 días. A los 8 días de almacenamiento, los granos de maíz del testigo registraron el valor más alto de germinación con un 99%, sin embargo este valor no difirió estadísticamente de las germinaciones de los granos de maíz que fueron inoculados con las cepas *A. parasiticus* S. 24, 26 que tuvieron un 93% y la cepa *A. parasiticus* S. 36 tuvo un 92%; en cambio, los granos de maíz que tuvieron la menor germinación correspondió a la cepa *A. flavus* L. 25 (66%), la cual fue estadísticamente igual a la registrada por la cepa *A. flavus* 35, quién tuvo 71% y en la 37 (86%). A los 16 días de almacenamiento, el porcentaje de la germinación tuvo una tendencia a disminuir con el incremento del tiempo almacenamiento.

Sin embargo a los 16 días, los granos de maíz del testigo se mantuvieron en niveles altos en su germinación al presentar 94%, seguidos por los granos de maíz inoculados por la cepa 24 con 91%, mientras que las germinaciones más bajas correspondieron a los granos de maíz inoculados por las cepas *A. flavus* L. 25 los cuales presentaron el 60% y en las cepas con *A. parasiticus* S. 26 y *A. flavus* L. 35 el valor fue de 61 % (Cuadro 5.27). Para las germinaciones presentadas en los granos de maíz a los 24 días, el testigo junto con los granos de maíz inoculados por las cepas *A. flavus* L. 37 y *A. parasiticus* S. 24, resultaron ser estadísticamente iguales entre sí, sin embargo, numéricamente el testigo superó por completo a todas las germinaciones de los granos de maíz inoculados con las diferentes cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. Por su parte, los granos de maíz inoculados con la cepa 35 presentaron la menor germinación con 50%.

En la Figura 5.8 se presentan las medias de germinación de los granos de maíz almacenados durante 8 días a 20°C., donde se observó que los granos de maíz del testigo y el maíz inoculado con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. no presentaron diferencias estadísticas, ya que las germinaciones oscilaron entre 97 al 100%.

**Cuadro 5.27. Comparación de medias del porcentaje de germinación de los granos de maíz inoculados con cepas de *A.flavus* L. y *A.parasiticus* S., almacenados durante 8, 16 y 24 días, en tres contenidos de humedad.**

CEPAS	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
	8	16	24
TESTIGO	99 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	84 <sup>a</sup>
<i>A. flavus</i> L. 25 ◊	66 <sup>b</sup>	60 <sup>d</sup>	54 <sup>b</sup>
<i>A. flavus</i> L. 35 ☼	71 <sup>b</sup>	61 <sup>d</sup>	50 <sup>b</sup>
<i>A. flavus</i> L. 37 □	86 <sup>ab</sup>	85 <sup>b</sup>	75 <sup>a</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 36 ◊	92 <sup>a</sup>	69 <sup>c</sup>	56 <sup>b</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 24☼	93 <sup>a</sup>	9 <sup>ab</sup>	74 <sup>a</sup>
<i>A. parasiticus</i> S. 26 □	93 <sup>a</sup>	61 <sup>d</sup>	53 <sup>b</sup>

\*En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe p = 0.05).

◊ Altamente productora de aflatoxinas

☼ Medianamente productora de aflatoxinas

□ No productora de aflatoxinas

En la temperatura de 27°C, las germinaciones se comportaron de forma similar que en la temperatura de 20°C, donde los resultados no difirieron entre sí, pero, numéricamente los granos de maíz del testigo resultaron ser los que presentaron la máxima germinación con 98%. En cambio, la germinación más baja fue para los granos de maíz inoculados con la cepa *A. flavus* L. 37, los cuales registraron un 89%. En la temperatura de 34°C, la germinación de los granos de maíz del testigo fue la más alta con un 100%, y los granos de maíz que fueron más afectados por el hongo fueron aquellos que se inocularon con las cepas *A. flavus* L. 25 y 35 con una media de 1.3 y 17.3% respectivamente (Figura 5.8).

Las medias de germinación de los granos de maíz almacenados a los 16 días, muestran que en la temperatura de 20°C, las germinaciones se mantuvieron altas (99 a 98%), tanto en los granos de maíz del testigo, como en los inoculados con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., no existiendo diferencias estadísticas entre sí (Figura 5.9). En la temperatura de 27°C, la germinación mas alta fue para los granos de maíz del testigo con una media de 98%, mientras que los granos de maíz inoculados con las cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. resultaron ser menores al testigo, la germinación mas baja fue para los granos de maíz inoculados con la cepa *A. flavus* L. 25 y *A. parasiticus* S. 24 con un promedio de 83%. Para la temperatura de 34°C, los granos de maíz

inoculados con la cepa *A. parasiticus* S. 24, tuvo una germinación de 91%, indicando que fue la cepa que menos afectó la germinación de los granos de maíz en esta temperatura, mientras que los granos de maíz del testigo tuvieron una germinación de 88%. Los granos de maíz inoculados con las cepas *A. flavus* L. 25, 35 y *A. parasiticus* S. 26 afectaron en forma considerable la germinación del maíz, a tal grado que esta fue de 0%; mientras que la cepa *A. parasiticus* S. 36 también afectó la germinación hasta disminuirla a un 25%.

En la Figura 5.10 se muestran las medias de germinación de los granos de maíz inoculados con cepas de *Aspergillus* y almacenados en tres temperaturas durante 24 días, mostrándose que en la temperatura de 20°C, tanto los granos de maíz del testigo como en los inoculados por las cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. mantuvieron germinaciones por arriba del 93%, mientras que el testigo tuvo un porcentaje de germinación arriba del 99%. Todas las germinaciones registradas en esta temperatura resultaron ser estadísticamente iguales entre sí.

Para la germinación de los granos de maíz almacenados a 27°C, el testigo registró la germinación más alta con 97% y fue estadísticamente diferente a las germinaciones de los granos de maíz inoculados con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., en donde la germinación más baja fue la de los granos de maíz inoculados con la cepa 24 con un 47%. Mientras que en la temperatura de 34°C, la mayor germinación fue para los granos de maíz inoculados con la cepa *A. parasiticus* S. 24, quién tuvo un 75%, seguida por la cepa *A. flavus* L. 37 y el testigo, con 69 y 57% respectivamente. A esta temperatura las cepas de los hongos evaluados afectaron considerablemente la germinación de los granos de maíz, donde las cepas que más afectaron fueron la cepas *A. flavus* L. 25, 35 y *A. parasiticus* S. 26, las cuales promediaron 0%. Otra que también afectó la germinación fue la cepa *A. parasiticus* S. 36 con un 5% (Figura 5.10). Cabe hacer mención que los porcentajes de germinación a 20°C de almacenamiento, se mantuvieron por arriba de aquellos granos de maíz que fueron almacenadas a 27 y 34°C.

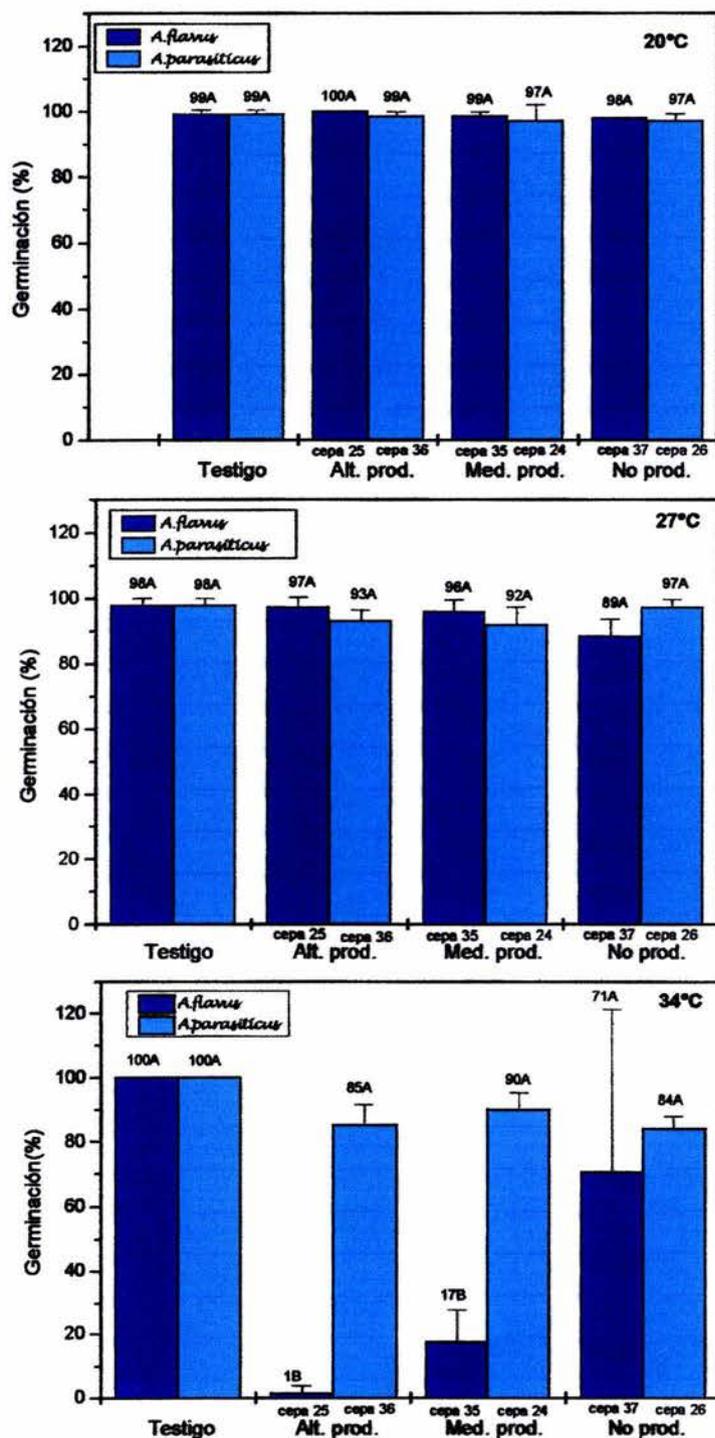
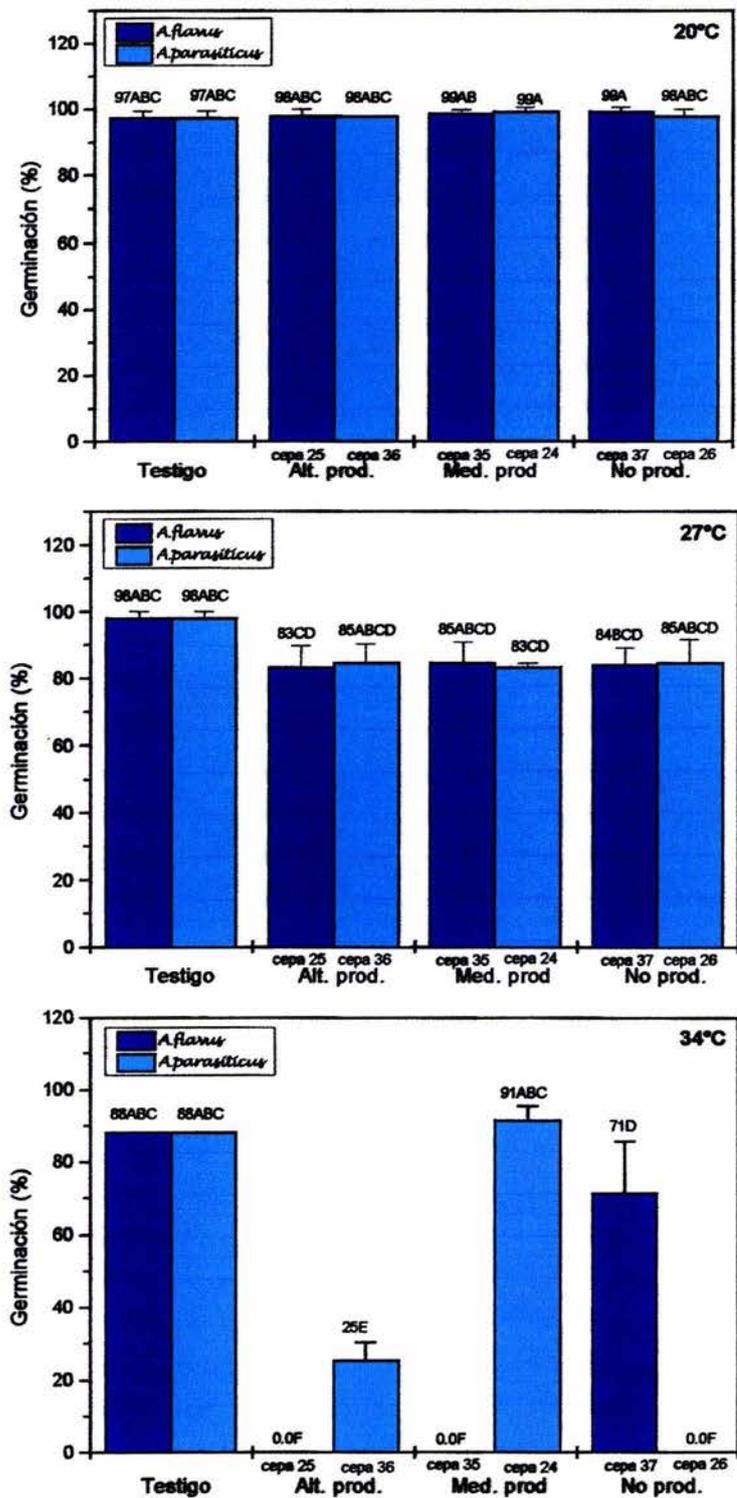


Figura 5.8. Comparación de medias del porcentaje de germinación de los granos de maíz inoculados con cepas de *A. flavus* L. (25, 35, 37) y *A. parasiticus* S. (36, 24, 26), almacenados en tres temperaturas durante 8 días.



**Figura 5.9. Comparación de medias del porcentaje de germinación de los granos de maíz inoculados con cepas de *A. flavus* L. (25, 35, 37) y *A. parasiticus* S. (36, 24, 26) almacenados en tres temperaturas durante 16 días.**

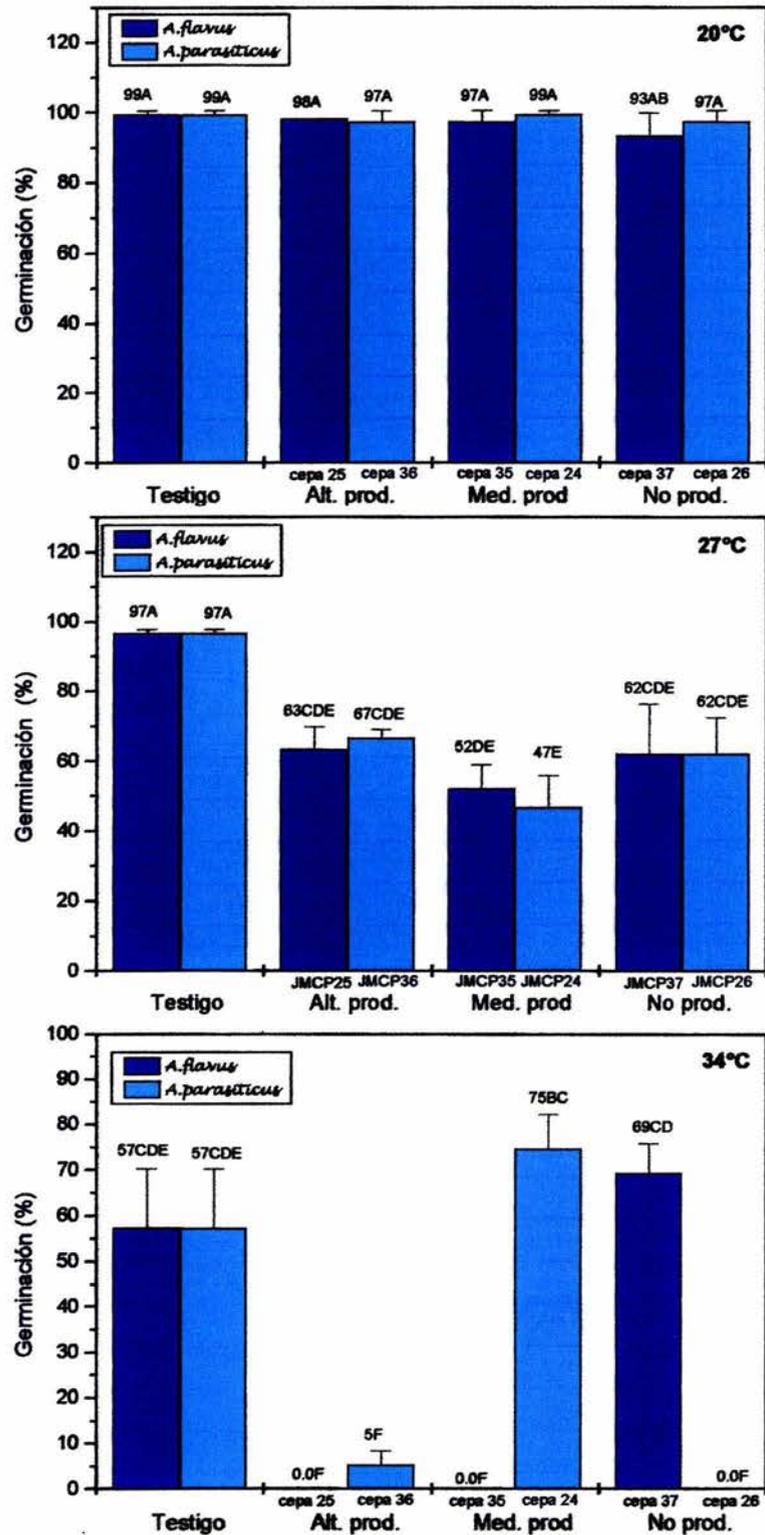


Figura 5.10. Comparación de medias del porcentaje de germinación de los granos de maíz inoculados con cepas de *A. flavus* L. (25, 35, 37) y *A. parasiticus* S. (36, 24, 26), almacenados en tres temperaturas durante 24 días.

#### 6.4. Contenido de humedad

Los cuadrados medios del análisis de varianza para el contenido de humedad de los granos maíz inoculados con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., mostraron que la fuente de variación de temperatura resultó ser altamente significativa para los tiempos de almacenamiento de 8, 16 y 24 días (Cuadro A-10), mientras que en la fuente de variación de las cepas y la interacción de cepas x temperatura resultaron ser altamente significativas solamente para el tiempo de almacenamiento de 16 días. Los coeficientes de variación fueron muy bajos con un valor de 2.94, 1.51 y 1.59 para los 8, 16 y 24 días de almacenamiento respectivamente.

#### 6.5. Comparación de Medias

En el Cuadro 5.28 se presentan las medias del contenido de humedad de los granos de maíz almacenados a los 8, 16 y 24 días, observándose que en la temperatura de 34°C, se presentaron valores de 15.93, 15.84 y 16.36% de humedad para los tres tiempos de almacenamiento, siendo los valores más bajos y diferentes estadísticamente a los comparados con las temperaturas de 20 y 27°C, ya que estos no difirieron entre sí al oscilar los rangos de humedad entre 17.05 y 17.38%. La alta temperatura de 34°C, ocasionó que disminuyera la humedad de los granos de maíz, debido a que se presentó una rápida evaporación del agua de los granos de maíz, lo cual varió la humedad original del maíz que era de aproximadamente de 17%.

**Cuadro 5. 28. Comparación de medias de la humedad (%) de los granos de maíz inoculados con cepas de *A.flavus* L. y *A.parasíticus* S., almacenados durante 8, 16 y 24 días, en un contenidos de humedad de 17% aproximadamente.**

TEMPERATURA (°C)	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
	8	16	24
20	17.38 <sup>a</sup>	17.10 <sup>a</sup>	17.37 <sup>a</sup>
27	17.13 <sup>a</sup>	17.05 <sup>a</sup>	17.37 <sup>a</sup>
34	15.93 <sup>b</sup>	15.84 <sup>b</sup>	16.36 <sup>b</sup>

\*En cada columna, las medias seguidas por la misma letra no son significativamente diferentes (Scheffe, p = 0.05).

## VI. DISCUSIÓN

Las cepas de *Aspergillus flavus* L. se identificaron siguiendo las claves de Raper y Fenell (1965) que clasifican a las especies de *Aspergillus* en 18 grupos, las cepas de las especies de *A. flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare que fueron aisladas en este trabajo corresponden al grupo de *Aspergillus flavus* o sección *flavi* (Gams *et al.*, 1985).

En los diferentes sustratos de los que se aislaron los hongos, se obtuvieron 38 cepas en total de las especies *Aspergillus flavus* L. y *Aspergillus parasiticus* S. De las cepas de *Aspergillus flavus* L. se aislaron 30 cepas, representando el 78.94% de las cepas encontradas y de *Aspergillus parasiticus* S. se encontraron 7 cepas que corresponden al 18%. *Aspergillus flavus* L. fue mas frecuentemente encontrado en los diferentes sustratos en comparación con *A. parasiticus* S. (Cuadro 5.2 y 5.3). Vaamonde *et al.* (2003) aislaron cepas de *Aspergillus* de la sección *flavi* en cacahuate, trigo y soya provenientes de Argentina, y también encontraron que *A. flavus* L. fue la especie predominante en todos los sustratos y después fue *A. parasiticus* S.

El 80% de las cepas de *A. flavus* L. presentaron un crecimiento radial y flocoso y el 20% un crecimiento radial y zonado (Cuadro 5.2) En el caso de *A. parasiticus* S., el 100% de las cepas presentan un crecimiento radial y flocoso, no presentándose el crecimiento zonado (Cuadro 5.3).

En *A. flavus* L., el 63% de las cepas presentaron micelio aéreo y escaso en el centro de la colonia; y el resto presentó micelio profundo y escaso. En *A. parasiticus* S., el 43 % de las cepas presentaron micelio aéreo y escaso en el centro de la colonia y el 57 % presentaron micelio profundo y escaso (Cuadro 5.2 y 5.3).

El diámetro de las colonias de las cepas de *A. flavus* L., varió de 6.08 cm a 7.53 cm; en el caso de *A. parasiticus* S. el diámetro de la colonia varió de 5.64 cm a 7.4 cm.

La cepa 31 (*Aspergillus flavus* L.) fue la que presentó una colonia de mayor tamaño en medio de Czapek a los 10 días de incubación a 27°C con diámetro de 7.53 cm y la cepa 26 (*A. parasiticus* S.), fue la que presentó el menor diámetro de la colonia (5.64cm). El sistema de identificación de Klich y Pitt (1988) utiliza tres medios de cultivo para observar las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los *Aspergillus* (agar extracto de malta, agar Czapek con 20% de sacarosa y medio agar Czapek extracto de levadura) la incubación se mantiene 7 días a una temperatura de 25°C, al medir el diámetro de la colonia de *Aspergillus flavus* L. por este sistema es de 6 a 7 mm, sus resultados son similares a los que se obtuvieron para *A. flavus* L. en medio de agar Czapek (Cuadro 5.2).

El color de las cepas de *Aspergillus flavus* L. es verde amarillo, las cepas de *Aspergillus parasiticus* S. son de color verde oscuro o verde seco. El color de los conidios es una característica importante en la identificación de *Aspergillus flavus* L., sección *flavi* y se ha caracterizado tradicionalmente la comparación del color ( Klich y Pitt, 1988; Raper y Fennell, 1965). Horn *et al.* (1996) analizaron la intensidad del color de los conidios de cada cepa de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. por medio de un equipo de color RGB, el cual utiliza un monitor de color y está basado sobre una combinación de color rojo, verde y azul. Se encontró que el color de los conidios entre estas dos especies es muy diferente y entre las cepas de la misma especie hay pocas diferencias en el color de los conidios. Sin embargo al visualizar directamente en las cajas de petri, sí se ven las diferencias de una especie a otra. Pero al tratar de diferenciar el color de los conidios de una cepa a otra de la misma especie es muy difícil a simple vista.

Ninguna cepa de *Aspergillus parasiticus* S. presentó formación de esclerocios a los 10 días en el medio de Czapek ; a diferencia de las cepas de *Aspergillus flavus* L., en donde el 77% de las cepas formaron esclerocios y el 23% no los presentaron (Cuadro 5.2 y 5.3). La cepa *Aspergillus flavus* L. 14 fue la que formó los esclerocios más pequeños con un diámetro de 313  $\mu\text{m}$ . Horn *et al.* (1996) reportaron que de 79 cepas de *Aspergillus flavus* L., todas formaron esclerocios en medio de agar Czapek y

de las 76 cepas de *Aspergillus parasiticus* S. que aislaron solo 11 cepas no formaron esclerocios. La producción de esclerocios de las especies de *Aspergillus* es una función de las condiciones del cultivo, las cepas identificadas que son no esclerotiales pueden producir esclerocios sobre otro medio de cultivo diferente (Cotty, 1988).

Las cepas de *Aspergillus flavus* L. pueden ser divididas dentro de 2 grupos. Las cepas "L" producen pocos esclerocios y grandes (>400µm de diámetro) y las que producen esclerocios pequeños son cepas "S" (< 400µm de diámetro) y producen muchos esclerocios (Hesseltine *et al.*, 1970, Saito *et al.*, 1986, Egel *et al.*, 1994, Cotty y Cardwell, 1999, Geiser *et al.*, 2000). A las cepas "S" se les ha clasificado como *Aspergillus flavus var. parvisclerotigenus* por que forma micro esclerocios (Saito y Tsurata, 1993). En esta investigación todas las cepas de *A. flavus* L. aisladas que presentaron esclerocios entran dentro de las cepas "L", ya que sus esclerocios midieron más de 400 µm, pero se observó que el número de esclerocios varió entre las cepas, hay cepas que producen muchos esclerocios y otras pocos, con excepción de la cepa 14 que fue la única que formó esclerocios pequeños y está dentro de las cepas "S", pero está no produjo más aflatoxinas que las de esclerocios grandes (Cuadro 5.2 y 5.4). Vaamonde *et al.* (2003) aislaron diferentes cepas de *A. flavus* L. en Argentina y todas sus cepas formaron esclerocios pequeños, pero no encontraron cepas de *A. flavus* L. con esclerocios grandes.

*A. flavus* L. presentó conidios con un diámetro que varió de 3.96 µm a 4.92 µm (Cuadro 5.2). En *A. parasiticus* S., el diámetro varió de 4.44 µm a 5.4 µm (Cuadro 5.3). En cuanto al tamaño de los conidios, la cepa 29 (*A. parasiticus* S.) fue la que tuvo el mayor tamaño de los conidios, midiendo 5.4 µm y las cepas con los conidios más pequeños fueron las de *Aspergillus flavus* L. 8, 18 y 25 con un tamaño de 3.96 µm (Cuadro 5.2 y 5.3). Los conidios de algunas cepas de *A. parasiticus* S. son más grandes que los conidios de las cepas de *A. flavus* L. Klich y Pitt (1988) mencionan que la dimensión de los conidios de *A. flavus* L. son de 3 a 6 µm de diámetro y ésta es una de las características que se deben tomar en cuenta para su identificación. *A. flavus* L. se

distingue por presentar cabezuelas radiadas, biseriadas y monoseriadas y *A. parasiticus* S. presenta cabezuelas radiadas y monoseriadas (Cuadro 5.2 y 5.3).

Horn *et al.* (1996) aislaron diferentes cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. y observaron que las cepas de *A. parasiticus* S. producían mas aflatoxinas que *A. flavus* L. y el 90% de las cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. eran productoras de aflatoxinas, pero en esta investigación encontramos que no hay diferencias significativas en la producción de aflatoxinas entre *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. como especie. La variabilidad está dada por las cepas en cada especie. La variabilidad aportada por las diferencias entre cepas fue de 98% en medio líquido de arroz (Cuadro A-3) y la variabilidad de las cepas en maíz inoculado con ambas especies fue de 94% (Cuadro A-4).

En el análisis de varianza y en la comparación de medias en medio líquido de arroz y en maíz, se encontraron diferencias significativas en la producción de aflatoxinas entre las cepas de *A. flavus* L. (Cuadros 5.4 y 5.6). La cepa de *A. flavus* L. 28 sintetizó los niveles más altos de aflatoxinas en granos de maíz, mientras que la cepa 27 registró niveles menores (Cuadro 5.6). En cambio, en medio de cultivo líquido con arroz, fue diferente la producción de aflatoxinas de cada una de las cepas, en este medio la cepa 25 de *A. flavus* L. fue la más productora y la menos productora de aflatoxinas fue la cepa 35 (Cuadro 5.4). Es importante mencionar que en medio sólido (granos de maíz) hubo mayor producción de aflatoxinas que en medio líquido, esto se debió a que los tiempos de almacenamiento fueron diferentes para ambos medios y cada sustrato es diferente en su composición química.

Los trabajos realizados han demostrado que el arroz es un excelente sustrato para la producción de aflatoxinas (Hesseltine *et al.*, 1966; Shotwell *et al.*, 1966). En este trabajo se encontraron cepas que no producen aflatoxinas tanto en medio líquido con arroz como en grano de maíz y fueron las cepas de *A. flavus* L. 3, 10, 12, 17, 20, 30, 33, 37 (Cuadro 5.4 y 5.6) y las cepas de *A. parasiticus* S. 22, 26, 29 (Cuadro 5.5 y 5.7).

La cepa de *A. flavus* L. 23 (Cuadro 5.4) y la cepa de *A. parasiticus* S. 27 (Cuadro 5.5) no sintetizaron aflatoxinas en medio líquido con arroz, sin embargo en maíz si produjeron aflatoxinas, aunque en poca cantidad (Cuadro 5.6 y 5.7), tal vez necesitaban más tiempo para que formaran aflatoxinas o el maíz tiene algún nutriente indispensable para que puedan producir la toxina. Las cepas de *A. parasiticus* S. son típicamente aflatoxigénicas, producen AFB y AFG. Las cepas de *A. parasiticus* S. no toxigénicas son extremadamente raras (Vaamonde *et al.*, 2003). Las cepas nativas no aflatoxigénicas pueden ser organismos de interés para el desarrollo de estrategias de biocontrol para reducir la contaminación de aflatoxinas como se mencionó anteriormente en la revisión de literatura. Igualmente pueden ser útiles para estudios de biología celular comparativos entre cepas productoras y no productoras de aflatoxinas.

El porcentaje de las cepas productoras de aflatoxinas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. es de 63% y el 37% son cepas no productoras de aflatoxinas (Cuadro 5.4, 5.5, 5.6 y 5.7). En las cepas de la especie *A. flavus* se encontró que el porcentaje de cepas productoras de aflatoxinas es de 70% y el 30% corresponde a las no productoras de aflatoxinas (Cuadro 5.4 y 5.6). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Zenteno (1971). En las cepas de la especie *A. parasiticus* S. se tuvo un 57% de cepas productoras y 43 % de cepas no productoras de aflatoxinas (Cuadro 5.5 y 5.7). El 45% de las cepas de *A. flavus* L. aisladas en el campo son no productoras de aflatoxinas, mientras que pocas cepas de *A. parasiticus* S. aisladas en el campo son poco productoras, esto fue observado por Harrison *et al.* (1987).

El porcentaje de cepas aflatoxigénicas puede reflejar diferencias en las técnicas de cultivo, procedimientos de extracción, la sensibilidad del análisis de aflatoxinas, etc. Sin embargo este porcentaje puede ser debido en una mínima parte a las diferencias geográficas y climáticas (Okasaki *et al.*, 1992).

En el Cuadro 5.6 y 5.7 se observa que el porcentaje de germinación de los granos de maíz AS-910, disminuyó más en donde se inocularon las cepas de *A. flavus*

L. y *A. parasiticus* S. en comparación con el testigo, este tuvo una germinación de 61.33 % y la germinación más alta en maíz inoculado fue con la cepa 24 (*A. parasiticus* S.) con un porcentaje de germinación de 31.7% (Cuadro 5.7) y el valor menor fue de 5.6 % para el maíz inoculado con la cepa 35 *A. flavus* L. (Cuadro 5.6). En estos resultados observamos que el desarrollo del hongo en el maíz afecta su germinación a los 30 días de almacenamiento.

En cuanto a la humedad del maíz inicialmente era de 18% aproximadamente y a los 30 días de almacenamiento se mantuvo muy similar a la humedad inicial, se observó que no hay diferencia estadística entre las humedades del maíz inoculado con las cepas de *A. flavus* L., *A. parasiticus* S. y el testigo, por lo que las cepas inoculadas en maíz mantuvieron las mismas condiciones de humedad y temperatura para la producción de aflatoxinas (Cuadro 5.6 y 5.7).

Al realizar el análisis por cromatografía de capa fina (Cuadro 5.8) para determinar el tipo de aflatoxina que forma cada cepa de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., encontramos que todas las cepas producen mayor cantidad AFB1 en comparación con AFB2. Algunas cepas de *A. flavus* L. solo formaron AFB1 en maíz. Hay cepas de *A. flavus* L. que producen AFB1 y solo trazas de AFB2. Zenteno (1971) aisló 9 cepas de 2 regiones de México y encontró que las cepas de *A. flavus* L. producían solo AFB1 en maíz amarillo y blanco. Egel *et al.* (1994) mencionaron que los aislamientos típicos de las cepas "L" (esclerocios grandes) pueden producir solamente aflatoxinas B o no producir ninguna aflatoxina, mientras que todas las cepas de *A. flavus* L. "S" (esclerocios pequeños) producen relativamente grandes cantidades de aflatoxinas.

En este trabajo las cepas de *A. flavus* L. formaron AFB1 y AFB2 en el maíz. Las cepas de *A. parasiticus* S. que son productoras formaron AFB1 y AFB2, pero no se detectó producción de AFG1 y AFG2. Geiser *et al.* (2000) dividieron a las cepas de *A. flavus* L. que producían AFB1 y AFB2, pero que no producen AFG1 y AFG2 en el grupo I y las cepas que produjeron AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2 pertenecen al grupo II. Las cepas de

*A. flavus* L. aisladas en una amplia área geográfica de Estados Unidos, presentaron las siguientes características: las cepas "S" produjeron altos niveles de aflatoxinas y presentaron menos variación en la producción de AFB1, mientras que las cepas "L" fueron más variables en su producción de aflatoxinas; hubo mayor variación en la producción de ácido ciclopiazónico en las cepas "L" que en las cepas "S" (Horn y Dorner, 1999).

La producción de aflatoxinas en los tres contenidos de humedad del maíz fue diferente (Cuadro 5.9), observándose que en la humedad de 17% (inicial) hubo mayor producción de aflatoxinas, ya que es una de las humedades óptimas para la producción de aflatoxinas en maíz, a diferencia de la humedad de 15.5 y 16% (iniciales) (Cuadro 5.11, 5.12 y 5.13). Se observó que las humedades deseadas a 15.5, 16.0 y la de 17% no se pueden mantener por largos periodos de almacenamiento, ya que al desarrollarse los hongos aumentó el contenido de humedad del maíz en un 1% aproximadamente más que el que se tenía inicialmente (Cuadro 5.16, 5.18, 5.19 y 5.20).

En el Cuadro 5.16 se observó que el contenido de la humedad inicial aumentó un 1% a los 30 días de almacenamiento en 15.5, 16 y 17%. El contenido de humedad se mantuvo muy parecido a los 60 y 90 días de almacenamiento, por lo que no hubo diferencias estadísticas en cada contenido de humedad de la semilla de maíz.

La mayor producción de aflatoxinas fue a los 60 días de almacenamiento (Cuadro 5.9 y 5.10), tanto en las cepas de *A. flavus* L. como en las cepas *A. parasiticus* S. y a los 90 días disminuyó la cantidad de aflatoxinas. Esto tal vez se debe a que estas son metabolizadas por el hongo productor, probablemente como un mecanismo para regular los niveles de aflatoxinas. A los 30 días de almacenamiento hay poca producción de aflatoxinas, la cepa de *A. flavus* L. 35 y la cepa de *A. parasiticus* S. 36 fueron las que produjeron mayor cantidad de aflatoxina (Cuadro 5.10).

A los 30 días de almacenamiento la cepa de *A. flavus* L. 25 (Cuadro 5.11 y Figura 5.3) considerada como altamente productora, no tuvo producción de aflatoxinas en las humedades de 15.5 (0.80 aw), 16 % (0.85 aw), pero en 17% (0.90 aw) tuvo una mínima producción de aflatoxinas en maíz y esto mismo ocurrió con la cepa de *A. parasiticus* S. 24 medianamente productora de aflatoxinas, esto tal vez se debe a que estas dos cepas requieren mayor contenido de humedad para la producción de aflatoxinas, ya que en medio líquido hubo mayor producción de aflatoxinas.

En maíz se ha encontrado que la mínima actividad de agua para producir aflatoxinas por *A. flavus* L. son 0.86 y 0.87aw en una temperatura de 25 y 30°C respectivamente (Hunter, 1969, Montani *et al.*, 1998). En trigo fue de 0.82 aw en una temperatura de 30 a 40°C y a la actividad de agua de 0.88 en una temperatura de 25°C (Niles *et al.*, 1985). En cacahuate, *A. flavus* L. requiere una actividad de agua mínima de 0.86 para producir aflatoxinas, en una temperatura de 30°C; en pistache requiere 0.88 aw y una temperatura de 29°C; en coco la actividad de agua mínima para la producción de aflatoxinas es de 0.89 en una temperatura de 30°C (Denizel *et al.*, 1976; Diener y Davies, 1977; Koehler *et al.*, 1985). Actualmente se sabe que la mínima actividad de agua que requiere *A. flavus* L. para crecer es 0.78 y para producir las aflatoxinas es de 0.83 aw. Pero para *A. parasiticus* S. la mínima aw para crecer es de 0.70 y para producir aflatoxinas es de 0.80 aw (Gimeno, 2003).

En el Cuadro 5.12 y en la Figura 5.3 podemos observar que la cepa *A. flavus* L. 25 a los 60 días de almacenamiento sí produjo aflatoxinas en el contenido de humedad de 15.5 (0.80 aw), 16 (0.85 aw) y 17% (0.90 aw), en este último tuvo una alta producción de aflatoxinas (14,133 ppb), siendo el valor más grande en los tres tiempos de almacenamiento, esto sugiere que requería más tiempo para producir la toxina y una humedad mayor de 17% (90 aw), la cepa *A. parasiticus* S. 24 también produjo aflatoxinas en el contenido de humedad de 15.5 y 17%, pero la mayor producción de aflatoxinas fue en la humedad de 16%. La cepa *A. flavus* L. 36 en la humedad de 15.5 (0.80 aw) y 16 (0.85 aw) fue la más productora de aflatoxinas.

La cepa de *A. flavus* L. 35 en el contenido de humedad de 15.5 (0.80 aw) fue la de mayor producción de aflatoxinas a los 90 días de almacenamiento ( Cuadro 5.13 y Figura 5.3). La cepa de *A. parasiticus* S. 36 en el contenido de humedad de 16% (0.85aw) fue la que presentó mayor producción de aflatoxinas. La cepa de *A. flavus* L. tiene una producción más alta de aflatoxinas que las cepas de *A. parasiticus* S. en el contenido de humedad de 17% (0.90aw). Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Pitt y Miscamble (1995) quienes estudiaron el crecimiento de las colonias de *A. flavus* L. sobre un medio de extracto de malta regulando la actividad de agua con glucosa y fructosa. Ellos encontraron que la mínima actividad de agua para el crecimiento de *A. flavus* L. fue de 0.82, 0.81 y 0.80, en temperaturas de 25, 30 y 37°C respectivamente.

Abellana *et al.* (2001) reportaron que dos cepas de *A. flavus* L. no se desarrollaron en una actividad de agua de 0.75, 0.80 y 0.85, en temperaturas de 15, 20 y 30°C. En la actividad de agua de 0.90 se desarrollaron muy rápido en las temperaturas mencionadas anteriormente, mencionan que el sustrato es también importante para el desarrollo de este hongo (El Gendy, 1980; Sharma *et al.*, 1994)). En nuestros resultados podemos observar que *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. pueden crecer en una actividad de agua de 0.80 (contenido de humedad de 15.5%) en una temperatura de 27°C y puede producir aflatoxinas.

Las cepas de *A. flavus* L. 35 (medianamente productora) y la cepa de *A. parasiticus* S. 36 (altamente productora) tienen producción de aflatoxinas a los 30, 60 y 90 días de almacenamiento en las humedades de 15.5 (0.80 aw), 16 (0.85 aw) y 17 (0.90 aw) (Cuadro 5.11 y Figura 5.3), por lo que estas cepas requieren menor contenido de humedad para producir aflatoxinas, pero producen mayor cantidad de esta en 17%. La cepa 36 requiere menor contenido de humedad para producir mayor concentración de aflatoxinas (Cuadro 5.12). Bresler *et al.* (1998) mencionaron que *A. parasiticus* S. para producir aflatoxinas en amaranto, requiere la mínima actividad de agua era de 0.82, en soya este hongo requiere una actividad de agua mínima de 0.85

(Fernández *et al.*, 1991). En medio de cultivo de agar extracto de malta glicerol el hongo requiere una actividad mínima de 0.83 y en un medio de cultivo de agar extracto de malta sacarosa la mínima actividad de agua para la producción de aflatoxinas fue de 0.91. En frijol la actividad mínima de agua para producir aflatoxinas es de 0.85 en una temperatura de 26 °C (Trucksess *et al.*, 1988).

Las cepa de *A. flavus* L. 37 y la cepa de *A. parasiticus* S. 26 (Cuadro 5.11, 5.12, 5.13 y Figura 5.3) no sintetizaron aflatoxinas en maíz a ningún nivel, del contenido de humedad y en los tres tiempos de almacenamiento, Esto tal vez se debe a que estas cepas carecen de una o varias de las enzimas de la ruta biosintética de las aflatoxinas. Todas las cepas no aflatoxigénicas acumulan O-metil esterigmatocistina, un precursor de la aflatoxina B1 (Horn *et al.* 1996).

En el Cuadro 5.14 se observó que el porcentaje de germinación es menor en las semillas inoculadas con *A. flavus* L. y *Aspergillus parasiticus* S. en comparación con el testigo. El porcentaje de germinación a los 30 días de almacenamiento fue mayor que el porcentaje de germinación a los 60 y 90 días en los contenidos de humedad de 15.5, 16 y 17%. El porcentaje de germinación fue de 0% en el contenido de humedad de 17% a los 90 días de almacenamiento en el maíz.

En el Cuadro 5.15 podemos observar que a los 30 días de almacenamiento la cepa que más afectó la germinación fue *A. flavus* L. 37 y la que menos afectó fue *A. flavus* L. 25. A los 60 días el porcentaje de germinación menor fue en el maíz que se inoculó con la cepa *A. flavus* L. 24 y a los 90 días la cepa que más afectó la germinación del maíz fue *A. parasiticus* L. 36. En el testigo a los 30 días de almacenamiento el porcentaje de germinación fue menor que en las cepas inoculadas en maíz con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., esto fue porque se contaminó con *Aspergillus glaucus* y éste afectó en mayor grado su germinación. A los 60 y 90 días hay mayores diferencias estadísticas en el porcentaje de germinación de la semilla de maíz que a los 30 días. La síntesis de nuevas proteínas por el embrión de la semilla de

maíz tiene un papel importante en la resistencia. En maíces resistentes hay baja producción de aflatoxinas en comparación con los maíces susceptibles, los altos niveles de las proteínas antifúngicas constitutivas de los granos de maíz son indispensables para la resistencia a *A. flavus* L. (Chen *et al.*, 2001)

En la Figura 5.4 el porcentaje de germinación es mayor en el contenido de humedad de 15.5% a los 30 días de almacenamiento, esto se debe a que esta humedad no afecta la viabilidad de la semilla y los hongos crecen más lentamente. En la Figura 5.5 y 5.6 podemos observar que en la humedad de 17% a los 60 y 90 días el porcentaje de germinación es cero, esta humedad afecta mucho la germinación de los granos de maíz y hay mayor desarrollo de los hongos causando calentamiento, estos generalmente atacan al embrión y el grano o semilla muere. El porcentaje de germinación en el testigo siempre fue mayor en los tres contenidos de humedad y en los tres tiempos de almacenamiento, ya que el desarrollo de *Aspergillus flavus* L. y *Aspergillus parasiticus* S., así como la producción de aflatoxinas afectan la germinación de los granos de maíz, estos resultados concuerdan con lo reportado por López (1966). Arachchi *et al.*, (1999) reportaron que una temperatura de más 28°C reduce la germinación de los granos de maíz de 100% hasta 0%. En el campo se reduce la emergencia de las semillas a temperaturas de alrededor de 24°C. Las altas temperaturas y humedades causan un envejecimiento en las semillas o granos.

En el Cuadro 5.21 se observa que a temperatura de 34°C hubo mayor producción de aflatoxinas a los 8, 16, y 24 días de almacenamiento en comparación con las temperaturas de 20 y 27°C. En la temperatura de 20°C hubo poca producción de aflatoxinas. Schindler *et al.* (1967) reportaron que *A. flavus* L. no produce aflatoxinas en las temperaturas de 2, 7, 41, 46 y 52°C. *A. flavus* L. crece mucho a 41°C, pero sin producción de aflatoxinas. Esta ausencia de la producción de aflatoxinas a 41°C a diferencia de las temperaturas óptimas de crecimiento comparadas con esa producción de las dos cepas puede indicar una diferencia en la inactivación de la enzima de crecimiento y producción de aflatoxinas debido a la temperatura (Sorenson *et al.*, 1966).

Los cambios en la proporción de la producción de AFB1 y AFG1 en ciertas temperaturas, han indicado la influencia de la temperatura sobre la biosíntesis de las dos aflatoxinas.

*Aspergillus flavus* L. crece a la temperatura mínima de 10°C, su temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 35°C y a la máxima temperatura que puede crecer es a 48°C, por lo que se considera que es termo tolerante (Wareing, 1997).

Sorenson *et al.* (1966) reportaron que las temperaturas óptimas para la producción de ambas AFB1 y AFG1 es en una temperatura de 28°C. La producción de AFB1 fue comparable a los 32°C, pero fue menos considerable para AFG1, ya que fue baja la producción en esta temperatura. Ambas AFB1 y AFG1 fueron encontradas en menores cantidades a temperaturas por arriba de los 32°C, en las temperaturas de 28°C a 15°C el resultado de la producción de aflatoxinas fue menor, pero detectaron 100 ppb de B1 en cultivos incubados por 3 semanas a 11°C. No hubo producción de aflatoxinas a 8°C. La proporción de las cuatro aflatoxinas es afectada por la temperatura. En las bajas temperaturas, igual cantidad de aflatoxinas AFB1 y AFG1 fueron detectadas, a los 28°C aproximadamente en cuatro tiempos hubo mucha producción de AFB1 y AFG1. A altas temperaturas las cantidades menores de AFG1 fueron producidas a 37°C.

Se realizó la identificación por cromatografía de capa fina de las aflatoxinas (Cuadro 5.8) que producen las cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. En el experimento con humedades en las cepas de *A. flavus* L. 25 y 35, así como las que producen las cepas de *A. parasiticus* S. 36 y 24 en las diferentes humedades 15.5, 16 y 17%, se observó que hay producción de AFB1 y AFB2. También se identificó el tipo de aflatoxina que formaron las cepas en las diferentes temperaturas de 20, 27 y 34°C, las cepas formaron B1 y B2 (datos no mostrados), lo cual nos dice que estas temperaturas no afectan para que se produzca B1 y B2, en este trabajo no se detectó AFG1 y AFG2, esto se debe tal vez a que la cepa no las produce, o en maíz generalmente no se

producen estas dos toxinas o si hay producción son en cantidades mínimas y por este método no las podemos detectar.

La cepa de *A. parasiticus* S. 24 fue la que produjo mayor cantidad de aflatoxinas en la temperatura de 20, 27 y 34 °C a los 8 días de almacenamiento, las cepas de *A. flavus* L. 25 , 35 y la cepa de *A. parasiticus* S. 36 no produjeron aflatoxinas en la temperatura de 34 °C. Las cepas 25, 36 y 35 producen muy poca aflatoxina en la temperatura de 20 y 27°C ( Cuadro 5.23 y Figura 5.7).

En el Cuadro 5.24 y en la Figura 5.7 la cepa *A. parasiticus* S. tiene una producción mayor de aflatoxinas en la temperatura de 20 y 34 °C, pero en la temperatura de 27°C es casi cero la producción de aflatoxinas, parece que ocurrió biotransformación de la aflatoxinas, ya que disminuyó mucho a los 16 días de almacenamiento en comparación con la producción de aflatoxinas a los 8 días de almacenamiento. En la temperatura de 20 °C no hubo producción de aflatoxinas, excepto en la cepa 24. En la temperatura de 27°C la cepa de *A. parasiticus* S. 36 fue la de mayor producción de aflatoxinas, le siguen las cepas de *A. flavus* L. 25 y 35. La cepa de *A. parasiticus* S. 36 sí produce aflatoxinas a los 34°C y en muy poca cantidad la cepa de *A. flavus* L. 25.

A los 24 días de almacenamiento la cepa con mayor producción de aflatoxinas en maíz fue la cepa 24, las cepas de *A. flavus* L. produjeron aflatoxinas en las temperaturas de 20 y 27, pero en 34 °C no se detectaron aflatoxinas. Las cepas de *A. parasiticus* S. produjeron aflatoxinas en las temperaturas de 27 y 34°C. La cepa de *A. parasiticus* S. 24 tiene mejor producción de aflatoxinas en maíz a los 34°C (Cuadro 5.25 y Figura 5.7) .

Las cepas de *A. flavus* L. 37 y *A. parasiticus* S. 26 no producen aflatoxinas en las tres temperaturas y en los tres tiempos de almacenamiento (Cuadro 5.23, 5.24, 5.25 y Figura 5.7). En el testigo no hubo presencia de aflatoxinas.

El porcentaje de germinación de los granos de maíz no disminuyó en la temperatura de 20 °C a los 8, 16 y 24 días (Cuadro 5.26), esta temperatura favorece que los granos no pierdan su germinación y se conserven por más tiempo y el desarrollo de *Aspergillus flavus* L. y de *Aspergillus parasiticus* S. es más lento. Al aumentar la temperatura el porcentaje de germinación disminuyó, sobre todo en la temperatura de 34 °C.

En el Cuadro 5.26 se observó que el porcentaje de germinación fue menor a los 24 días de almacenamiento, la cepa que más afectó la germinación fue la cepa *A. parasiticus* S. 26. En el testigo se mantuvo un buen porcentaje de germinación a los 8, 16 y 24 días de almacenamiento (Cuadro 5.27). El porcentaje de germinación no disminuyó en las temperaturas de 20 y 27 °C a los 8 días de almacenamiento, pero en la temperatura de 34 °C decreció mucho el porcentaje de germinación en el maíz inoculado con las cepas de *A. flavus* L. 25 y 35 (Figura 5.8).

A los 16 días de almacenamiento el porcentaje de germinación del maíz se mantuvo alto en las temperaturas de 20 °C y 27°C (Figura 5.9). El porcentaje de germinación fue de cero en el maíz inoculado con las cepas *A. flavus* L. 25, 35 y *A. parasiticus* S. 26 en la temperatura de 34°C. Las cepas 24 y 37 no afectaron tanto la germinación del maíz. Duke y Douglas (1996) reportaron que el estrés por calor causa un decremento en el rendimiento del grano y se incrementa la susceptibilidad del maíz a *A. flavus* L. y hay producción de aflatoxinas. El estrés por calor puede afectar la expresión de los genes en el desarrollo de los granos, por lo tanto se afecta la actividad de las enzimas. Ellos sugirieron que el estrés por calor inhibe la actividad de las proteínas que se inducen en la patogenicidad en los granos, en la temperatura de 25°C, observaron que se producía la quitinasa, pero en temperaturas de 35°C es inhibida su actividad. El estrés por calor inhibe la inducción de las proteínas relacionadas en la patogénesis en los granos de maíz y por lo tanto son invadidos por el patógeno.

En la Figura 5.10 se vió que el porcentaje de germinación continuó siendo alto a 20°C, a los 24 días de almacenamiento. A los 27°C ya disminuyó el porcentaje de germinación y en la temperatura de 34°C el porcentaje de germinación disminuyó hasta cero en las que se inocularon las cepas 25, 35 y 26. La cepa 36 también afectó mucho el porcentaje de germinación.

En el Cuadro 5.28 se observó que el contenido de humedad del maíz se mantuvo más estable a la temperatura de 20° C y 27°C , que a la temperatura de 34°C, esto se debe a que al poner el maíz en una cámara húmeda con cloruro de potasio y agua a 34°C disminuye la humedad relativa y por lo tanto la humedad de los granos de maíz disminuyó de 17% (0.85 aw) hasta un 15% (0.75 aw) del contenido de humedad. Es importante señalar que en esta humedad de 15% que corresponde a una actividad de agua de 0.75, las cepas de *A. parasiticus* S. tuvieron una alta producción de aflatoxinas en la temperatura de 34°C, anteriormente se mencionó que para producir aflatoxinas la mínima que se conocía era de 0.80 aw. A los 8 y 24 días de almacenamiento la humedad se mantuvo muy similar y no hubo diferencias estadísticas entre ellas, pero a los 16 días de almacenamiento hubo diferencias estadísticas entre las cepas de *A. flavus* L. 25 y 37. En el Cuadro 6.1 observamos que en los trabajos realizados por otros autores reportaron diferente producción de aflatoxinas en *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. en diferentes sustratos, tiempos, temperaturas y cepas, al igual que en esta investigación la producción de aflatoxinas varía de una cepa a otra aún en el mismo sustrato.

Es muy importante la humedad y la temperatura para la producción de aflatoxinas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., por esto se deben tomar en cuenta estos dos factores ambientales en el almacenamiento de las semillas o granos para evitar la contaminación de aflatoxinas y pérdidas económicas, sobre todo si la semilla o grano se va almacenar por períodos largos, ya que muchos hongos pueden crecer en contenidos menores que los que requieren *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., por esto al pasar el tiempo se incrementa el contenido de humedad y esto ocasiona que se

empiecen a desarrollar *A. flavus* y *A. parasiticus*. No se puede establecer una temperatura o humedad igual para la producción de aflatoxinas, ya que cada cepa tiene un comportamiento diferente en la producción de aflatoxinas y sus requerimientos varían en cada una de ellas.

**Cuadro 6.1. Producción de aflatoxinas de *A. flavus* y *A. parasiticus* en diferentes temperaturas y sustratos en trabajos realizados por otros autores.**

Especie	Medio	Días	Temperatura	Producción de aflatoxinas	Autores
<i>A. flavus</i> L.	Harina de arroz	7	28°C	314.8ppb	Misra y Sinha (1979)
	Czapek	7	28°C	57.2ppb	
<i>A. parasiticus</i> S.	Arroz fermentado		28°C	67ppb	Izquierdo, <i>et al.</i> (1995)
9 cepas de <i>A. flavus</i> L.	Harina de Maíz amarillo	7	25°C	2-340ppb	Zenteno (1971)
9 cepas de <i>A. flavus</i> L.	Harina de maíz blanco	7	25°C	0.45-567ppb	
<i>A. flavus</i> NRRL2999	Arroz	2	28°C	278ppb	Shotwell <i>et al.</i> (1966)
<i>A. flavus</i> NRRL2999	Arroz	12	28°C	1113ppb	
76 cepas de <i>A. parasiticus</i> S.	Sacarosa, glucosa	7	30°C	140-500ppb	Horn <i>et al.</i> (1996)
79 cepas de <i>A. flavus</i> L.	Sacarosa, glucosa	7	30°C	0.1-219 ppb	
<i>A. parasiticus</i> S.	Maíz	5	28°C	2. 5ppb	Tsai G. e Yu S. (1999)
<i>A. parasiticus</i> S.	Maíz	17	28°C	5. 2ppb	

## VII. CONCLUSIONES

- Las cepas de *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare productora de aflatoxinas, presentaron las mismas características morfológicas que una cepa no productora de la misma especie.
- En ninguna cepa de *Aspergillus parasiticus* Speare se presentó la formación de esclerocios a los 10 días en medio de Czapek, a diferencia de la especie *A. flavus* Link, en que el 77% de ellas formó esclerocios.
- Las diferencias en la producción de aflatoxinas en *A. flavus* Link y *A. parasiticus* Speare, estuvieron dadas por la producción de las cepas o aislamientos de cada especie. Lo que significa que en ambas especies hay altas y bajas productoras de aflatoxinas.
- La humedad y la temperatura presentaron un efecto importante para la producción de aflatoxinas, pero los requerimientos de temperatura y humedad fueron específicos para cada cepa de *Aspergillus flavus* Link y de *Aspergillus parasiticus* Speare, por esto hubo tanta variación en la producción de aflatoxinas en cada especie.
- No se estableció un valor constante de producción de aflatoxinas para una cepa ya que participaron varios factores físicos (temperatura, humedad, pH, etc.), químicos (sustrato y nutrientes) y biológicos (variabilidad genética de la cepa, la competencia con otros microorganismos) para que se diera la producción de aflatoxinas.

- Las cepas de *Aspergillus flavus* Link produjeron más aflatoxinas, que las cepas de *Aspergillus parasiticus* Speare en grano de maíz con un contenido de humedad de 18% y en una temperatura de 27° C.
- Las cepas de *Aspergillus parasiticus* Speare producen más aflatoxinas, que las cepas de *Aspergillus flavus* Link en un contenido de humedad de 17% y en una temperatura de 34°C.
- Las cepas de *Aspergillus parasiticus* Speare tuvieron una alta producción de aflatoxinas en el grano de maíz con un contenido de humedad 15% y a una temperatura de 34°C, a los 16 y 24 días de almacenamiento, situación no documentada a la fecha en la literatura.
- La germinación de los granos de maíz se vio afectada tanto por *Aspergillus flavus* Link como por *Aspergillus parasiticus* Speare en los contenidos de humedad de 16 y 17% y en las temperaturas de 27 y 34°C. En la temperatura de 20°C la germinación del grano de maíz no disminuyó y el desarrollo de estos hongos en estudio fue lento.

## VIII. BIBLIOGRAFIA CITADA

- AACC., 1983. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 9<sup>th</sup> ed. The Association: St. Paul, MN.
- Abarca, M. L., 2000. Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergilosis nosocomial. Rev Iberoam Micol. 17: 579-584.
- Abellana, M. , Sanchis, V., Ramos, A.J., 2001. Effect of water activity and temperature on growth of three *Penicillium* species and *Aspergillus flavus* on a sponge cake analogue. Int. J. of Food Microbiol. 77: 151-157.
- Aguilar, F., Hussain, S.P., Cerutti, P. 1993. Aflatoxin B1 induces the transversion of G-T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. Proc Natl Acad Sci USA. 90 (18): 8586-90.
- Allen, R.C.,1975 . The role of pH in the chemiluminescent response of the myeloperoxidase-halide-HOOH antimicrobial system, Biochem. Biohys. Res. Comun. 63: 684.
- AOAC International. 1984. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. The Association: Arlington, VA.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. The Association: Arlington, VA.
- Arachchi, D. H. M., Naylor, R. E. L., Bingham I.J., 1999. A thermal time analysis of ageing of maize (*Zea mays* L.) seed can account for reduced germination in hot moist soil. Field Crops Res. 63 : 159-167.
- Arseculeratue, S.N., Desilva, L.M., Wijesundra, S., Bandunatha, C.H.S.R., 1969. Coconut as a medium for the experimental production of aflatoxin. J. Appl. Microbiol. 18: 88.
- Asao,T., Buchi, G., Abbel-Kader, M. M., Chang, S. B., Wick, E. L., Wogan, G.N., 1963. Aflatoxins B and G. J. Am. Chem. Soc. 87: 1076-1077.
- Banks, H. J., 1981. Effects of controlled atmosphere on grain quality : a review. Food Technol. in Australia. 33: 335-340.
- Basappa, S. C., Jayarman, A., Screenivasamurthy, V., Parpia, H.A.B.,1967. Effects of B-vitamins and ethyl alcohol on aflatoxin production by *Aspergillus oryzae*, Indian J. Exp. Biol. 5:262
- Bash, G., Rae, I.D.,1969. The structure and chemistry of aflatoxins. In Aflatoxin, ed. L. A. Goldblatt. Academic Press, New York. 55-75.
- Bennett, J. W., Fernholz, F.A., Lee, L.S., 1978. Effect of light on aflatoxins, Anthraquinones and Sclerotia in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, Mycol. 70 : 104.

- Bennet, J. W. and Lee, L.S., 1979. Mycotoxins: their biosynthesis in fungi aflatoxins and other bisfuranoids, *J. Food. Prot.* 42: 805.
- Bennett, J.W., Rubin, P.L. , Lee L.S., Chen P.N., 1979. Influence of trace elements and N2 source on versicolorin production by a mutant strain of *Aspergillus parasiticus*, *Mycopatol.* 69: 161.
- Betina, V., 1989. Biological aspects of micotoxinas. Chap.3 Chemical, Biological and Enviromental Aspects. Elsiever. N.Y., U.S.A. 42-433.
- Bhatnagar, D., Cleveland,T.E., Cotty P.J., 1994. Micological aspects of aflatoxin formation. In: Eaton D.L., Groopman J.D. (Eds), *The toxicology of aflatoxins*, Academic Press, London. 327-346.
- Boller, R.A., Schroeder, H.W., 1974. Influence of rice by *Aspergillus candidus* on production of aflatoxin in rice by *Aspergillus parasiticus*, *Phytopathol.* 64: 121.
- Bresler, G., 1995. Hongos toxigenicos y producción de micotoxinas en granos de *Amaranthus*. Tesis, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.
- Bresler, G., Vaamonde, G., Degrossi, Fernandez, P. V.,1998. Amaranth grain as substrate for aflatoxin and zearalenone production at different water activity levels. *Int. J. of Food Microbiol.* 42: 57-61.
- Bressani, R., 1989. The proteins of grain amaranth. *Food Res. Intern.* 5: 13-18.
- Buchi, G., Rae, I.D., 1969. The structure and chemistry of the aflatoxins, in *Aflatoxins*, Goldblatt, L.A., Ed., Academic Press, New York. 55.
- Bucio, V. C. M., Guzmán-de Peña D., Peña Cabriaes J.J., 2001a. Síntesis de aflatoxinas en campos de maíz en Guanajuato, México. *Rev. Iberoam. de Micol.* 18:83-87.
- Bucio, V. C. M., Peña Cabriaes J. J. y Guzmán-de Peña D., 2001b. Producción de Aflatoxinas en Maíz *in vitro*. *Rev. Mex. de Fitopatol.* 19(2): 218-222.
- Bullerman, L.B., 1979. Significance of mycotoxins to food safety and human health, *J. Food Prot.* 42: 65.
- Candlish, A.A.G., M.K., G. Harran., Smith J.E.,1991. Immunoaffinity column chromatography for detection of total aflatoxins in experimental situations. *Biotech. Tech.* 5: 317-322.
- Chen, Z. Y., Brown, R. L., Cleveland, T. E., Damann, K. E., Russin, J. S., 2001. Comparison of constitutive and inducible maize kernel proteins of genotypes resistant or susceptible to aflatoxin production. *Journal of Food Protection.*( Des Moines, Iowa: International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians). 64: 1785-1792.
- Christensen, C. M., Kaufmann. 1965. Deterioration of stored grains by fungi. *Ann. Rev. phytopathol.* 3:69-84.

- Ciegler, A., Lillehoj, E.B., Peterson, R.E., Hall, H.H., 1966. Microbial detoxification of aflatoxin, *Appl. Microbiol.* 14: 934.
- Cleveland, T.E. and Bhatnagar, D. 1991. Molecular regulation of aflatoxina biosynthesis. In: *Mycotoxin, Cancer and Health*. Bray, G. and Ryan, D. (Eds). Louisiana State University Press., Baton Rouge, Louisiana. 270-287.
- Cotty, P. J., 1988. Aflatoxin and sclerotial production by *Aspergillus flavus*: influence of pH. *Phytopathol.* 78: 1250-1253.
- Cotty, P. J., Cardwell, K.F., 1999. Divergence of West African and North American communities of section flavi. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2264-2266.
- Coulombe, R. A. 1994. Nonhepatic disposition and effects of aflatoxin B<sub>1</sub>. Chap. 5, In: *The Toxicology of Aflatoxins*. D. L. Eaton and J. D. Groopman (Eds.). Academic Press, Inc. San Diego, CA. P. 89-101.
- D' Andrea, A. D., Haseltine, W. H., 1978. Modification of DNA by aflatoxina B<sub>1</sub> creates alkali-labile lesions in DNA at positions of guanine and adenine, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75: 4120
- Das, C., Mishra, H.N., 2000. In vitro degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by horse radish peroxidase. *Food Chem.* 68: 309-313.
- Davies. N.D., Diener, U.L., Agnihotri, V.P., 1967. Production of aflatoxin B<sub>1</sub> and aflatoxin G<sub>1</sub> in chemically defined medium by *Aspergillus flavus*. *Mycol. Appl.* 13:251.
- Davies, N. D., Diener, U. L., 1968. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* from various carbon source, *Appl. Microbiol.* 16:158.
- Davies, N. D., Diener, U. L., 1979. Mycotoxins. In *Food and Beverage Mycology*, ed. L.R. Beuchat. AVI Publishing Company, West Port, CT. 397-444.
- Denizel, T., Rolf, E.J., Jarvis, B., 1976. Moisture-equilibrium relative humidity relationship in pistacho nuts with particular reference to the control of aflatoxina production. *J. Sci. Food Agric.* 27: 1027-1034.
- Detroy, R.W., Hesseltine, C.W., 1969. Transformation of aflatoxin B<sub>1</sub> by steroid-hydroxylating fungi, *Can. J. Microbiol.* 15: 495.
- Detroy, R.W., Lillehoj, E.B., Ciegler A., 1971. Aflatoxins and related compounds, in *Microbial Toxins*, Vol.6, Ciegler A., Kadis S. and Aji, S.J., Eds., Academic Press, New York. 39.
- Dharmaputra O.S., Retnowati, I., Amad, M., Ambarwati S., 2000. Airtight Storage of Maize: Its Effect on Fungal Infection and Aflatoxin Production. G. I. Johnson, Le Van to, Nguyen Duy Due and M.C. Webb (eds.). ACIAR Proccedings. Indonesia. 474-482.

- Diener, U.L., Davis, N.D., 1967. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxina and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts, J. Am. Oil Chem.Soc. 44: 259.
- Diener, U.L., Davis, N.D., 1969. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*, in Aflatoxins, Goldblatt, L.A. Ed. Academic Press, New York. 13.
- Diener, UL., Davis, ND., 1977. Aflatoxin formation in peanuts by *Aspergillus flavus*. Bulletin 493, Agricultural Experiment Station, Auburn University, Alabama.
- Dixon, R.C., Hamilton, P.B., 1981. Effects of feed ingredients on the antifungal activity of propionate, Poultry Sci. 60: 2407.
- Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. H. 1980. Compendium of Soil Fungi. Volumen 1. Academic Press. New York, USA. 405 .
- Dorner, J.W., Cole, R.J., Connick, W.J., Daigle, D.J. McGuire, M. R., Shasha, B.S., 2003. Evaluation of biological control formulations to reduce aflatoxin contamination in peanuts. Biol. Control. 26: 318-324.
- Doyle, M. P and Marth, E.H.,1979. Bisulfate degrades aflatoxina: effect of temperature and concentration of bisulfite, J. Food Prot. 41:774-1978.
- Doyle M.P., Applebaum R.S., Brackett R.E. & Marh E. H. 1982. Physical, chemical and biological degradation of mycotoxins in foods and agricultural commodities, J. Food Prot. 45:964.
- Drew, S.W. and Demian, A. L. 1987. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. Ann. Rev. Microbiol. 31: 343-356.
- Duke, E. R., Douglas, C. D., 1999. Effects of heat stress on enzyme activities and transcript levels in developing maize kernels grown in culture. Enzv. and Exp. Botany. 36, 199-208.
- Egel, D. S., Cotty, P. J., Elias, K. S., 1994. Relationships among isolates of *Aspergillus sect. flavi* that vary in aflatoxin production. Phytopathol. 84: 906-912.
- Ehrlich K. C., Montalbano B.G., Cotty P.J., 2002. Sequence comparison of aflR from different *Aspergillus* species provides evidence for viability in regulation of aflatoxin production. Fungal Gen. and Biol. 38, 63-74.
- EL- Bazza Zeinab, E.M., Farrag ,Hala A., EL- Fouly Foie E.D.Z., EL- Tablawy Seham, Y.M., 2001. Inhibitory effect of gamma radiation and *Nigellia sativa* seeds oil on growth, spore germination and toxin production of fungi. Rad. Phys. and Chem. 60: 181-189.
- El Gendy, S. M. y Marth, E. H., 1980. Proteolytic and lipolytic activities of some toxigenic and non toxigenic *Aspergillia* and *Penicillia* . J. of Food Prot. 43: 263-266.

Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K., Oldham, J.H., 1991. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection and methods of control. *Crit.Rev. Food Sci. Nutr.* 30: 403-439.

Ellis, W.O., Smith, J.P., Simpson, B.K., Khanizadeh S., Oldham, J.H., 1993. Control of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* under modified atmosphere packaging (MAP) conditions. *Food Microbiol.* 10: 9-21.

Fernandez, P.V.E., Vaamonde, G., Montani, M.L., 1991 influence of water activity, temperature and incubation time on accumulation of aflatoxin B1 in soya. *Food Microbiol.* 8:195-201.

Figuroa, J. D., 1999. La tortilla vitaminada. *Avance y Perspectiva.* 18:149-158.

French, E. R., Teddy, H., 1982. *Métodos de Investigación Fitopatológica.* Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José Costa Rica.

Gams, W., Christensen, M., Onions, A.H.S., JI, Pitt JI., Samson, RA. 1985. Infrageneric taxa of *Aspergillus*. En: Samson RA y JI Pitt (Eds.) *Advances in Penicillium and Aspergillus systematics*, New York, Plenum Press. 55-64.

García, A. G., 1989. *Manual de Métodos para el análisis de micotoxinas en granos.* Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Autónoma de México. 1ª Ed. México.

García, A. G., Martínez F. R., Melgarejo H. J., 2001. Inspección para aflatoxinas en el maíz almacenado o transportado en el estado de Sonora, 1998: Informe técnico. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica.* 72 (2):187-193.

Gareis, M., Bauer, J. Von Montgales, A., Gedek, B., 1984. Stimulation of aflatoxin B1 and T-2 toxin production by sorbate. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 : 416.

Geiser, D.M., Dornier, J.W., Horn, B.W., Taylor, J. W., 2000. The Phylogenetics of Mycotoxin and Sclerotium Production in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus oryzae*. *Fungal Gen. and Biol.* 31: 169-179.

Gelderblom, W. C. A., Saskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, R. M. Vleggaar, R. and Kriek, N.P.S. 1988. Fumonolins-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. and Env. Microbiol.* 54: 1806-1811.

Gimeno A., 2003. Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas. [http:// www.engormix.com/nuevo/prueba/micotoxinas.asp](http://www.engormix.com/nuevo/prueba/micotoxinas.asp)

Goldblat, L.A. 1969. *Aflatoxin: Scientific background, control and implications.* Academic Press. New York, USA. 472.

Gonzalez, H. H. L., Resnik, S. L., Vaamonde G. 1987. Influence of inoculum size on growth rate and lag phase of fungi isolated from Argentine corn. *Int. J. of Food Microbiol.* 4:111-117.

Gourama, H., Bulleman, L.B. 1997. Anti-aflatoxic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. Int. J. of Food Microbiol. 34: 131-143.

Guzmán-de-Peña, D. 1989. Las aflatoxinas en maíz: un reto a los mexicanos. En: Memoria de la IV Mesa Redonda Latinoamericana sobre Prevención de Pérdidas Poscosecha de Granos. México. 281-288.

Guzmán-de-Peña, D., 1997. El estudio de las aflatoxinas en México. En: J. Ruiz-Herrera, D. Guzmán-de Peña y J.J. Peña-Cabiales (eds.). Perspectivas de la Microbiología en México, Instituto Politécnico Nacional, México. 181-199.

Guzmán-de-Peña, D. 2001. Aflatoxinas: lo que debe saber. Folleto informativo. Laboratorio de Micotoxinas del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato. México. 16.

Hansen, J. T. 1990. Affinity column cleanup and direct fluorescence measurement of aflatoxin M1 in raw milk. J. of Food Prot. 53 (1) : 75-77.

Harrison, M. A., Silas, J. C., Carpenter, J. A., 1987. Incidence of aflatoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* obtained from Georgia corn processing plants. J. Food Qual. 10, 101-105.

Hayes, T. M. 1981, micotoxins and fetal development. Chap.3. In: Mycotoxins Teratogenicity and Mutagenicity. CRS, Press, INC Boca Raton, Fl. 22-39.

Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L., Ellis, J. J., Stubblefield, R.D., (1966) Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Bact. Rev. 30: 795-805.

Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L., Smith M., Ellis J.J., Vandegraft E., Shannon G., 1970. Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series, p. 202-210. In M. Herzberg (ed.), Proceedings of the First U.S.-Japan Conference on Toxic Microorganisms. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

Horn, B.W., Greene, R. L., Sobolev, V.S., Doner, J.W., Powell, J.H., 1996. Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. Mycol., 88 (4): 574-587.

Horn B. W., Doner, W.J. 1999. Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. Appl. and Env. Microbiol. 65 (4): 1444-1449.

Hsieh, D. P. H. and Wong, J. J. 1994. Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins. In: The toxicology of aflatoxins. Human Health, Veterinary Academic Press. N. Y. 73-99.

Hunter, J.H. 1969. Growth and aflatoxina production in shelled corn by the *Aspergillus flavus* group s related to relative humidity and temperature. Ph. D. Thesis, Purdue Univ. Diss. Abstr. 30:144.

Gourama, H., Bullerman, L.B. 1997. Anti-aflatoxic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. Int. J. of Food Microbiol. 34: 131-143.

Guzmán-de-Peña, D. 1989. Las aflatoxinas en maíz: un reto a los mexicanos. En: Memoria de la IV Mesa Redonda Latinoamericana sobre Prevención de Pérdidas Poscosecha de Granos. México. 281-288.

Guzmán-de-Peña, D., 1997. El estudio de las aflatoxinas en México. En: J. Ruíz-Herrera, D. Guzmán-de Peña y J.J. Peña-Cabiales (eds.). Perspectivas de la Microbiología en México, Instituto Politécnico Nacional, México. 181-199.

Guzmán-de-Peña, D. 2001. Aflatoxinas: lo que debe saber. Folleto informativo. Laboratorio de Micotoxinas del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato. México. 16.

Hansen, J. T. 1990. Affinity column cleanup and direct fluorescence measurement of aflatoxin M1 in raw milk. J. of Food Prot. 53 (1) : 75-77.

Harrison, M. A., Silas, J. C., Carpenter, J. A., 1987. Incidence of aflatoxic isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* obtained from Georgia corn processing plants. J. Food Qual. 10, 101-105.

Hayes, T. M. 1981, micotoxins and fetal development. Chap.3. In: Mycotoxins Teratogenicity and Mutagenicity. CRS, Press, INC Boca Raton, Fl. 22-39.

Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L., Ellis, J. J., Stubblefield, R.D., (1966) Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. Bact. Rev. 30: 795-805.

Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L., Smith M., Ellis J.J., Vandegraft E., Shannon G., 1970. Production of various aflatoxins by strains of the *Aspergillus flavus* series, p. 202-210. In M. Herzberg (ed.), Proceedings of the First U.S.-Japan Conference on Toxic Microorganisms. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.

Horn, B.W., Greene, R. L., Sobolev, V.S., Doner, J.W., Powell, J.H., 1996. Association of morphology and mycotoxin production with vegetative compatibility groups in *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. tamarii*. Mycol., 88 (4): 574-587.

Horn B. W., Domer, W.J. 1999. Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. Appl. and Env. Microbiol. 65 (4): 1444-1449.

Hsieh, D. P. H. and Wong, J. J. 1994. Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins. In: The toxicology of aflatoxins. Human Health, Veterinary Academic Press. N. Y. 73-99.

Hunter, J.H. 1969. Growth and aflatoxina production in shelled corn by the *Aspergillus flavus* group s related to relative humidity and temperature. Ph. D. Thesis, Purdue Univ. Diss. Abstr. 30:144.

- Hyde, M. B. 1965. Principles of wet grain conservation. *J. and Proc., Inst. Agr. Eng.* 21: 75-82.
- ISTA. (International Seed Testing Association), 1996. International rules for seed testing . Rules 1996. *Seed Sci. and Technol.* 24 supplement. 24: 1-335.
- Izquierdo C. P., Rojas V. E., Rangel L., Márquez S. E., 1995. Presencia de aflatoxinas en algunos alimentos. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 13: 485-492.
- Jinks, J.L., 1969. Selection for adaptability to new environment in *Aspergillus glaucus*, *J. Gene Microbiol.* 20:223
- Joffe, A. Z., Lisker, N., 1969 Effect of light, temperature and pH value on aflatoxin production in vitro, *Appl. Microbiol.* 18 : 517.
- Karunaratne, A., Bullerman, L.B., 1990. Interactive effects of spore load and temperature on aflatoxin production. *J. Food Prot.* 53:227.
- Kawasugi, S., Hawashima, K., Siracha, P., 1994. Prevention of aflatoxin contamination in Thai maize. 2. Distribution of maize with high moisture content and methods of control of *Aspergillus flavus* infection. *JIRCAS-Journal.* 1: 9-17.
- Klich, M. A, Pitt, JI., 1988. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. North Ryde. CSIRO Division of food Processing.
- Koehler, P.E., Beuchat, L.R., Chinnan, M.S., 1985. Influence of temperature and water activity on aflatoxina production by *Aspergillus flavus* in cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds and meal. *J. Food Protect.* 48:1040-1043.
- Krishna, S.B. and Sinha, K. K., 1991. Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. In: *Mycotoxins in Ecological Systems.* Bathnagar, D., Lillehoj, E.B. and Arora, D. K. (Eds.). Marcel Dekker. N.Y. 59-85.
- Kumeda Y., Asao T., Takahashi H., Ichinoe M., 2003. High prevalence of B and G aflatoxin-producing fungi in sugarcane field soil in Japan: heteroduplex panel analysis identifies a new genotype within *Aspergillus* Section *Flavi* and *Aspergillus nomius*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45: 229-238.
- Landers, K. E., Davis, N. D., and Diener, U.L., 1967. Influence of atmospheric gases on aflatoxina production by *Aspergillus flavus* in peanuts, *Phytopathol.*, 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. *J.Food Sci.* 31:432.
- Lie, J.L., Marth, E.H. 1968. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* in a casein substrate at different pH values, *J. Dairy Sci.* 51:1743.
- Lillehoj, E.B., Stubblefield, R.D., Shannon G., Shotwell, O.L., 1971. Aflatoxin M1 removal from aqueous solutions by *Flavobacterium aurantiacum*, *Mycopathol. Mycol. Appl.* 45: 259.

Lillehoj, E. B., 1983. Effect of environmental and cultural factors on aflatoxina contamination of developing corn kernels. In Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn, Southern Cooperative Series Bulletin 279 for Southern Regional Project S-132; Diener, U. L., Asquith, R. L., Dickens, J. W., Eds, Auburn University, Alabama, USA.: Opelika AL. 27-34.

Lillehoj, E. B., 1991. Aflatoxin: genetic mobilization agent. In: Mycotoxins in Ecological Systems. Bathnagar, D., Lillehoj, E.B. and Arora, D. K. (Eds.). Marcel Dekker. N.Y. 1-22.

Lisker N. and Lillehoj E. B., 1991. Prevention of mycotoxin contamination (Principally Aflatoxins and *Fusarium* toxins) at the preharvest stage. In *Mycotoxins and Animal Foods*. eds. J. E. Smith and R. S. Henderson, CRC Press Inc. Boca Raton. 689-719.

López, F. L. C., 1966. Factors Affecting of Grains and Seeds by *Aspergillus flavus*, and Effects of the Fungus on Germination of the Seeds. Thesis Submitted to the Faculty of the Graduate School of the University of Minnesota. 62.

Magno, K. K., Gupta, S. K. And Venkitasubramanian, T. A., 1997. Biosíntesis of aflatoxins. *Bacteriol. Rev.* 41: 822-855.

Mann, G. E., Codifer, L. P. J. Gradner, H.K., Koltum, S. P. Dollear, F. G., 1970. Chemical inactivation of aflatoxins in peanut and cotton seed meals. *J. Am. O. I. Chem. Soc.* 47:173-176.

Marín, S., Sanchis, V., Arnau, F., Ramos, J., Magan, N., 1998. Colonization and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize grain in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *International Journal of Food Microbiol.* 45: 107-117.

Masimango, N., Remacle, J., Ramaut, J. L., 1978. The role of adsorption in the elimination of aflatoxin B1 from contaminated media. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 6: 101-105.

Mateles, R.I., Adye J.C., 1965. Production of aflatoxins in Submerged Culture. *Appl. Microbiol.* 2 (13):208-211.

Miller, D. M., Wilson, D.M., 1994. Veterinary diseases related to aflatoxins. Chap. 16, In: *The Toxicology of Aflatoxins*, D. L. Eaton and J. D. Groopman (Eds.). Academic Press INC. San Diego, CA. 347-364.

Misra, R.S., Shina, K. K., 1979. Rice flour liquid medium: a new médium to study the aflatoxina producing potential of *Aspergillus flavus*. *National Academy of Sciences Letters India*, 3 (2):1-4

Montani, M. L., Vaamonde, G., Resnik, S. L., Buera, P., 1988. Water activity influence on aflatoxin accumulation in corn. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 349-353.

Moore-Landecker, E., 1996. *Fundamentals of Fungi* Prentice. Edit. Hall, Inc., New York.

Moreno, M. E., Christensen, C. M., 1971. Differences among lines and varieties of maize in susceptibility to damage from invasion by storage fungi. *Phytopathol.* 61:1498-1500.

Moreno M. E. and Ramírez G. J. (1985) Protective effect of fungicides on corn seed stored with low and high moisture content. *Seed Sci. and Technol.* 13, 285-290.

- Moreno, M. E. Méndez, A., Ramírez G.J., 1987. Comportamiento de la semilla de maíz (zea mays L.) bajo diferentes sistemas de almacenamiento. Turrialba. 37 : 267-274.
- Moreno, M. E., 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. Programa Universitario de Alimentos. 109.
- Moreno, M. E. y Gil, G. M. 1991. La biología de *Aspergillus flavus* y la producción de aflatoxinas. Programa Universitario de Alimentos. UNAM. 42.
- Moreno, M. E. , Vázquez, B. M. E y Facio, P. F., 2000 Uso de sales del ácido propiónico para inhibir la producción de aflatoxinas en granos almacenados de maíz. Agrociencia. 34: 477-484.
- Niles, E.V., Norman, J.A., Pimbley, D., 1985. Growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in wheat and barley. Trans. Br. Mycol. Soc. 84 : 259-266.
- Northolt, M.D., Verhulsdonk, C.A., Soentoro, P.S., Paulsch, W.E., 1976. Effect of water activity and temperature on aflatoxina production by *Aspergillus parasiticus*. J. Milk Food Technol. 39: 170-174.
- Okazaki, H. S., Tsuruta O.,1992. Population levels of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* in field soils in two areas of Kyushu district. Ann. Phytopathol. Soc. Japan 58: 208-213.
- Paredes-López, O., Sema-Saldívar, O. y Guzmán-Maldonado, S.H., 2000. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas de México-El caso de la tortilla. El Colegio de Sinaloa, CINESTAV-IPN, INIFAP y TEC de Monterrey. Culiacán, Sinaloa, México.107.
- Passone, A., Cavaglieri, L., Etcheverry M., 2003. Control *in Vitro* del Crecimiento Micelial de Especies Aflatoxigénicas de *Aspergillus* Sección *flavi* por el Efecto de Antioxidantes en Agar Harina de Maní. I Panamerican Symposium on Mycotoxins for Industry. México. 79
- Payne, G.A. , Brown, M.P., 1998. Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. Annu. Rev. Phytopathol. 36: 329-362.
- Peña, D. S., Durán, M. C., 1990. Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta. Ciencia y Desarrollo, 16 (94): 61-72.
- Pitt, J. I., Miscamble, B.F., 1995. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. J. Food Prot. 58:86-90.
- Pixton, S. W., 1967. Moisture content - its significance and measurement in stored products. J. of Stored Prod. Res., 3: 35-47.
- Praveen, R. J., Subramanyam C.1999. Requirement of Ca<sup>+</sup> for aflatoxin production: inhibitory effect of Ca<sup>2+</sup> channel blockers on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. Letters in Appl. Microbiol., 28:85-88.
- Purchase, I. F. H., Steyn, M., Rinsma, R., Tsin, R. C., 1972. Reduction of the aflatoxina M content of milk by processing. Food Cosmet. Toxicol., 10: 383-387.

Raeker, M. O., Bern, C. J., Johnson, L. A., Glatz, B. A., 1992. Preservation of high-moisture maize by various propionate treatments. *Cereal Chem.*, 69, 66-69.

Raper, K. B. y Fennell, D. I., 1965. *The Genus Aspergillus*. Williams and Wilkins. Baltimore, Maryland, US A. 686.

Richardson, T., 1976. Enzymes, in Food Chemistry, Fennema, O.R., Ed., Marcel Dekker, New York. 338.

Rodriguez-del-Bosque L. A., 1996. Impact of agronomic factors in aflatoxina contamination in preharvest field corn in northeastern Mexico. *Plant Dis.* 80: 988-993.

Roebuck, B. D., Maxuitenko, Y. Y., 1994. Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxina carcinogenesis. Chap. 2, en: The toxicology of aflatoxins, D. L. Eaton y J. D. Groopman (Eds). Academic Press, San Diego. 27-43.

Rustom, I.Y.S., 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem.* 59(1) : 57-67.

Sabbioni, G., 1990. Chemical and physical properties of the major serum albumin adduct of aflatoxin B1 and their implications for the quantification in biological samples, *Chem. Biol. Interact.* 75: 1.

SAGARPA. Sistema de Información Agropecuaria de Consulta, 1980-2001 (SIACOM). México, 2002. [http://www.inegi.gob.mx/estadistica/espanol/economia/ganaderia/gan\\_01.html](http://www.inegi.gob.mx/estadistica/espanol/economia/ganaderia/gan_01.html) 06/05/03

Saito, M., Tsuruta, O., Siriacha, P., Kawasugi, S., Manabe, M., Buangsuwon, D., 1986. Distribution and aflatoxin production of the atypical strains of *Aspergillus flavus* isolated from soils in Thailand. *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.* 24: 41-46.

Saito, M., Tsuruta, O., 1993. A new variety of *Aspergillus flavus* from tropical soil in Thailand. *Proc. Jpn. Assoc. Mycotoxicol.* 37: 31-36.

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

Sarasin, A. R., Smith, C.A., Hanawalt, P. C., 1977. Repair of DNA in human cells after treatment with activated aflatoxin B1, *Cancer Res.*, 37: 1786

Sargeant, K., Sheridan, A., O' Kelly J., Camaghan, R.B. A., 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature.* 192, 1095-1097.

SAS, 1989. (SAS Institute Inc.) SAS Language Guide. Release 6.03 Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC.

Sauer D. B. and Burroughs R., 1974. Efficacy of various chemicals as grain mould inhibitors. *Transactions American Society of Agriculture Engineering* 17: 557-559.

- Sauer D. B., Meronuck, R. A. y Christensen, C. M. 1992. Microflora. In Storage of cereal Grains and Their Products. (Edited by D. B. Sauer). pp. 313-340. American Association of Cereal Chemists, Inc. Saint. Paul Minnesota. U.S.A.
- Schindler, A. F., Palmer, J.G. and Eisenberg, W.V., 1967. Aflatoxin Production by *Aspergillus flavus* as Related to Various Temperatures. *Appl. Microbiol.*, 15 (5) :1006-1009.
- Schroeder, H. W., Hein, H., 1967. Aflatoxins: production of the toxins in vitro in relation to temperature, *Appl. Microbiol.* 15 : 441.
- Secretaria de salud, 1999. Italia. In: Guzmán-de-Peña, D. 2001. Aflatoxinas: lo que debe saber. Folleto informativo. Laboratorio de Micotoxinas del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato. México. 16.
- Selvi, A.T., Joseph, G.S., Jayaprakasha, G.K., 2003. Inhibition of growth and aflatoxin production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and its antioxidant activity. *Food Microbiol.* 20: 455-460.
- Shantha, T. Murthy, V. S. Rat E.R., Prema V., 1986. Detoxification of groundnut seeds by urea and sunlight. *J.Food Safety.* 7: 299-304.
- Sharma, R.S., Trivedi, K.R., Wadodkar, U.R., Murthy, T.N., Punjarath, J.S., 1994. Aflatoxin B1 content in deoiled cakes, cattle feeds and damage grains during different seasons in India. *J. Food. Sci. Technol.*, 31(3): 244-246.
- Shih, C. N., Marth, E.H., 1973. Aflatoxin Produced by *Aspergillus parasiticus* when incubated in the presence of different gases. *J. Milk Food Technol.* 36 (8) : 421-425.
- Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Stubblefield, R. D. & Sorenson W. C., 1966. Production of aflatoxina on rice. *Appl. Microbiol.* 14: 425-428.
- Smith, J.E., Moss, M., 1985. *Mycotoxins. Formation, Analysis and Significance*, Wiley and Sons, U.K.
- Sorenson, W. G., Hesseltine, C.W., Shotwell, O.L., 1966 Effect of Temperature on Production of Aflatoxin on Rice by *Aspergillus flavus*. Northern Regional Research Laboratory Peoria, Illinois. 49-55.
- Steele, R.G.D., Torrie J.H., 1986. *Principles and procedures of statistics*. McGraw-Hill. New York.
- Stoloff, L., Truckness, M., Hardin, N., Francis, O. J., Hayes, J. R., Polan, C. E., Campbell, T. C., 1975. Stability of aflatoxina M1 in milk. *J. Dairy Sci.* 58: 1789-1793.
- Sweeney, M.J., Dobson, A.D.W., 1998. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int. J. of Food Microbiol.* 43: 141-158.
- Swensen, D.H., Lin J.K., Miller, J.A., Miller, E.C., 1977. Aflatoxin B1- 2,3 epoxide as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxin B1 and B2 to rat liver DNA and. RNA in vivo, *Cancer Res.* 37:172.

- Tabak, H.H., Cooke, W.B., 1968. The effect of gaseous environment on the growth and metabolism of fungi, *Bot. Rev.* 34:124.
- Tsai-Guo-Jane , Yu Shou-Chin (1999) Detecting *Aspergillus parasiticus* in cereals by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Int. J of Food Microbiol.* 50: 181-189.
- Townsend, C. A., Christensen, S. B., Trauwein, K. 1984. Hexanoate as a starter unit in polyketide synthesis. *J. Amer. Chem. Soc.*106: 3868-3869.
- Trucksess, M.w., Stoloff, L., Mislivec, P., 1988. Effect of temperature, water activity and other toxicogenic mould species on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxina production on corn, pinto beans and soybeans. *J. Food Protect.* 51: 561-563.
- Vaamonde, G., Patriarca, A., Fernández, P.V., Comerio, R., Degrossi C., 2003 Variability of aflatoxin and cyclopiazonic acid production by *Aspergillus* section *flavi* from different substrates in Argentina. *Int. J. of Food Microbiol.*, 2738 :1-6.
- Vázquez-Arista, M., Ramírez- Flores, A., and Blanco-Labra, A.1995. Maize and bean storage and their use by rural farmer in central state of Mexico. *J. Stored Prod. Res.* 31(4):325-333.
- VICAM., 1999. Mycotoxin testing system. Aflatest Somerville, M.A.
- Wareing, P. W., 1997. Incidence and detection of thermotolerant and thermophilic fungi from maize with particular reference to *Thermoascus* species. *Int. J. of Food Microbiol.*, 35 : 137-145.
- Widstrom, N.W., McMillan, W.W., Wilson, D.M., 1987. Segregation for resistance to aflatoxina contamination among seeds on an ear of hybrid maize. *Crop Sci.*27, 961-963.
- Wogan, G. E. and P. M. Newberne., 1967. Dose-response characteristics of aflatoxina B1 carcinogenesis in the rat. *Cancer Res.* 27: 543-548.
- Wright, M. S., Greene-McDowelle, D.M., Zeringue, Jr. Hampdem, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., 2000. Effects of volatile aldehydes from *Aspergillus* resistant varieties of corn on *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxina biosynthesis. *Toxicon* 38. 1215-1223.
- Yousef, A. E., Marth E. H., 1983. Incorporation of (C<sup>14</sup>) acetate into aflatoxin by resting cultures of *Aspergillus parasiticus* in the presence of antifungal agents, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech.* 18: 103.
- Yousef, A. E., Marth E. H., 1987. Kinetics of interaction of aflatoxina M1 in aqueous solutions irradiated with ultraviolet energy. *J. Agric. Food Chem.*, 35:785-789.
- Yu, J., Bhatnagar, D., Ehrlich, K. C., 2002. Aflatoxin biosynthesis. *Rev. Iberoam. Micol.* 19 :191-200.
- Zenteno, Z. M., 1971. Producción de aflatoxinas por cepas de *Aspergillus flavus* aisladas de maíz. *Revista. Latino. Americana de Microbiol.*, 13: 263-266.

Zeringue Jr., H.J., McCormick, S.P., 1990. Aflatoxin production in cultures of *Aspergillus flavus* incubated in atmospheres containing selected cotton leaf-derived volatiles. *Toxicon* 28: 445-448.

Zeringue Jr., H.J., Brown, R.L., Neucere, J.N., Cleveland, T.E., 1996. Relationships between C6-C12 alkanal and alkenal volatile contents and resistance of maize genotypes to *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *J. Agric. Food Chem.* 44: 403-407.

Zuber, M.S., Darrah, L.L., Lillehoj, E.B., Josephson, L.M., Manwiller, ., Scott, G.E., Gudauskas, R.T., Horner, E.S., Widstrom, N.W., Thompson, D.L., Bockholt, A.J., Bruebaker, J.I., 1983. Comparison of open-pollinated maize varieties and hybrids for preharvest aflatoxina contamination in the souther United States. *Plant Dis.* 67:185-187.

## APENDICE

**Cuadro A-1. Cuadrados medios del análisis de varianza en la producción de aflatoxinas en Medio líquido de arroz, grano de maíz, contenido de humedad y germinación de los granos de maíz inoculados con *A. flavus* L.**

F.V.	G.I.	Producción de aflatoxinas		C.H. (%)	Germinación (%)
		Medio líquido	Maíz		
Cepas <i>A. flavus</i> L.	31	22.92477213**	35.56766666**	0.19591448**	289.2459677**
Error. Exp	64	0.40660810	0.7285290	0.01923854	14.5937500
C.V. (%)		16.93	16.80	0.76	21.44

\*,\*\*; = Significativo al 5 y 1% de nivel de significancia respectivamente

**Cuadro A-2. Cuadrados medios del análisis de varianza en la producción de aflatoxinas en Medio líquido de arroz, grano de maíz, contenido de humedad y germinación de los granos de maízinoculadas con *A. parasiticus* S.**

F.V.	G.I.	Producción de aflatoxinas		C.H. (%)	Germinación (%)
		Medio líquido	Maíz		
Cepas <i>A. parasiticus</i>	7	17.74013742**	26.28435246**	0.30114048**	818.6428571**
Error. Exp	16	0.20009109	0.36291971	0.06368750	25.6250000
C.V. (%)		20.86	22.12	1.38	19.65

\*,\*\*; = Significativo al 5 y 1% de nivel de significancia respectivamente

**Cuadro A-3. Estimación de los componentes de la varianza de la producción de aflatoxinas en medio líquido en las especies *Aspergillus flavus* L y *Aspergillus parasiticus* S.**

Random Effect	Valor de la varianza	Componente de la varianza	Error estandar	95% Limite mínimo	95% Limite máximo	Variabilidad Total
cepa1[Especie]&Random	55.226413	34098.025	9869.96	20764.939	66128.147	98.221
Residual		617.4224				1.779
Total		34715.447				100.000

**Cuadro A-4. Estimación de los componentes de la varianza de la producción de aflatoxinas en maíz inoculado con *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S.**

Factor	Varianza	Componente de la varianza	Error estandar	95% Limite mínimo	95% Limite máximo	Variabilidad Total
cepa1[especie]&Random	16.6512	335703.18	99713.2	202138.67	664396.25	94.335
Residual		20160.88				5.665
Total		355864.06				100.000

**Cuadro A-5. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza en la producción de aflatoxinas en maíz inoculado con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. almacenado a tres contenidos de humedad a 30, 60 y 90 días en una temperatura de 27°C.**

F.V	G.L.	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
		30	60	90
Humedad	2	3.50625448**	17.02773506**	0.22251268
Cepas	6	8.73852974**	83.44846185**	12.35231996**
Hum.*Cepa	12	1.16920162**	13.88480632**	0.81697403
E.Exp.	42	0.32762200	1.78197395	0.42503216
C.V.(%)		37.79	32.89	31.52

\*,\*\*; = Significativo al 5 y 1% de nivel de significancia respectivamente

**Cuadro A-6. Cuadrados medios y significancia en la germinación de los granos de maíz inoculado con cepas de *A. flavus* L. y almacenado a tres contenidos de humedad (15.5, 16 y 17%) durante 90 días.**

F.V	G.L.	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
		30	60	90
Humedad	2	14672.95808081**	9707.41349206**	3425.36857864**
Cepas	6	166.85185185	1929.17989418**	2011.12698413**
Hum.*Cepas	12	759.46069024**	420.34775132**	734.45708874**
E.Exp.	42	83.40476190	76.72222222	10.96825397
C.V.(%)		14.86	44.14	28.69

\*,\*\*; = Significativo al 5 y 1% de nivel de significancia respectivamente

**Cuadro A-7. Cuadrados medios del análisis de varianza del contenido de humedad de los Granos de maíz inoculado con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S. almacenada en tres contenidos de humedad, durante 30, 60 y 90 días.**

F.V	G.L.	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
		30	60	90
Humedad	2	15.522998745**	14.01267501**	21.75358188**
Cepas	6	0.54083492**	2.36985079**	1.64530317**
Hum.*Cepas	12	0.43704214**	0.68573194**	0.53194307*
E.Exp.	42	0.16480655	0.15133175	0.23866369
C.V.(%)		2.35	2.30	2.84

\*,\*\*; = Significativo al 5 y 1% de nivel de significancia respectivamente

**Cuadro A-8. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza en la producción de Aflatoxinas en maíz inoculado con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., almacenada bajo tres temperaturas durante 8, 16 y 24 días a una humedad de 17%.**

F.V	G.L.	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
		8	16	24
Temp..	2	0.51714844	13.40979211**	32.44777792**
Cepas	6	5.77055614**	10.94082229**	24.00823450**
Temp.*Cepas	12	0.91594219**	9.89079759**	16.43725540**
E.Exp.	42	0.30256259	0.32520725	0.26499548
C.V.(%)		45.81	31.06	21.68

\*,\*\* = Significativo al 5 y 1% de nivel de significancia respectivamente

**Cuadro A-9. Cuadrados medios y significancia del análisis de varianza en la germinación de Los granos de maíz inoculado con cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, almacenada durante 8, 16 y 24 días, en tres temperaturas.**

F.V	G.L.	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
		8	16	24
Temp..	2	7459.111111**	20314.349206**	24211.619048**
Cepas	6	1405.989418**	2066.582011**	1664.550265**
Temp.*Cepas	12	1560.592593**	1742.867725**	1454.582011**
E.Exp.	42	138.349206	21.714286	40.317460
C.V.(%)		13.71	6.24	9.96

\*,\*\* = Significativo al 5 y 1% de nivel de significancia respectivamente

**Cuadro A-10. Cuadrados medios del análisis de varianza en la humedad de los granos de Maíz inoculado con cepas de *A. flavus* L. y *A. parasiticus* S., almacenado durante 8, 16 y 24 días, en tres temperaturas.**

F.V	G.L.	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
		8	16	24
Temp.	2	12.67834444**	10.64231111**	7.18139048**
Cepas	6	0.10579153	0.26294021**	0.04885714
Temp.*Cepas	12	0.21509630	0.72414259**	0.13807937
E.Exp.	42	0.24449206	0.06384286	0.07392540
C.V.(%)		2.94	1.51	1.59

\*,\*\* = Significativo al 5 y 1% de nivel de significancia respectivamente

## ABREVIATURAS

*A. flavus* L : *Aspergillus flavus* Link.

*A. parasiticus* S : *Aspergillus parasiticus* Sphaer.

AACC: American Association of Cereal Chemists

AFB1: aflatoxinas B1.

AFB2: aflatoxinas B2.

AFG1: aflatoxinas G1.

AFG2: aflatoxinas G2.

AOAC: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.

aw : actividad de agua

C.H : contenido de humedad

°C : grado centigrado (s)

cm : centímetro (s)

g : gramo (s)

HPLC : cromatografía líquida de alta resolución

hrs : horas

ISTA : International Seed Testing Association

min : minuto (s)

ml : mililitro (s)

mm : milímetro (s)

nm : nanómetros

pH : potencial hidrógeno

ppb : partes por billon.

TLC : cromatografía de capa fina

µl : microlitro (s)