

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias

MICOFLORA DE MAIZ (Zea mays L.) , PARA CONSUMO

HUMANO CON ESPECIAL ATENCION A LA ESPECIE

Aspergillus flavus Link Y SU CAPACIDAD

PARA PRODUCIR AFLATOXINAS

T E S I S

Que para obtener el título de :

B I O L O G O

P r e s e n t a :

REBECA MARTINEZ FLORES

México , D. F.

1984



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 está 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.

" MICROFLORA DE MAIZ (Zea mays L.), PARA CONSUMO HUMANO , CON
ESPECIAL ATENCION A LA ESPECIE Aspergillus flavus Link, Y
SU CAPACIDAD PARA PRODUCIR AFLATOXINAS."

RECONOCIMIENTOS.

Deseo manifestar mi agradecimiento a :

La M.en C. Genoveva García Aguirre por el asesoramiento
brindado para la elaboración del presente trabajo , así
como su apoyo constante durante el mismo .

Al Instituto de Biología (U.N.A.M.) por las facilidades
que me brindó para realizar la investigación .

Al jurado dictaminador , la revisión del presente tra--
bajo .

Dr. Ernesto Moreno Martínez

M.en C. Guadalupe Vidal Gaona

M.en C. Cora Salinas Chapa

M.en C. Jorge Ramírez González

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

I N D I C E

	pág.
INTRODUCCION _____	1
MATERIALES Y METODOS _____	8
RESULTADOS Y DISCUSION _____	15
CONCLUSIONES _____	26
LITERATURA CITADA _____	27

INTRODUCCION.

En México el Maíz juega un papel muy importante dado que es un producto básico en la dieta de sus habitantes. En 1981 la producción de maíz fue de 14 millones 766 mil toneladas, en 1982 fue de 12 millones 215 mil ton., y en 1983 fue de 13 millones 928 mil ton., cantidades que han resultado insuficientes para cubrir las necesidades de una población en constante crecimiento , por lo que ha sido necesario importar grandes cantidades de maíz en los últimos años . Las importaciones han sido cada vez mayores , de tal manera, que en 1981 se importaron 2 millones 945 mil toneladas de este cereal (De la Madrid, 1983).

El maíz tiene una gran demanda en todo el territorio nacional , las estimaciones indican que el consumo anual es de 17 millones 719 mil ton., ésto nos dice que más del 70 % de la población se alimenta de este cereal.

Además de su consumo directo por la población y de ser esencial en la alimentación animal, desempeña una función considerable en la industria, ya que a partir de este grano , se elaboran un gran número de productos y subproductos (SARH, 1983).

Lo anterior da una idea de la gran importancia que tiene el maíz en México ; sin embargo hay ciertos factores que deben preocupar tanto al sector público como al privado en sus dependencias y subdependencias involucradas , tanto en aspectos de alimentación , como de salubridad y de comercio ya que el maíz puede ser contaminado en forma natural por sustancias tóxicas para los animales, incluyendo al hombre y la presencia de estas sustancias no está restringida en una región geográfica o climática , sino que

su distribución es mundial. Estas substancias son las micotoxinas, que son toxinas producidas por hongos que crecen en el maíz almacenado o durante su formación en el campo .

El problema de las micotoxinas no es nuevo; sin embargo fue hasta el descubrimiento de las aflatoxinas que se iniciaron los estudios sistemáticos sobre este tema.

Los primeros estudios fueron realizados en Inglaterra como resultado del brote de una enfermedad desconocida, que causó la muerte a cientos de pavos alimentados con harina de cacahuete. Estudios posteriores indicaron que la harina provenia de lotes de cacahuete, que habían sido infectados por el hongo Aspergillus flavus el cual es potencialmente productor de aflatoxinas (Spensley, 1963; Lancaster, et al., 1961; Sargeant, et al., 1961).

Posteriormente se comprobó que las aflatoxinas son carcinógenos poderosos y que era suficiente exponer a un animal por poco tiempo a la toxina para causar el desarrollo de hepatocarcinomas (Butler, 1965), por lo que se empezaron a hacer estudios epidemiológicos en zonas donde el cáncer primario del hígado es muy frecuente, se obtuvieron gran cantidad de pruebas indirectas , que parecen indicar que las aflatoxinas quizá juegan un papel importante en la etiología del cáncer primario del hígado , en la población humana de Africa y del Sureste de Asia en donde es frecuente el enmohecimiento de los alimentos (FAO, 1978).

Las aflatoxinas han sido estudiadas intensivamente en algunos de los alimentos más importantes para el consumo humano como las semillas de oleaginosas y los cereales que son susceptibles de contaminación por aflatoxinas..

Los niveles más altos y la mayor incidencia de contaminación se registraron en las regiones tropicales y subtropicales. Años después se determi--

nó que las cepas de hongos tóxicos tienen una distribución muy vasta en la naturaleza y que son muchos los alimentos vulnerables a su ataque , a su proliferación y a la producción de toxinas ; así como también los productos agrícolas en etapas sucesivas de cultivo . Las cosechas mal almacenadas ofrecen sustratos favorables para el desarrollo de los hongos (FAO, 1978).

Ante esta evidencia, muchos países del mundo han desarrollado legislaciones para controlar este tipo de contaminación en productos básicos, tal es el caso de la Legislación Oficial del Mercado Común Europeo (Anónimo, 1974 ; Council Directive of 17 / 12 , 1963 ; Anónimo , 1969).

Una legislación similar existe en la República Federal de Alemania, en donde se menciona al cacahuate y al maíz entre otros productos básicos de importación sujetos a ser controlados. En este mismo país , el Ministerio para la Juventud, la Familia y la Salud en 1978 establece por ley un máximo de 10 μ g/Kg de toxinas en cualquier alimento destinado para el consumo humano .

Algunos investigadores consideran excesiva la tolerancia de 10 μ g/Kg en alimentos de consumo humano y abogan para que se desarrollen técnicas analíticas más sensibles, que permitan determinar cantidades por debajo de ese nivel (Frank, 1976). También han desarrollado técnicas que permiten distinguir mediante pruebas simples la presencia de cepas de hongos productoras de toxinas de las no productoras (Vogel, 1965).

Hasta hace unos años se pensaba que las aflatoxinas se formaban únicamente durante el almacenamiento de los granos ; sin embargo estudios más recientes han demostrado que también se pueden formar en el campo o durante la cosecha. En una revisión reciente, Zuber y Lillehoj 1979 , tratan aspectos de los procesos de infección en el campo por A. flavus incluyendo lo siguien

te ; a) eficacia del inóculo, b) métodos de transmisión de las esporas al sitio de infección, c) establecimiento de la infección por los hongos en las semillas ,d) distribución del inóculo secundario de los sitios de infección inicial a otras mazorcas o semillas no infectadas.

En los años de 1971 y 1972 fue reportada la presencia de Aspergillus flavus en los campos maiceros del sur de Indiana antes de la cosecha del maíz (Rambo,et al., 1974), presentandose una mayor incidencia en el grano dañado físicamente. Fennell,et al., 1975 reportaron la presencia de A. flavus en cosechas recientes de maíz en el año de 1972 en Missouri .

Estudios contudentes en los años de 1971 , 1972 y 1973 en todas las áreas de producción de maíz de los Estados Unidos indicaron que las aflatoxinas fueron formadas en el campo (Anderson,et al., 1975).

Investigaciones preliminares en el laboratorio fueron realizadas con el fin de determinar las condiciones necesarias para la producción de aflatoxinas , encontrándose que se requiere de la influencia de un sustrato adecuado y de cepas de A. flavus productoras de aflatoxinas(debido a que no todas las cepas de este hongo son capaces de producirlas).

La temperatura y la humedad son factores físicos importantes en la producción de toxinas , ya que puede estar presente la cepa productora , pero si no se encuentra en las condiciones favorables no habrá producción de toxinas, aún cuando el moho pueda crecer e invadir el sustrato .

La temperatura ha sido reconocida como uno de los factores que influyen en la producción y acumulación de aflatoxinas (Rabie,et al., 1965 ; Schindler,et al., 1967 ; Schroeder y Hein , 1967; Lillehoj , 1983) , dandose la formación de toxinas dentro de una extensa gama de temperaturas que van de

10 a 40°C, con una producción óptima entre los 25 y 32°C. Estos límites dependen del sustrato y de las condiciones fisicoambientales en los cuales se encuentre la cepa productora (FAO., 1978).

Se ha clasificado A.flavus como un hongo mesofílico , ya que manifiesta un crecimiento óptimo entre 36 y 38°C pero crece dentro de un rango de temperatura que va de 6 a 46°C (Schindler, et al., 1967). En un medio nutritivo la producción de aflatoxinas máxima fue determinada entre los 24 y 25°C (Schindler, et al., 1967) y con una producción negativa abajo de los 7.5°C y/o superior a los 40°C (Schindler , 1977; Schroeder y Hein, 1967) .

En una investigación sobre los efectos de la temperatura en la producción de aflatoxinas en cacahuete, Diener y Davis, 1969 y 1970 demostraron que los límites de la temperatura para el crecimiento y producción de aflatoxinas fue de 14 a 41 °C. En estudios similares en arroz, Sorenson, et al. ., 1966; Boller y Schroeder, 1974 observaron que A. flavus produce aflatoxinas entre 11 y 37 °C, siendo la temperatura óptima de 28 a 32 °C .

West y Hamilton, 1973 elevaron la temperatura de 15 a 28°C en un periodo de incubación de 48 hrs., y observaron que la variación en el régimen de temperaturas aumentó la producción de aflatoxinas.

Otro factor importante para la producción de aflatoxinas es el contenido de humedad y depende directamente de la humedad relativa de la atmósfera donde se encuentren. En la atmósferas con humedades relativas menores de 75 % no habrá desarrollo de hongos en los granos almacenados. La humedad en equilibrio de un producto a una humedad relativa determinada depende de su composición química, por lo tanto, en diversos productos es diferente la humedad relativa que determina el nivel de la humedad para el desarrollo de los hongos.

La clase de hongos que crecen en un producto dependen también de la actividad fisiológica del sustrato. Si el sustrato es activo, se limita el desarrollo de los hongos saprófitos tales como los géneros Aspergillus y Penicillium; si es fisiológicamente inactivo como en el caso de productos viejos o sometidos a tratamientos térmicos, las cepas que pertenecen a estos géneros crecen en el producto y pueden producir metabolitos tóxicos (FAO., 1978).

Los requerimiento de humedad para el crecimiento de A.flavus y la producción de aflatoxinas han sido confirmados en semillas maduras de maíz. Los estudios han demostrado que los hongos no presentan crecimiento y acumulación de aflatoxinas en una humedad relativa menor de 85 % (López y Christensen, 1967 ; Sauer y Burroughs, 1980); sin embargo , en contenidos de humedad ligeramente altos (86 - 87 % de humedad relativa) los hongos crecieron rápidamente y produjeron aflatoxinas. Winn y Lane ,1978 ,citados por Diener, et al., 1983 reportaron cantidades significativas de aflatoxinas en semillas maduras almacenadas en una humedad relativa de 90 % en un periodo de 48 hrs.

Newberne, et al., 1964 produjeron aflatoxinas de cepas de A.flavus utilizando como sustrato trigo con un contenido de humedad de 30 a 40 %. El sustrato es otro factor importante en la producción de aflatoxinas y se ha observado que existe una gran cantidad de productos agrícolas que se utilizan como sustrato, previamente se esterilizan antes de ser inoculados con los mohos que producen toxinas. Codner, et al., 1963 produjeron aflatoxinas en cacahuate; Chang , et al.,1963 utilizaron como sustrato al trigo y Merwe , et al., 1963 usaron harina de maíz. También se han empleado otros productos de consumo humanos como : soya, maíz , frijol , nuez del Brasil , cebada y arroz (Goldblatt, 1968; Shotwell ,et al., 1966 ; Hesseltine , et al.,1966).

Trabajos previos han demostrado que el arroz es un excelente sustrato para la producción de aflatoxinas (Hesseltine,et al., 1966; Shotwell,et al., 1966).

También se ha reportado la producción de aflatoxinas utilizando medios de cultivo sintéticos (Mateles y Adyes , 1956 ; Reddy,et al., 1971; Linn y Dinnese , 1976 ; Hara,et al., 1974 ; Davis,et al., 1966).

Por lo mencionado anteriormente consideramos importante conocer las condiciones en las que se encuentra el maíz que se consume en forma de torti---llas en el Distrito Federal; para lo cual se plantearon los siguientes objetivos.

- 1.- Determinar la micoflora presente en los granos de maíz (Zea mays L) utilizados para el consumo humano .
- 2.- Identificar hasta especie las cepas correspondientes al género Aspergillus en el maíz en estudio .
- 3.- Determinar la capacidad de producir aflatoxinas de las cepas de A. flavus Link. , aisladas del maíz .

MATERIALES Y METODOS.

Grano .

Fueron utilizadas 90 muestras de maíz amarillo ,que pueden ser consideradas representativas del maíz que se consumió en el Distrito Federal durante los meses del verano de 1983 .

Micoflora.

Para determinar la cantidad de hongos presentes en los granos ,éstos fueron desinfectados superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % por un minuto, después fueron lavados con agua destilada estéril dos veces y colocados en cajas de Petri con un medio de cultivo de malta/sal/agar, con una concentración de sal al 6 % (Tuite, 1969). Todo este procedimiento fue realizado en una cámara estéril (microvoid) para evitar contaminación; posteriormente fueron incubados durante ocho días a una temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Transcurrido ese tiempo, fueron contadas las colonias de hongos que aparecieron . Las colonias fueron aisladas y purificadas para su posterior identificación .

Identificación de Especies.

Para identificar las especies de los hongos aislados fueron hechas preparaciones microscópicas, para lo cuál una pequeña porción del cultivo fue colocado sobre un portaobjetos; en el caso de los géneros Aspergillus y Penicillium , se agregó una gota de alcohol al 70 % para que por fenómenos de

tensión superficial se separen los conidios de los esterignas y así se puedan ver estos últimos con mayor facilidad, después le fue adicionado una gota de un medio de montaje (lactofenol) colocándose posteriormente un cubre objetos. La identificación se llevo a cabo mediante el uso de las claves de Raper y Fennell, 1965 .

En el caso de Fusarium , Alternaria , Cladosporium y Penicillium fueron identificados hasta género siguiendo la clave de Barnett y Barry, 1972.

Producción de Aflatoxinas .

La técnica utilizada para la producción de aflatoxinas fue la descrita por Shotwell, et al., 1966 (modificada ligeramente). Que consiste básicamente en un proceso de fermentación , extracción y análisis químico.

Inóculo.

Se utilizaron 46 cepas de A. flavus aisladas y purificadas del maíz en estudio.

Incremento del Inóculo.

Para tener mayor cantidad de inóculo se utilizaron tubos de cultivo de (1.5 x 15 cm.) con el medio de cultivo inclinado (papa dextrosa agar). El medio fue preparado de la siguiente manera :

Matraz No. 1 :	Agua destilada _____	100 ml.
	Dextrosa _____	20 g.
	CaCO ₃ _____	0.2 g.
	MgSO ₄ 7 H ₂ O _____	0.2 g.

Matraz No. 2 :	Agua destilada _____	400 ml.
	Agar _____	15 g.
Matraz No. 3 :	Agua destilada _____	500 ml.
	Papas (peladas y rebanadas) _____	200 g.

El contenido del matraz No. 1 fue calentado a ebullición, el matraz No. 2 fue fundido y el matraz No. 3 fue introducido en un autoclave a una temperatura de 120°C y 15 libras de presión para hacer una infusión de papa, su contenido fue filtrado a través de 4 capas de manta de cielo, fue aforado al volumen original y por último se mezcló el contenido de los tres matraces. El medio de cultivo preparado de esta manera fue distribuido en los tubos de ensayo y estos últimos esterilizados en un autoclave a 120°C. y 15 libras de presión de quince a veinte minutos .

La técnica de siembra fue poniendo tres puntos en la superficie del agar y posteriormente fueron incubados durante siete días a una temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$.

Fermentación .

a) Sustrato.

Fueron colocados 150 g. de arroz pulido en matraces Erlenmeyer de 1000 ml. , se les agregó 75 ml. de agua destilada(25 ml./ 50 g. de sustrato), y fueron agitados continuamente durante 2 hrs. Después esterilizados a 120°C y 15 libras de presión por quince minutos, y se volvieron a agitar hasta su total enfriamiento .

b) Inoculación.

Fueron utilizados tres tubos de cada cepa de A. flavus de siete días de incubación y a cada uno se le agregaron 5 ml. de agua destilada estéril, la tensión superficial de la suspensión de esporas fue rota agregándole un poco de detergente y las esporas fueron removidas para separarlas del medio de cultivo; el contenido de los tres tubos se agregó a cada uno de los matraces quedando , así una concentración de 15 ml., de la suspensión de esporas por 150 g. de sustrato.

c) Fermentación .

El proceso de fermentación fue de 6 días a una temperatura de $\pm 30^{\circ}\text{C}$ y con agitación continua en un agitador (Wrist Action Shaker Model 75, Burrell Corporation), para evitar que los granos se aglutinen y formasen conglomerados (cada grano debe permanecer independiente durante el período de fermentación) .Posteriormente los matraces fueron colocados a temperaturas de 15 , 20 y 30°C ., por 24 hrs., al final de la fermentación los matraces fueron introducidos en un autoclave y esterilizados para destruir al hongo.

Extracción .

Después de la fermentación de cada una de las muestras, se separaron 25 g. a los cuales se les adicionaron 250 ml. de agua destilada y fueron molidos en una licuadora a prueba de explosión durante 5 min., después les fueron agregados 250 ml. de cloroformo(CHCl_3) y se volvió a moler otros 5 min. la mezcla fue centrifugada durante 15 min., a 3000 rpm. en una centrifuga marca (Sorvall RC.5 B Refrigerated Superspeed Centrifuge, Du Pont Instruments) y filtrada a través de 4 capas de manta de cielo a un matraz de separa-----

ción ; la capa de cloroformo fue tratada con 20 g. de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) para eliminar la mayor cantidad de agua. La suspensión de sulfato de sodio recogida en un embudo de Büchner y el filtrado fue reconcentrado al vacío en un evaporador rotatorio (Flash - Evaporator, Buchler Instruments), finalmente el residuo fue resuspendido en 10 ml. de cloroformo y se volvió a reconcentrar el extracto en viales de 20 ml. de capacidad, en baño de vapor en atmósfera de nitrógeno. Los extractos fueron conservados en el congelador para su posterior análisis .

Cromatografía en Capa Delgada .

Placa Preliminar .

Fueron utilizadas placas para cromatografía en capa fina , precubiertas Merck No. 5721. D.C. Fertigplantten Kieselgel 60 de 20 x 20 cm., con un espesor de 0.25 mm., activadas durante 60 min., a $\pm 103^\circ\text{C}$.

Los extractos fueron resuspendidos en $200\ \mu\text{l}$ de una solución de benceno (C_6H_6) / cloroformo (CHCl_3) 98/ 2, v/v , y agitados en agitador Vortex durante un minuto . Las manchas fueron hechas a una altura de 15 mm. sobre la placa de cromatografía con microjeringas : $10\ \mu\text{l}$ del extracto No. 1 en la primera mancha ; en la segunda mancha $10\ \mu\text{l}$ del extracto No. 1 más $5\ \mu\text{l}$ del patrón de aflatoxinas. Los extractos No. 2 y 3 fueron colocados de la misma manera , enseguida fueron hechas las manchas de los patrones de aflatoxinas en las siguientes concentraciones 3, 5 y $7\ \mu\text{l}$. Después en la misma placa fueron colocados los extractos No. 4,5 ,6 , 7 , de la misma forma que los extractos anteriores .

La placa fue colocada dentro de una cámara de cromatografía, en un sis-

tema de solventes éter (C_2H_5)₂ O / metanol (CH_3 OH) / agua destilada 96/3/1 , v/v/v. Se dejo correr el solvente aproximadamente durante 40 min., para separar los compuestos de los extractos, cuando estuvo seca fue revisada bajo luz ultravioleta a 365 nm. Todo este procedimiento fue realizado para cada uno de los 46 extractos .

Placa Cuantitativa.

Para los extractos positivos en las placas preliminares, fueron hechas placas cuantitativas .

Los extractos fueron colocados de la misma forma que en la placa preliminar ; sin embargo las concentraciones de las manchas fueron calculadas con base en la concentración de los extractos , comparando la intensidad de fluorescencia de los mismos , con la intensidad de fluorescencia de los patrones de aflatoxinas de concentración conocida de las placas preliminares. La cantidad de aflatoxina presente en los extractos fue determinada por comparación visual, contrastando la intensidad de fluorescencia de la mancha patrón en sus diferentes concentraciones con las diferentes concentraciones de los extractos .

Calculos.

La siguiente fórmula fue utilizada para determinar los microgramos de aflatoxina presentes por kilogramo de sustrato (AOAC. 1980).

$$\mu\text{g/Kg} = \frac{S \times Y \times V}{X \times W}$$

En donde :

S = μ l del patrón de aflatoxinas B-1 igual al problema.

Y = concentración del patrón .

V = μ l de la dilución final de la muestra.

X = μ l de la muestra que dan una intensidad de fluorescencia igual a S.

W = g. de la muestra aplicada .

RESULTADOS Y DISCUSION.

En la figura 1 se presenta el porcentaje de los granos invadidos por hongos , así como los géneros aislados y la proporción de los mismos en malta/sal/agar : Alternaria spp. 14 % , Fusarium spp. 72 % y Cladosporium spp. 2 % del grupo de los llamados hongos de campo. Aspergillus spp. 87 % y Penicillium spp. 63 % de los hongos de almacén .

Ha sido demostrado que la mayoría de las especies de hongos de almacén no invaden significativamente a los productos agrícolas antes de su cosecha (Tuite y Christensen ,1957). La presencia de Aspergillus en las proporciones encontradas nos hacen pensar en lotes de maíz mal almacenados; sin embargo la presencia de los Fusaria en proporciones tan altas sugiere que se trata de maíz recién cosechado por lo que inferimos que el grano analizado estaba mezclado, ya que las poblaciones de hongos de campo se van reduciendo con el tiempo de almacenamiento y en el caso particular de Fusarium, este hongo muere relativamente rápido en los granos almacenados (Christensen y Kaufmann, 1976).

El caso de Penicillium es particularmente interesante ya que algunas especies han sido aisladas de maíz en sus últimas etapas de formación en el campo (Mislivec y Tuite, 1970) y otras en granos después de periodos de almacenamiento.

El objetivo primordial de este estudio es conocer las especies de Aspergillus principalmente los del grupo A. flavus y su proporción contaminando el maíz que se consume en el Distrito Federal. En la figura 2 se presenta un histograma de frecuencia de los granos invadidos por especies de Aspergillus

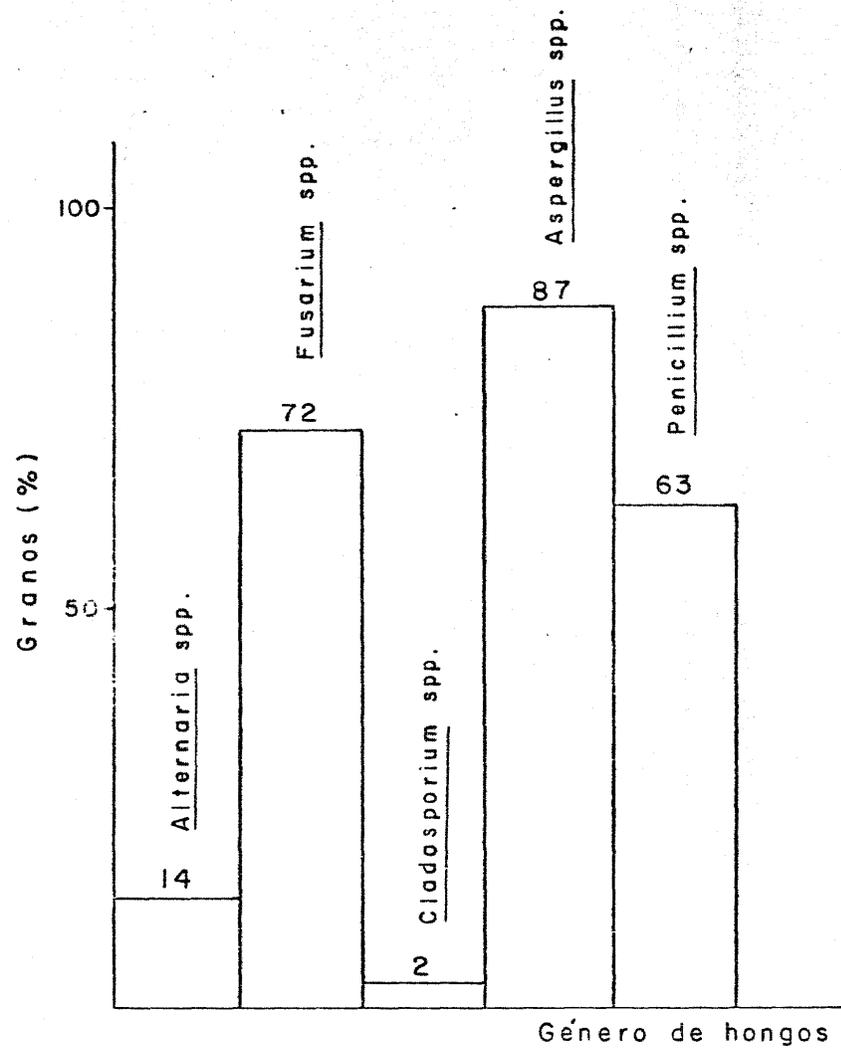


Figura 1. Porcentaje de Granos de Maíz Invasidos por Hongos.

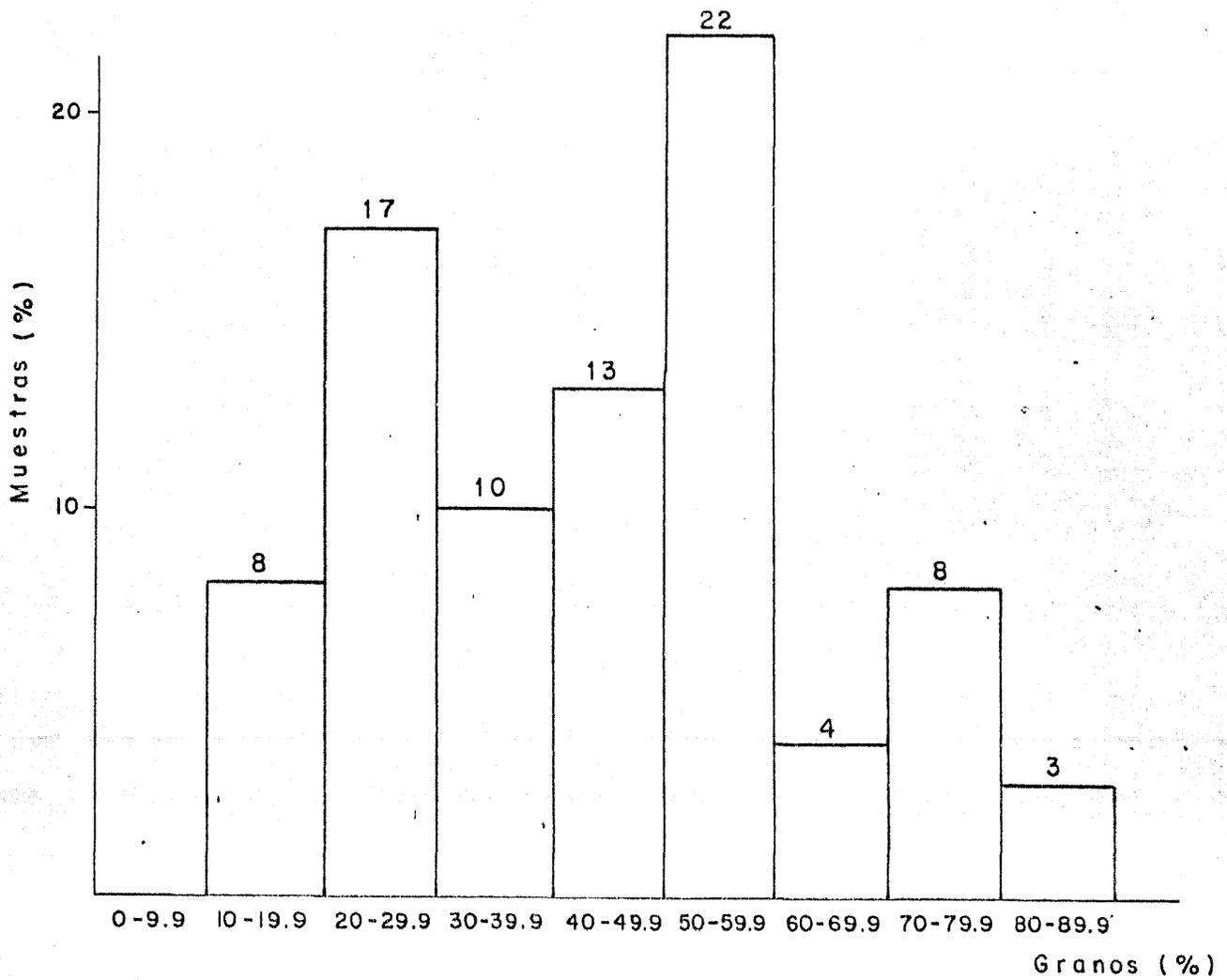


Figura 2. Granos Invadidos por Aspergillus en las Diferentes Muestras Analizadas.

en las diferentes muestras analizadas. No hubo muestras contaminadas con menos de 9.9 % de Aspergillus ; 8 % de las muestras tuvieron una contaminación de 10 - 19.9 % , en 17 % de las muestras 20 - 29.9 % de los granos estuvieron contaminados con Aspergillus , 30 - 39.9 % de los granos estuvieron invadidos en 10 % de las muestras, en 13 % de las muestras fue aislado 40- 49.9% de Aspergillus en los granos, 22 % de las muestras tuvieron una contaminación de 50 - 59.9 % , 60 - 69.9 % de los granos estuvieron invadidos en 4 % de las muestras , en 8 % de las mismas fue aislado 70 - 79.9 % y más del 80% de los granos invadidos por Aspergillus estuvieron en 3 % de las muestras.

Todas las especies reconocidas de Aspergillus han sido clasificadas en grupos de una o varias especies que tienen una serie de características básicas en común , cualidades que por lo general son esenciales y positivas para su identificación . Los grupos de Aspergillus a los que pertenecen las especies aisladas son : A. glaucus , A. ochraceus , A. niger , A. flavus y A. terreus.

El concepto de especie en Aspergillus es muy difícil de definir en términos tangibles, las cepas tipo cuando existen, sirven más como un patrón, para comparar una serie de cepas íntimamente relacionadas, que como un organismo único que en sí constituye una especie, por lo que resulta indispensable seleccionar varias cepas, que no solamente satisfagan las características de la descripción original si no que representen un rango de variabilidad reconocida dentro de la especie. Las especies identificadas (figura 3) fueron: dentro del grupo A. glaucus : A. repens De Bary en 72 % del total de los granos, A. ruber (König , Spieckermann & Bremer) Thom & Church en 57 % de los granos , A. chevalieri (Mangin) Thom & Church en 99 % de los granos

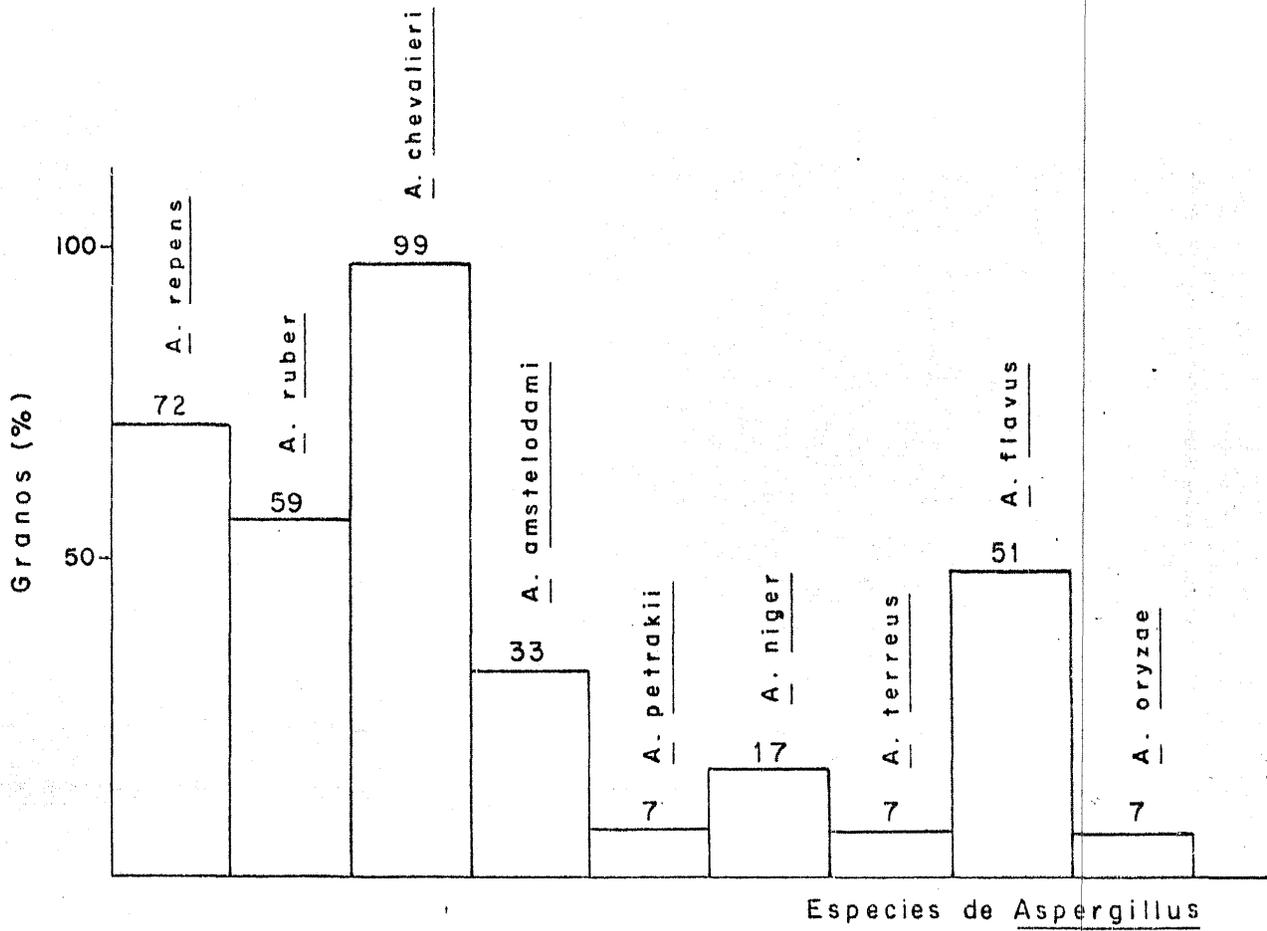


Figura 3. Porcentaje de Granos Invasidos por Especies del Genero Aspergillus.

y A. amstelodami (Margin) Thom & Church en 33 % del total de los granos. Este grupo ha sido reportado como uno de los que se encuentran con más frecuencia deteriorando granos almacenados (Christensen y Kaufmann, 1974).

El grupo A. ochraceus es uno de los grupos que tienen un mayor número de especies dentro del género Aspergillus, además algunas de sus especies producen compuestos tóxicos, llamadas ochratoxinas. De este grupo fue identificada una sola especie A. petrakii Vörös en 7 % del total de los granos.

El grupo A. niger es un grupo especialmente amplio por el número de especies que lo forman, solamente fue aislado A. niger V. Tiegh., en 17 % de los granos, es importante hacer notar que, a pesar de ser un grupo muy importante por el número de especies y las características de las mismas, algunas de las cuales son usadas en diferentes industrias, no es un hongo que se considere importante en el deterioro de los granos almacenados por que sus miembros no son aislados frecuentemente de maíz almacenado en humedades bajas, debido a que existe competencia con las especies del grupo A. glaucus.

El grupo A. terreus es muy pequeño, solamente tiene una especie y dos variedades (Raper y Fennell, 1965). Este grupo no es común en los granos, y es poco frecuente en maíz (Lichtwardt, et al., 1958); sin embargo de este grupo fue identificada la especie A. terreus Thom., en 7 % del total de los granos.

El grupo A. flavus resulta particularmente importante, ya que algunas cepas de varias de sus especies son capaces de producir aflatoxinas, sustancias altamente tóxicas, consideradas como los carcinógenos más potentes co-

nocidos a la fecha y ésta es la razón por la cuál las especies aisladas fueron inducidas para producir dichas substancias. Las especies aisladas fueron A. flavus. Link en 51 % del total de los granos y A. oryzae (Ahlb.) en 7 %.

En la figura 4 se presenta un histograma de frecuencia de los granos invadidos por el grupo Aspergillus flavus en las diferentes muestras examinadas. No hubo muestras contaminadas con menos del 9.9 % de A. flavus , 24 % de las muestras tuvieron una contaminación de 10 - 19.9 %; en 8 % de las muestras 20 - 29.9 % de los granos estuvieron contaminados; 30 - 39.9 % de los granos estuvieron invadidos en el 3 % de las muestras; 1 % de las muestras de 50 - 59.9 % de los granos estuvieron invadidos por A. flavus.

En un país cuya mayor parte de la población humana esta constituida por menores de 15 años y que además tienen niveles de desnutrición alta y cuya base de alimento es el maíz, la incidencia de A. flavus debe ser preocupante ya que algunas de sus cepas como ya ha sido mencionado son capaces de producir aflatoxinas, toxinas que ha sido demostrado son más peligrosas en animales jóvenes.

De las 46 cepas de A. flavus que fueron inducidas a producir aflatoxinas 30 (65 %) fueron capaces de producirlas, ver tabla I. Es bién sabido que la producción de aflatoxinas varía de cepa a cepa , así de las 30 cepas productoras 16 (53 %) produjeron los mencionados compuestos en cantidades detectables pero no cuantificables con el método utilizado y 14 (47 % produjeron aflatoxinas cuantificables, ver tabla II.

En la tabla III se presentan los resultados de la producción de aflatoxinas expresadas en mg / Kg por diferentes cepas de A. flavus . la cepa No. 1

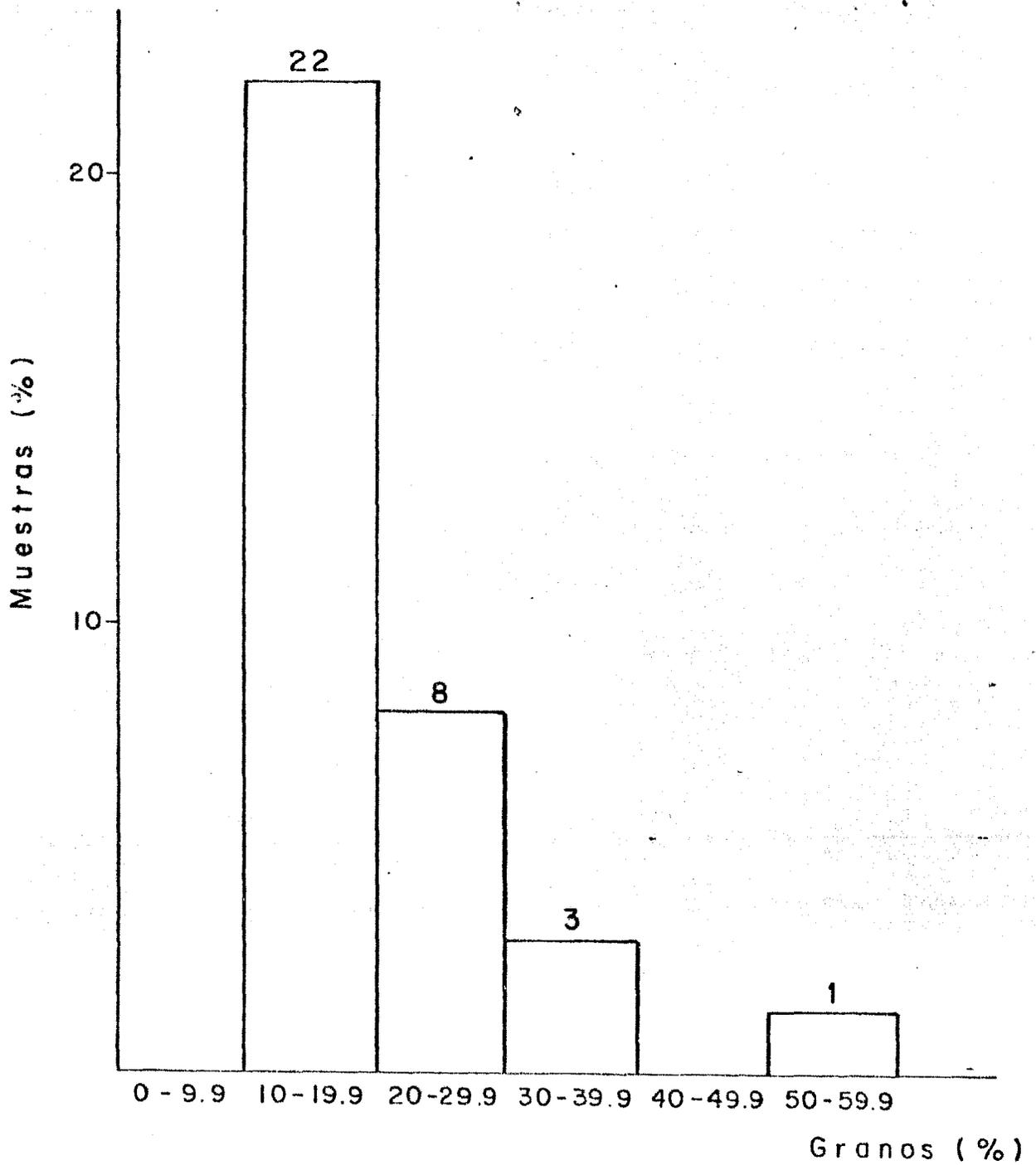


Figura 4. Granos Invadidos por el Grupo Aspergillus flavus en las Diferentes Muestras Analizadas.

TABLA I. PRODUCCION DE AFLATOXINAS POR CEPAS DE Aspergillus flavus Link, EN ARROZ.

NUMERO DE CEPAS	PRODUCCION DE AFLATOXINAS	
	POSITIVA	NEGATIVA
46	30	16
Total % 100	65	35

TABLA II. CEPAS DE Aspergillus flavus Link, PRODUCTORAS DE AFLATOXINAS.

NÚMERO DE CEPAS	PRODUCCION DE AFLATOXINAS	
	TRAZAS	CUANTIFICABLES
30	16	14
Total % 100	65	35

TABLA III. PRODUCCION DE AFLATOXINAS POR DIFERENTES
CEPAS DE Aspergillus flavus Link.

NUMERO DE CEPA	CLAVE	AFLATOXINAS (mg/Kg)
1	2-2-A	6.0
21	4-13-B-1	14.0
22	4-13-B-2	17.0
23	4-17-B	
24	4-21-A-1	4.0
25	4-21-A-2	8.0
26	4-23-A-1	4.0
31	5-4-A	8.0
33	5-7-A	7.0
34	5-7-B-1	1.0
37	5-13-B-2	20.0
41	5-23-A	
42	5-25-B	1.0
45	5-33-B	

Promedio de tres repeticiones.

tuvo una producción de 6 mg/Kg de aflatoxinas, la siguiente cepa, No. 21 alcanzó una producción de 14 mg/Kg, la cepa 22 produjo 17 mg/Kg, la cepa 24 logró una producción de 4 mg/Kg, la 25 tuvo una producción de 8 mg/Kg, la 26 produjo 4 mg/Kg de la mencionada toxina, la cepa 31 produjo 8 mg/Kg de aflatoxinas, la 33 alcanzó una producción de 7 mg/Kg, la cepa 34 produjo 1 mg/Kg, la cepa 37 tuvo una producción de 20 mg/Kg de aflatoxinas y la cepa 42 produjo 1 mg/Kg.

Tres extractos de cepas de A. flavus presentaron una intensidad de fluorescencia mucho mayor que la intensidad de fluorescencia del patrón de aflatoxinas, por lo tanto, para poder cuantificarlas fueron hechas diluciones 1/20 de cada uno de los extractos y se obtuvieron los siguientes resultados. La cepa 23 produjo mg/Kg, la siguiente cepa No. 41 alcanzó una producción de mg/Kg y la cepa 45 tuvo una producción de mg/kg de aflatoxinas.

CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos podemos concluir que el maíz consumido durante el verano de 1983 estaba altamente contaminado con hongos, 87% de Aspergillus , 72 % de Fusarium y 63 % de Penicillium , los tres géneros son capaces de producir micotoxinas; sin embargo no podemos hablar de las toxinas que producen Fusarium y Penicillium ya que nuestro interés era, durante el desarrollo del trabajo el problema potencial que representa Aspergillus flavus .

Con relación a Fusarium sugerimos estudios cuidadosos del género y de sus especies productoras de tricotecenos , compuestos a los que la comunidad científica ha prestado atención a últimas fechas y que pueden tener efectos en humanos, ya que otra toxina importante, la zearalenona es más un problema de alimentación animal que repercute indudablemente en la alimentación humana al reducir la cantidad de carne de cerdo , ya que esta toxina induce el síndrome estrógeno en el ganado porcino y hasta ahora no ha sido reportada como sospechosa de causar problemas en humanos y el maíz que estudiamos era para el consumo humano .

Nuestro interés se centró en el grupo Aspergillus flavus aislado en 58% del total de los granos estudiados, las dos especies aisladas A. flavus L. y A. oryzae han sido reportados como productoras de aflatoxinas, los resultados de la producción nos inducen a preocuparnos por las implicaciones sanitarias que estos representan; sin embargo tenemos razones teóricas para esperar que las tortillas no estén contaminadas; sin embargo éste tiene que ser probado y es mucho el esfuerzo que debe realizarse para llegar a obtener resultados concluyentes y estos esfuerzos no deben ser restringidos al material contaminado exclusivamente sino a evitar la contaminación .

LITERATURA CITADA .

- Anderson, W.H., E.W. Nehring y W.R. Wichser. 1975. Aflatoxin contamination of corn in the field. J. Agric. Food Chem. 23 : 775 - 782 .
- Anónimo , P.A.G. 1969. Recomendation on aflatoxin FAO./ WHO./ UNICEFPAG. Statement No. 2
- Anónimo. 1974 . Problems of aflatoxin in oil seeds and oil cakes: Summary and analysis of questionnaire replies. Food and Agriculture Organization , CCP. : O.F. 74 / 4 , Rome.
- Association of Official Analytical Chemists. 1980. Mycotoxins methodology; 13 Th^o ed. Publishing the Association of Official Analytical Chemists, Washington . 22 p.
- Barnett, H.L., y B.H. Barry. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi . 3 Th^o ed. Burgess Publishing Company , Minneapolis . 241 p.
- Boller, R.A., y H.W. Schroeder. 1974. Influence of temperature on production of aflatoxin in rice by Aspergillus parasiticus. Phytopathology . 64 : 283 - 286 .
- Butler, H.W. 1965. Liver injury and aflatoxin . In : Wogan , G.N. (Edr.). Mycotoxins in foodstuffs. Mass. Inst. Tech. Press, Cambridge . 175 - 186 pp.
- Chang, S.B., M.M. Abdel Kader, E.L. Wick y G. N. Wogan. 1963. Aflatoxin B₂: Chemical identity and biological activity. Science. 142 : 1191 - 1192 .
- Christensen, C.M., y H.H. Kaufmann. 1974. Microflora. In: Christensen, C.M. (Edr.). Storage of cereal grains and their products. American Association of Cereal Chemists, St. Paul.

- Christensen, C.M., H.H. Kaufmann. 1976. Contaminación por hongos en granos almacenados. Ed. Pax - México. 199 p.
- Codner, C.R., K. Sargeant y R. Yeo. 1963. Production of aflatoxin by the culture of strains of Aspergillus flavus - oryzae on sterilized peanuts. Biotechnol. Bioeng. 5 : 185 - 192.
- Council Directive of 17/12. 1973. On the fixing of maximum permitted level for undesirable substances in feedingstuff.
- Davis, D. N., U.L. Diener y D. W. Eldridge .1966. Production of aflatoxin B₁ y G₁ by Aspergillus flavus in a semisynthetic medium. Appl. Microbiol. 14 : 378 - 380.
- Diener, L.U. y N.D. Davis. 1969. Production of aflatoxin on peanuts under controlled environments. J. Stored Prod. Res. 5 : 251 - 258.
- Diener, L.U., y N.D. Davis. 1970. Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by Aspergillus flavus in stored peanuts. J. Am. Oil Chem. Soc. 47 : 347 - 351 .
- Diener, L.U. , R.L. Asquith, J.W. (Bill) Dickens. 1983. Aflatoxin and Aspergillus flavus in Corn. Published at department of Research Information Alabama Agricultural Experiment Station . Southern Cooperative Series Bulletin 279 . 112 p.
- FAO. 1978. Informe de la conferencia mixta FAO./ OMS./ PNUMA., sobre micotoxinas celebrada en Nairobi del 19 - 27 de septiembre de 1977. Roma, FAO.
- Fennell, I.D., E.B. Lillehoj y W.F. Kwolek. 1975. Aspergillus flavus and other fungi associated corn. Cereal Chem. 52 : 314 - 321.

- Frank , N. K. 1976. Überlegungen zur Hochmengen begren zung von Mykotoxi-
nen besonders von Aflatoxinen . In : Eguiazu, C. M. Mico--
toxinas en Maíz. Bolsa de comercio de Rosario, Argentina . p.
- Goldblatt, A.B.1968. Aflatoxin and its control. Economic Botany. 22 : 51 -
62 .
- Hara, S.D.I. Fennell y C.W. Hesseltine. 1974. Aflatoxin producing strains
of Aspergillus flavus detected by fluorescence of agar medium
under ultraviolet light. Appl. Microbiol. 27 : 1118 - 1123.
- Hesseltine,W.C., O.L. Shotwell,J.J. Ellis y R.D. Stubblefield. 1966. Afla-
toxin formation by Aspergillus flavus. Bacteriol. Rev. 30 : 795 -
805.
- Lancaster,C.M., F.P. Jenkins y J. Mcl. Philip.1961. Toxicity associated
with certain samples of groundnut. Nature . 192 : 1095 - 1096.
- Lichtwardt,W.R., G.L.Barron y L.H. Tiffany. 1958. Mold flora associated
with shelled corn in Iowa. Iowa State Coll. J. Sci. 33 : 1 - 11.
- Lillehoj,B.E.1983. Effect of environmental and cultural factors on aflato-
xin contamination of developing corn kernels. In : Diener, L.U.,
et al., (Edrs.). Aflatoxin and Aspergillus flavus in Corn. Pu--
blished at Department of Research Information Alabama Agricultu-
ral Experiment Station. Southern Cooperative Series Bulletin 279.
- Lin,M.T., y J.C. Dianese. 1976. Acconut agar medium for rapid detection of
aflatoxin production by Aspergillus spp. Phytopathology. 66 :
1466 - 1469 .
- López, C.L., y C.M. Christensen.1967. Effect of moisture of content and tem-
perature on invasion of stored corn by Aspergillus flavus. Phyto--
pathology . 57 : 588 - 590 .

- Madrid, H. M. De la. 1983. Primer informe de gobierno. Sector agropecuario y forestal . Estados Unidos Mexicanos ; Presidencia de la República , México D.F. 1 v.
- Mateles, I.R., y J.C. A dye. 1965. Production of aflatoxin in submerged culture. Appl. Microbiol. 13 : 208 - 211.
- Merwe, K.J., Van Der, L. Fourie y De B. Scott. 1963. On the structure of the aflatoxins. Chem. Ind. 1963 : 1660 - 1661.
- Mislivec, B.P. y J. Tuite. 1970. Species of Penicillium occurring in freshly harvested and in stored dent corn kernels. Mycologia. 62 67 - 74 .
- Newberne, P.M., W.W. Carlton y G.N. Wogan. 1964. Hepatomas in rats and hepatorenal injury in ducklings fed peanut meal of Aspergillus flavus extract. Path. Vet. 1 : 105 - 132.
- Rabie, C.J. y E.B. Smalley . 1965 . Influence of temperature on the production of aflatoxin by Aspergillus flavus . Symposium on Micotoxin in Foodstuffs , Sess. 2; Agr. Aspects, Dept. Agr. Tech. Serv. , Pretoria.
- Rambo, W.G., J. Tuite y R.W. Caldwell. 1974. Aspergillus flavus and aflatoxin in preharvest corn from Indiana in 1971 and 1972. Cereal Chem. 51 : 848 - 853 .
- Raper, K.B. y D. I. Fennell. 1965. The genus Aspergillus. Williams and Wilkins, Baltimore. 686 p.
- Reddy , V.T., L. Viswanathan y T.A. Venkitasubramanian. 1971. High aflatoxin production on a chemically defined medium. Appl. Microbiol. 22 : 393 - 396 .
- Sauer , D.B. y R. Burroughs. 1980. Fungal growth aflatoxin production and moisture equilibration in mixtures of wet and dry corn. Phytopa-

thology. 70: 516-521.

Sargeant, K., A. Sheridan, J. O'Kelly y R.B.A. Camaghan. 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. Nature. 192: 1096-1097.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1983. Información estadística del sector agrícola. S.A.R.H. México, D.F.

Schindler, F.A., J.G. Palmer y W.V. Eisenberg. 1967. Aflatoxin production by Aspergillus flavus as related to various temperatures. Appl. Microbiol. 15: 1006-1009.

Schindler, F.A. 1977. Temperature limits for production of aflatoxin by twenty - five isolates of Aspergillus flavus and A. parasiticus. In : Diener, L.U., et al., (Edrs.). Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn. Published at Department of Research Information Alabama Agricultural Experiment Station. Southern Cooperative Series Bulletin 279. 112 p.

Schroeder, W.H. y H. Hein Jr. 1967. Aflatoxin production of the toxins in vitro in relation to temperatures. Appl. Microbiol. 15 : 441 - 445.

Shotwell, L.O., C.W. Hesseltine, R.D. Stubblefiel y W.G. Sorenson. 1966. Production of aflatoxin on rice. Appl. Microbiol. 14: 425 - 428.

Sorenson, G.W., C.W. Hesseltine y O.L. Shotwell. 1966. Effect of temperature on production of aflatoxin on rice by Aspergillus flavus. Mycopathol. Mycol. Appl. 33 : 49 - 55.

Spensley, P.C. 1963. Aflatoxin, the active principle in turkey " X " disease. Endeavor. 22 : 75 - 79.

- Tuite, J. y C.M. Christensen. 1957. Grain Storage studies XXIII. Time of invasion of wheat seed by various species of Aspergillus responsible for deterioration of stored grain, and source of inoculum of these fungi. Phytopathology. 47 : 265 - 268.
- Tuite, J. 1969. Plant pathological methods Fungi and bacteria, Burgess Publishing Company, Minneapolis. 750 p.
- Vogel, P. 1965. A rapid screening test for aflatoxin synthesizing Aspergilli of the flavus oryzae group. Appl. Bact. 28 : 213 - 220.
- West, S., R.D. Wyatt y P.B. Hamilton. 1973. Improved yield of aflatoxin by incremental increases of temperature. Appl. Microbiol. 25 : 1018 - 1019.
- Zuber, M.S. y E.B. Lillehoj. 1979. Status of the aflatoxin in corn. J. Environ. Qual. 8 : 1 - 5.