



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

CONFRONTACIÓN DE DIDERENTES MEDIOS DE  
CULTIVO PARA RECONOCER CEPAS DE  
*Aspergillus flavus* PRODUCTORAS DE  
AFLATOXINAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

IENNY RAMÍREZ GÓMEZ



TUTORA:

Dra. GENOVEVA GARCÍA AGUIRRE

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

FACULTAD DE CIENCIAS

División de Estudios Profesionales



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
**P r e s e n t e .**

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**"Confrontación de diferentes medios de cultivo para reconocer cepas de *Aspergillus flavus* productoras de aflatoxinas"**

realizado por **Ramírez Gómez Ienny**, con número de cuenta **091339140** quien opta por titularse en la opción de **Tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario	Dr.	Teófilo Herrera Suárez	<i>T Herrera</i>
Propietario	Dra.	Patricia Esther Lappe Oliveras	<i>Patricia Lappe O.</i>
Tutor(a) Propietario	Dra.	Genoveva García Aguirre	<i>Genoveva Garcia A.</i>
Suplente	M. en C.	Rebeca Martínez Flores	<i>Rebeca Martinez Flores</i>
Suplente	M. en C.	María Cristina Julia Pérez Reyes	<i>María Cristina Julia Pérez Reyes</i>

FACULTAD DE CIENCIAS

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, D. F., a 26 de noviembre del 2007  
EL COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGÍA

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias que me permitieron adquirir conocimiento y ser una profesionista comprometida con la sociedad.**

**Al Instituto de Biología (UNAM), por todo el apoyo académico y de sus instalaciones.**

**A la Dra. Genoveva García Aguirre por su valiosa labor en la dirección, revisión de esta tesis y la enseñanza en el laboratorio de Micotoxinas.**

**A la M. en C. Rebeca Martínez Flores por ser la profesional que me enseñó la dinámica del laboratorio en todo sentido y sobre todo por su amistad incondicional.**

**A la M. en C. Cristina Pérez Reyes por haber sido mi guía en la materia de botánica II y todos los comentarios en la revisión de este trabajo.**

**Al Dr. Teófilo Herrera Suárez por el tiempo que me concedió al revisar esta tesis y por ser un hombre humilde de gran sabiduría.**

**A la Dra. Patricia Lappe Oliveras por sus comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo.**

**A la Dra. Rosa Helena Manzanilla López por la oportunidad de colaborar en el laboratorio de Nematología.**

**A la M. en C. María Eugenia Muñiz Díaz de León por su incansable dedicación a la docencia.**

**Al personal que labora en la Facultad de Ciencias y a los pumas por las facilidades brindadas.**

## **DEDICATORIAS**

**A mi máma:**

**Guadalupe, con cariño y admiración por ser una gran mujer, quien me inculco el pensamiento de superación, todos estos logros llevan tu esencia.**

**A mi hermana:**

**Nelly, con gratitud por compartir familia y conocimiento, a su esposo Manuel y mis sobrinos Jalil Esmeralda y Johann Manuel por todos los momentos de convivencia.**

**A mi esposo:**

**Jorge, con sentimiento y respeto por comenzar esta gran aventura de vida y ser energía de perseverancia.**

**A mis Amigos:**

**Itzel, con amistad incondicional por tu contribución desinteresada en el apoyo del idioma.**

**Beto, con amistad incondicional por tus sabios consejos durante y después de la carrera.**

**Claudia y Lolita, con amistad incondicional por todos los momentos en la universidad.**

## ÍNDICE

Introducción	1
Materiales y Métodos	7
Resultados y Discusión	19
Conclusiones	27
Literatura Citada	29

## INTRODUCCIÓN

El género *Aspergillus* está constituido por unas 180 especies reconocidas (Pitt *et al.*, 2000), distribuidas en 18 grupos según Raper y Fennell (1965) y más recientemente en siete subgéneros Klich (2002). *Aspergillus flavus* es importante en el deterioro de granos y semillas almacenados, afectando su calidad física, biológica y nutricional, así como en la producción de metabolitos secundarios tóxicos como las aflatoxinas (Martínez-Flores, 1984).

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios producidos por algunas cepas de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*. *Aspergillus flavus* produce aflatoxinas B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> mientras que *A. parasiticus* produce B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> (Davis y Diener, 1983; Kurtzman *et al.*, 1987), son comunes en productos con altos contenidos de grasas como cacahuates, pistaches, almendras, diferentes tipos de nueces, semilla de algodón, copra y cereales como maíz, sorgo y mijo (Kozakiewicz, 1994; Smith, 1997).

Las aflatoxinas son sustancias cancerígenas, mutágenas, teratógenas e inmunosupresoras en la mayoría de las especies animales. Quizá la mayor importancia para la salud humana sean sus efectos inmunosupresores, ya

sea solas o asociadas con otras micotoxinas (Allcroft y Carnaghan, 1963; Council for Agricultural Science and Technology, 1989).

Los factores que influyen en la formación de aflatoxinas por *A. flavus* y *A. parasiticus* son parecidas para ambas especies, ya que las dos tienen patrones de crecimiento similares. Las dos crecen a temperaturas comprendidas entre 10 a 12° y 42 a 43° C, estando la óptima entre los 32 a 33°C (Ayerst, 1969) y producen aflatoxinas entre los 12 y 40°C (Diener y Davis, 1967; Koehler, *et al.*, 1986; Northolt *et al.*, 1977). La actividad de agua ( $a_w$ ) óptima para el crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* está cercano a 0.99, habiéndose señalado mínimos de 0.80 (Ayerst, 1969) a 0.82 o 0.83 (Northold, *et al.*, 1977; Pitt y Miscamble, 1995). Las aflatoxinas se producen generalmente en grandes cantidades cuando los valores de  $a_w$  son de 0.98 a 0.99, cesando la producción aparentemente en una  $a_w$  cercana a 0.85 (Diener y Davis, 1967; Koehler, *et al.*, 1986; Northolt *et al.*, 1977). Aunque el crecimiento puede tener lugar en un pH que va desde ligeramente por arriba de 2.0 hasta 10.5 en *A. parasiticus* y de 11.2 para *A. flavus* (Wheeler, *et al.*, 1991), se ha señalado que la producción de aflatoxinas por *A. parasiticus* sólo ocurre entre valores de pH de 3.0 a 8.0 con un óptimo cerca de 6.0 (Buchanan y Ayres, 1976).

Debido a la importancia de las aflatoxinas, los métodos utilizados para su análisis son muy numerosos. Existen los cualitativos que sólo muestran la presencia de las aflatoxinas, los cuantitativos y los confirmatorios. Desde mediados de 1960 se pretendió modificar algunos de los medios de cultivo empleados para hacer crecer a *A. flavus* con diferentes objetivos de estudio, para ser utilizados como métodos rápidos para la detección de aflatoxinas.

En 1974 Hara *et al.*, modificaron el medio de Czapek agar (CzA), eliminaron el nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) como fuente de nitrógeno y adicionaron agua de remojo de maíz,  $\text{HgCl}_2$  y  $(\text{NH}_4) \text{H}_2\text{PO}_4$ . Czapek agar modificado (CzAM) propusieron utilizar este medio para detectar cepas de *A. flavus* productoras de aflatoxinas. Las placas con colonias bien desarrolladas se expusieron a luz ultravioleta (UV) para observar la fluorescencia de las aflatoxinas, cuya presencia se confirmó por cromatografía de capa fina del agar que rodeaba a las colonias que mostraban fluorescencia con la luz UV.

Davis *et al.* (1987) emplearon un medio de cultivo con extracto de coco agar (ExCA) para detectar colonias de *A. flavus* y *A. parasiticus* productoras de aflatoxinas, observando bajo luz UV de onda larga (365 nm) una fluorescencia azul en el reverso de las placas después de 2 a 5 días

de incubación. La presencia de las aflatoxinas fue verificada por medio del análisis químico.

Pallavi *et al.*, (1997) utilizaron tubos, con el medio de cultivo inclinado, de leche coco agar (LCA), incubados a 28°C para identificar cepas toxígenas de *Aspergillus*. Para observar la fluorescencia de las aflatoxinas expusieron los tubos a luz UV (365 nm) y detectaron una fluorescencia azul al reverso de los tubos, la que se presentó a partir de las 36 y 48 hrs de incubación. El pico máximo de fluorescencia se observó a los 7 días.

En 1999 Saito y Machida, utilizaron los medios de cultivo generales: papa dextrosa agar (PDA), extracto de coco agar (ExCA) y extracto de levadura sacarosa agar (ELSA) reconocidos como adecuados para el crecimiento de *Aspergillus*, para distinguir cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* productoras de aflatoxinas. Después de 2 días de incubación a 25°C los cultivos fueron expuestos a vapores de hidróxido de amonio y observaron que el reverso de las colonias se tornaba de color de rosa. El cambio de color se manifestó en el momento en que los vapores de hidróxido de amonio se pusieron en contacto con la colonia.

Otros autores han propuesto el uso de ciclodextrinas para incrementar la fluorescencia característica de las aflatoxinas durante el análisis (Vázquez *et al.*, 1991).

En 2001 Fente *et al.*, desarrollaron un método que consiste en la adición de un derivado metilado de  $\beta$  ciclodextrina a medios de cultivo comunes: ELSA, CzAM y CzA para mejorar la fluorescencia natural de las aflatoxinas. La producción de aflatoxinas coincidió con la presencia de una fluorescencia azul brillante o azul verdosa, alrededor de las colonias, cuando fueron observadas bajo luz UV de onda larga (365 nm) después de 3 días de incubación a 28°C. La presencia de aflatoxinas fue confirmada por medio de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con detección de fluorescencia.

Jaimez Ordaz *et al.*, (2003) reportaron un método para seleccionar cepas de *A. flavus* productoras de aflatoxinas. Las cepas fueron cultivadas en ELSA adicionado con metil- $\beta$ -ciclodextrina (me- $\beta$ -cd) y desoxicolato de sodio. La producción de aflatoxinas fue detectada por visualización directa de un anillo beige alrededor de las colonias, después de tres días de incubación a 28°C. Cuando el anillo fue examinado bajo luz UV, se observó una fluorescencia azul. La presencia de aflatoxinas fue confirmada por HPLC con detector de fluorescencia.

Con base en lo anterior, las aflatoxinas pueden detectarse en medios de cultivo desarrollados específicamente con este propósito o algunos usados comúnmente, modificados por la adición de diferentes sustancias en diferentes condiciones de cultivo de los hongos productores.

El presente trabajo pretende evaluar algunos medios de cultivo adicionando metil- $\beta$ -ciclodextrina y vapores de hidróxido de amonio para detectar aislamientos de *Aspergillus flavus* productores de aflatoxinas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Cepas de *Aspergillus flavus***

Treinta y dos cepas de *Aspergillus flavus* (Tox-023-018-11-A-9, Tox-023-018-11-K-9, Tox-023-018-11-K-10, Tox-023-018-11-R-1, Tox-024-001-16-A-7, Tox-024-001-16-B-4, Tox-024-001-16-D-18, Tox-024-16-E-2, Tox-024-001-16-K-17, Tox-024-001-16-L-20, Tox-024-001-N-12, Tox-024-001-16-Q-17, Tox-024-001-20-K-16, Tox-024-001-23-P-19, Tox-024-001-23-R-1, Tox-027-001-01-P-16, Tox-027-001-03-A-20, Tox-027-001-03-D-13, Tox-027-001-03-H-1, Tox-027-001-03-L-16, Tox-027-001-03-N-18, Mic-029-002-23-C-27, Mic-029-002-26-E-7, Tox-023-018-10-E-14, Tox-023-018-10-J-1, Tox-023-018-10-K-13, Tox-023-018-10-R-18, Tox-024-001-16-J-17, Tox-024-001-25-A-9, Tox-027-001-01-O-14, Tox-027-001-02-G-15 y Tox-027-001-03-E-11) aisladas de granos de maíz y conservadas en tubos con CzA en el laboratorio C-120 del Instituto de Biología fueron resembradas por triplicado en cajas de Petri con PDA e incubadas por 7 días a 25° C.

## **Selección de cepas de *Aspergillus flavus* productoras de aflatoxinas**

Para seleccionar las cepas productoras de aflatoxinas, las 32 cepas elegidas fueron sembradas por triplicado, en placas de extracto de levadura sacarosa agar adicionado con metil- $\beta$ -ciclodextrina (ELSA + me- $\beta$ -cd), reportado por Fente *et al.*, 2001 como un medio confiable para la identificación rápida de cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* productoras de aflatoxinas, e incubadas de 3 a 4 días a 28°C. Después del periodo de incubación, los cultivos fueron observados con luz negra de onda larga (365 nm) usando una lámpara Blak-Ray (Modelo B-100 A), para detectar un halo azul fluorescente que según Fente y colaboradores, presentarían las cepas productoras de aflatoxinas.

Debido a que con esta metodología no se observaron los resultados esperados en las 32 cepas analizadas, estas se dejaron crecer hasta los 7 días. De las 32 cepas se seleccionaron al azar diecisiete: Tox-027-001-03-D-13, Tox-027-001-03-A-20, Tox-024-001-016-A-7, Tox-027-001-01-P-16, Tox-027-001-03-H-1, Tox-023-018-11-K-9, Tox-027-001-03-L-16, Mic-029-002026-E-7, Tox-024-001-16-L-20, Tox-024-001-25-A-9, Tox-024-001-16-N-12, Mic-029-002-023-C-27, Tox-023-018-11-R-1, Tox-024-001-23-R-1, Tox-023-018-10-J-1, Tox-023-018-10-R-18 y Tox-027-001-02-G-15 que fueron analizadas siguiendo un método analítico.

## **Método analítico**

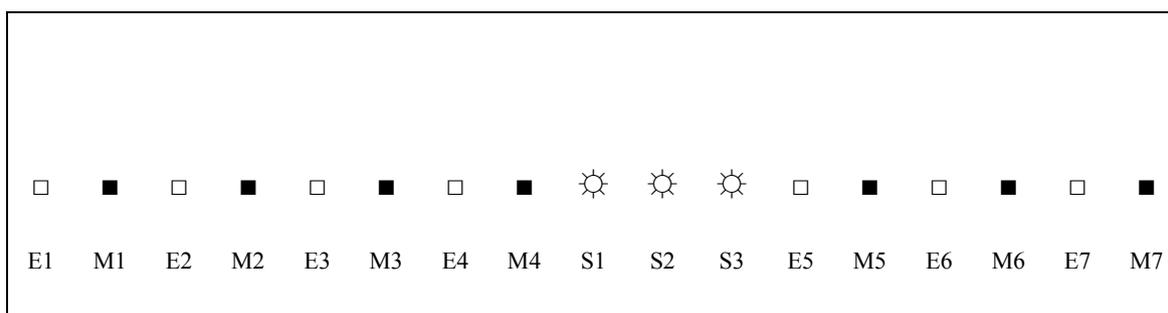
### **Extracción**

Todo el contenido (medio de cultivo, micelio y otras estructuras) previamente esterilizado de las tres cajas de cada una de las cepas de *A. flavus* seleccionadas, fue colocado en el vaso de una licuadora manual (Moulinex, spiraglio Modelo DG1/DG3/DG4), se le agregaron 20 ml de cloroformo y se mezcló durante 1 min, el extracto fue filtrado en papel Wathman Núm. 1 de 20 cm de diámetro. El filtrado fue usado para hacer la placa preliminar de una cromatografía de capa fina. El extracto de cada muestra se agitó durante 1 min en un agitador mecánico (Super-Mixer, Lab-Line Instruments, Inc., No.Cat. 1290).

### **Placa preliminar**

En una placa de aluminio de 20 x 20 cm precubierta con silicagel 60 (sin indicador fluorescente) y con un espesor de 0.2 mm (Merck art. 5553) se colocaron 2 manchas de 10  $\mu$ l del extracto a una distancia de 2 cm del borde inferior y sobre una de las manchas del extracto se colocó una mancha de 5  $\mu$ l del estándar de aflatoxina B<sub>1</sub>, con una concentración de 1  $\mu$ g/ml (Sigma A 6636) como patrón interno. En la misma placa se colocaron manchas de 5, 7, 9  $\mu$ l del estándar de aflatoxinas para hacer las comparaciones necesarias. En cada placa se aplicaron 7 muestras como se indica en la siguiente figura:

Fig. Distribución de las manchas de los extractos en la placa preliminar.



- E = extracto, 10µl
- M = mezcla ( extracto, 10µl más estándar, 5µl)
- S1 = estándar, 5µl
- S2 = estándar, 7µl
- S3 = estándar, 9µl

La placa se dejó correr en una cámara con cloroformo/acetona 90/10 v/v no saturada y no estabilizada durante aproximadamente 40 min, hasta que el frente del solvente llegó a unos 2 cm del tope superior de la placa. La placa seca se observó en una cámara de luz ultravioleta de onda larga 360 nm (Chromato-Vue Modelo CC-20), identificando las aflatoxinas como manchas azul verdosas fluorescente, usando como referencia las manchas de los patrones.

### **Prueba confirmatoria**

### **Formación de derivados en las placas de cromatografía de capa fina**

Para confirmar la presencia de aflatoxinas, las manchas determinadas como aflatoxinas en la placa, fueron asperjadas con una solución de ácido

sulfúrico/agua destilada 1/3 v/v. Con este tratamiento las manchas de aflatoxinas cambiaron de color azul verdoso fluorescente a amarillo al observar la placa bajo luz UV de onda larga. Si la mancha analizada no presentó este cambio de color no se consideró aflatoxinas (AOAC, 2000).

Con este método fueron seleccionadas las siguientes cepas: Tox-023-001-16-A-7, Tox-023-018-11-K-9, Tox-024-001-25-A-9, Tox-027-001-02-G-15 con las que se continuó el trabajo. Como testigo se empleó la cepa Mic-029-002-026-E-7 no productora de aflatoxinas.

Con el fin de facilitar el manejo de las claves de las cepas de *A. flavus* en el resto del trabajo, éstas se redujeron como a continuación se indica:

Clave completa	Clave usada
Tox-023-001-16-A-7	A7
Tox-023-018-11-K-9	K9
Tox-024-001-25-A-9	A9
Tox-027-001-02-G-15	G15
Mic-029-002-026-E-7*	E7

\* cepa no productora de aflatoxinas

## Medios de cultivo

Los medios de cultivo usados fueron: Solución de Czapek agar modificado (CzAM), Czapek agar (CzA), Sabouraud dextrosa agar (SDA), Czapek extracto de levadura agar (CzELA), Extracto de malta agar (EMA), Glicerina 25% nitrato agar (25GNA), Leche coco agar (LCA), Extracto de coco agar (ExCA), Extracto de levadura sacarosa agar (ELSA) y Papa dextrosa agar (PDA).

## Preparación de medios de cultivo

### Solución de Czapek agar modificado (CzAM) Hara *et al.* (1974)

Sacarosa	30 g
Fe SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
KCl	0.5 g
(NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10 g
HgCl <sub>2</sub>	0.068 g
Licor de maíz	0.5 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

Ajustar a pH= 5.5 con NaOH 1N antes de agregar el agar.

**Czapek agar (CzA) Saito y Machida (1999)**

NaNO <sub>3</sub>	3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 g
KCl	0.5 g
Fe SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
Sacarosa	30 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

**Sabouraud dextrosa agar (SDA) Tuite (1969)**

Neopeptona	10 g
Dextrosa	40 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

**Czapek extracto de levadura agar (CzELA) Pitt (1979)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
*Concentrado de Czapek	10 ml
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	30 g

Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

**Glicerina 25% nitrato agar (25GNA) Pitt (1979)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.75 g
*Concentrado de Czapek	7.5 ml
Extracto de levadura	3.7 g
Glicerina grado analítico	250 ml
Agar	12 g
Agua destilada	750 ml

**\*Concentrado de Czapek Pitt (1979)**

NaNO <sub>3</sub>	30g
KCl	5g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	5 g
Fe SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.1 g
Agua destilada	100 ml

**Extracto de malta agar (EMA) Pitt (1979)**

Extracto de malta	20 g
Peptona	1 g

Dextrosa	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1000 ml

**Leche coco agar (LCA) Pallavi *et al.* (1997)**

**Extracto de coco	1000 ml
Agar	15 g
Peptona	0.1 g
Leche semidescremada	10 ml
NaNO <sub>3</sub>	6 g
Triton X-100	0.1 g

Ajustar a pH= 6 antes de agregar el agar.

**Extracto de coco agar (ExCA) Davis *et al.* (1987)**

**Extracto de coco	1000 ml
Agar	15 g

Ajustar a pH= 7 con NaOH 2N antes de agregar el agar.

**\*\*Extracto de coco**

Coco rayado (200 g) fue homogeneizado por 5 min en 1000 ml de agua destilada en ebullición, el homogeneizado se filtró a través de 4 capas de manta de cielo y fue aforado a 1000 ml.

### **Extracto de levadura sacarosa agar (ELSA) Saito y Machido (1999)**

Extracto de levadura	20 g
Sacarosa	200 g
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml

### **Papa dextrosa agar (PDA) Tuite (1969)**

***Extracto de papa	1000 ml
Dextrosa	20 g
Agar	15 g

#### **\*\*\*Extracto de papa**

200 g de papas peladas y cortadas en cubos, son colocadas en 1000 ml agua destilada fría, se lleva a ebullición durante 10 min. Se retira del fuego, se deja enfriar y se filtra a través de 4 capas de manta de cielo. Las papas hervidas se exprimen y la mezcla se afora a 1000 ml.

Todos los medios fueron esterilizados a 120°C/15 libras, durante 15 minutos.

## Tratamientos

1) Adición de metil  $\beta$ -ciclodextrina. A cada uno de los medios de cultivo se les agregaron 3g/l de metil- $\beta$ -ciclodextrina (me- $\beta$ -cd) antes de esterilizarlos Fente *et al.* (2001) y Jaimez Ordaz *et al.*(2003).

Las cinco cepas de *Aspergillus flavus* seleccionadas por el análisis químico se sembraron por triplicado en cada uno de los medios de cultivo en un punto central de la caja de Petri y se incubaron por 4 días a 28° C en la oscuridad.

Los cultivos fueron observados por el reverso con una lámpara de luz negra de onda larga (365 nm), para determinar la presencia de un halo azul fluorescente, que indicaría la presencia de aflatoxinas.

Como base en los resultados de las pruebas anteriores se volvieron a sembrar, en un solo punto central todas las cepas de *A. flavus* en los medios en los que se observó alguna intensidad de fluorescencia; estos fueron CzAM, ExCA, LCA y ELSA sin y con metil  $\beta$ -ciclodextrina.

Análisis estadístico. Además de la fluorescencia se midió el diámetro de las colonias, se les realizó un análisis de varianza (Little y Hills, 1976) y contraste de medias siguiendo el método Duncan (Steel y Torrie, 1980).

Con base en los resultados del experimento anterior, se seleccionaron las cepas cuya fluorescencia fue más intensa en los medios antes mencionados. Las cepas seleccionadas fueron: A9 y G15.

2) Efecto de vapor de amonio. Consistió en depositar 5 gotas de hidróxido de amonio en el interior de la tapa de la caja de Petri en la que crecía *A. flavus*, esta caja se mantuvo invertida durante el procedimiento. La presencia de una pigmentación de color rosa al exponerse la colonia al vapor de hidróxido de amonio fue buscada desde el reverso de la placa. La presencia de esta pigmentación indicaría sí la cepa era productora de aflatoxinas.

Este procedimiento se realizó en todos los medios de cultivo con y sin metil  $\beta$ -ciclodextrina.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con relación a la adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina (me- $\beta$ -cd) para mejorar la fluorescencia natural de las aflatoxinas, en la tabla 1 se observan los resultados del experimento; según estos las cepas de *A. flavus* usadas aparentemente no produjeron aflatoxinas en la mayoría de los medios de cultivo a los que se les adicionó o no me- $\beta$ -cd con este proposito.

Tabla 1. Intensidad de la fluorescencia de las aflatoxinas producidas por cinco cepas de *A. flavus* en diez medios de cultivo sin y con metil- $\beta$ -ciclodextrina.

Cepas	Fluorescencia									
	A7		K9		A9		G15		E7	
Medio de cultivo	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd
CzAM	NF	+	NF	+	NF	+	++	++	NF	NF
CzA	NF									
CzELA	NF	+	NF	NF						
SDA	NF									
25GNA	NF									
EMA	NF									
LCA	NF	+	NF	NF	NF	+	+	++	NF	NF
ExCA	NF	NF	NF	+	NF	+	+	+	NF	NF
ELSA	NF	+	NF	+	NF	+	+	++	NF	NF
PDA	NF	+	NF	NF						

+ Fluorescencia, ++ Fluorescencia x 2, NF No fluorescencia

En aquellos medios en los que se produjeron aflatoxinas, la intensidad de su fluorescencia bajo luz UV fue intensificada. En otros, en ausencia de me- $\beta$ -cd no se observó la fluorescencia de las aflatoxinas, pero

cuando se les adicionó me- $\beta$ -cd esta fluorescencia pudo ser vista; es el caso de la cepa A7 creciendo en CzAM+me- $\beta$ -cd, LCA+me- $\beta$ -cd y ELSA+me- $\beta$ -cd; cepa K9 creciendo en CzAM+me- $\beta$ -cd, ExCA+me- $\beta$ -cd y ELSA+me- $\beta$ -cd; cepa A9 creciendo en CzAM+me- $\beta$ -cd, LCA+me- $\beta$ -cd, ExCA+me- $\beta$ -cd y ELSA+me- $\beta$ -cd. En el caso de la cepa G15 se observó fluorescencia sin me- $\beta$ -cd en CzAM, LCA, ExCA y ELSA cuando a estos medios se les adicionó me- $\beta$ -cd, en los casos de CzAM, LCA y ELSA la fluorescencia se intensificó. En ExCA permaneció igual y en CzELA y PDA se observó fluorescencia que no se observó en ausencia de me- $\beta$ -cd.

Tabla 2. Intensidad de la fluorescencia de las aflatoxinas producidas por cinco cepas de *A. flavus* en cuatro medios de cultivo sin y con metil- $\beta$ -ciclodextrina.

Cepas	Fluorescencia									
	A7		K9		A9		G15		E7	
Medio de cultivo	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd
CzAM	NF	+	NF	+	+	++	+	++	NF	NF
LCA	NF	+	NF	NF	NF	+	NF	++	NF	NF
ExCA	NF	NF	NF	+	NF	NF	NF	+	NF	NF
ELSA	NF	+	NF	+	NF	++	+	++	NF	NF

+ Fluorescencia, ++ Fluorescencia x 2, NF No fluorescencia

Por lo anterior se seleccionaron los medios CzAM, LCA, ExCA y ELSA y se repitió el experimento para confirmar los resultados obtenidos. Los resultados en este experimento son iguales a los del anterior para las cepas A7 y K9 en los cuatro medios usados. Se observan diferencias

menores que pueden ser atribuidas a la falta de cuantificación de las intensidades, ya que las observaciones fueron hechas por comparación visual (Tabla 2).

Tabla 3. Intensidad de la fluorescencia de las aflatoxinas producidas por dos cepas de *A. flavus* en cuatro medios de cultivo sin y con metil- $\beta$ -ciclodextrina.

Cepas	Fluorescencia			
	A9		G15	
Medio de cultivo	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd
CzAM	NF	+	++	++
LCA	NF	+	+	++
ExCA	NF	NF	NF	+
ELSA	+	++	++	++

+ Fluorescencia, ++ Fluorescencia x 2, NF No fluorescencia

Con los resultados del experimento anterior se realizó otro, en este caso, se usaron los mismos medios (CzA, LCA, ExCA y ELSA) pero solamente las cepas A9 y G15. Los resultados no muestran diferencias importantes, las diferencias que se observan se explican por lo subjetivo del análisis al hacer la estimación de la intensidad de la fluorescencia por comparación visual (Tabla 3).

Tabla 5. Determinación de la presencia de aflatoxinas producidas por cinco cepas de *A. flavus* en diez medios de cultivo sin y con metil- $\beta$ -ciclodextrina sometidos a vapor de hidróxido de amonio.

Cepas	Pigmentación de color rosa									
	A7		K9		A9		G15		E7	
Medio de cultivo	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd	Sin me- $\beta$ -cd	Con me- $\beta$ -cd
CzAM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CzA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CzELA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SDA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25GNA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
EMA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LCA	ND	ND	ND	ND	*	*	*	*	ND	ND
ExCA	ND	ND	ND	ND	ND	*	*	*	ND	ND
ELSA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PDA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

\* Algunos puntos dispersos de pigmentación de color rosa, ND No se detectó pigmentación de color rosa.

Con relación al uso de vapor de hidróxido de amonio para distinguir las cepas de *A. flavus* productoras de aflatoxinas, cuando se observaron las colonias después de ser sometidas a vapores de hidróxido de amonio se detectaron algunos puntos de color rosa en el reverso de la colonia de las cepas A9 y G15 lo que no pudo ser interpretado como presencia de aflatoxinas. Esto sugiere que la metodología propuesta por Saito y Machida (1999) no fue adecuada en las condiciones de nuestro experimento y de nuestro laboratorio (Tabla 5).

## Análisis de varianza del crecimiento de las colonias de *A. flavus*

Con relación al crecimiento de las colonias, se hizo un análisis de varianza de todas las cepas usadas en el experimento, de los tratamientos, pero solamente se analizaron los medios en los que se observó alguna actividad de producción de aflatoxinas, estos fueron: ELSA, LCA, ExCA y CzAM para conocer la variabilidad en el diámetro de las colonias formadas por las diferentes cepas en los diferentes medios de cultivo usados.

Tabla 7. Análisis de varianza

Fuente de variación	gl	SC	CM	Fcalculada	Frequerida 5%
CxMxT	119	4.543			
CxM	59	296.75			
Cepa x repeticiones	14	2.402			
Bloques	2	0.027	0.012		
Cepas	4	1.98	0.495	9.959	3.84
<b>Error(a)</b>	<b>8</b>	<b>0.398</b>	<b>0.0497</b>		
Medios	3	291.014	97	1763.63	2.92
CxM	12	1.757	0.143	2.6	2.09
<b>Error(b)</b>	<b>36</b>	<b>2</b>	<b>0.055</b>		
Tratamientos	1	4.0416	4.0416	1.195	4.08
CxT	4	0.074	0.0185	0.0251	2.61
MxT	3	0.747	0.249	0.0736	2.84
CxMxT	12	4.543	0.382	0.112	2
<b>Error (c)</b>	<b>41</b>	<b>138.644</b>	<b>3.381</b>		

C = Cepa

M = Medio de cultivo

T = Tratamiento

gl = grados de libertad

SC = suma de cuadrados

CM = cuadrados medios

El análisis de varianza (Little y Hills, 1976), tabla 7, mostró con una probabilidad  $\alpha$  0.05 que existen diferencias en el crecimiento medido como diámetro de las colonias, entre las cepas, entre los medios de cultivo, entre las interacciones cepa por medio de cultivo entre los tratamientos, cepa por tratamiento con me- $\beta$ -cd, medio de cultivo por tratamiento cepa por medio de cultivo por tratamiento con me- $\beta$ -cd. Por lo anterior, se hizo un contraste de medias siguiendo el método de Duncan tablas 8, 9 y 10 ( Steel y Torrie, 1980 ).

Tabla 8. Contraste de medias entre las diferentes cepas de *A. flavus*.

Promedio de crecimiento (cm)	Cepas				
	A9	G15	K9	A7	E7
	4.41	4.36	4.22	4.11	4.09
	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>C</b>

El contraste de medias entre las cepas muestra que no existe diferencia entre el crecimiento de A9 y G15 que son iguales entre si, pero diferentes a todas las demás, la cepa K9 es diferente a las demás y las cepas A7 y E7 son iguales entre sí pero diferentes a todas las demás. Las colonias más pequeñas son aquellas formadas por las cepas A7 y E7, las de mayor diámetro formadas por las cepas A9 y G15 (Tabla 8).

Tabla 9. Contraste de medias entre medios de cultivo.

Promedio de crecimiento (cm)	Medios de cultivo			
	ELSA	LCA	ExCA	CzAM
	6.58	4.23	3.94	2.21
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>

El contraste de medias del crecimiento de los hongos en los diferentes medios de cultivo mostró, con una probabilidad  $\alpha$  0.05 que el crecimiento es diferente en todos los medios de cultivo. En ELSA las colonias son notablemente más grandes (Tabla 9).

Tabla 10. Contraste de medias entre las interacciones cepa x medio (CxM).

Cepa x Medio de cultivo	Promedio de crecimiento (cm)	
A9/ELSA	6.89	<b>A</b>
G15/ELSA	6.83	<b>A</b>
K9/ELSA	6.56	<b>A</b>
E7/ELSA	6.51	<b>A</b>
A7/ELSA	6.09	<b>A</b>
A9/LCA	4.38	<b>B</b>
G15/LCA	4.26	<b>B</b>
A7/LCA	4.19	<b>B</b>
K9/LCA	4.18	<b>B</b>
A9/ExCA	4.16	<b>B</b>
E7/LCA	4.08	<b>B</b>
G15/ExCA	4.00	<b>B</b>
K9/ExCA	3.98	<b>B</b>
A7/ExCA	3.86	<b>C</b>
E7/ExCA	3.70	<b>C</b>
G15/CzAM	2.35	<b>D</b>
A7/CzAM	2.30	<b>D</b>
A9/CzAM	2.20	<b>D</b>
K9/CzAM	2.17	<b>D</b>
E7/CzAM	2.03	<b>D</b>

El contraste de medias de las interacciones medio de cultivo por cepas muestra cuatro grupos de crecimiento diferentes que coinciden básicamente con los grupos formados en el contraste de medias de los medios de cultivo (Tabla 10).

## CONCLUSIONES

De las 32 cepas de *A. flavus* usadas inicialmente solamente en cuatro fue posible detectar la presencia de aflatoxinas en los medios y condiciones de cultivo usados.

De los medios de cultivo usados, en el medio recomendado por Hara *et al.*, solución de Czapek agar modificado (CzAM) y en extracto de levadura sacarosa agar (ELSA) fue posible detectar cepas de *A. flavus* productoras de aflatoxinas por medio de la observación de su fluorescencia bajo luz UV. En los otros medios usados, que han sido reportados como eficientes para detectar cepas productoras de aflatoxinas, esto no fue posible en las condiciones de nuestro trabajo.

La adición de metil- $\beta$ -ciclodextrina (me- $\beta$ -cd) mejoró la fluorescencia de las aflatoxinas producidas por las cepas productoras en ELSA; sin embargo, en CzAM no se notó esta mejora. La adición de me- $\beta$ -cd también permitió detectar la producción de aflatoxinas por cepas productoras en los medios CzELA, PDA, LCAy ExCA.

Con relación al uso de vapor de hidróxido de amonio no fue posible detectar en las cepas usadas la presencia de aflatoxinas por medio del cambio de color del reverso de las colonias descrito por Saito y Machida.

En las colonias de mayor diámetro fue posible detectar mejor la producción de aflatoxinas. Los medios en los que mejor se detectó la producción de aflatoxinas por las cepas productoras fueron ELSA y LCA.

## LITERATURA CITADA

1. Allcroft, R., R. B. A. Carnaghan, 1963. Toxic products in groundnuts. *Chemistry and Industry* 12: 50-53.
2. Association of Official Analytical Chemists International, 2000. AOAC Official Method 975.37 Identification of Aflatoxin B1 Derivative Formation on TLC Plate. *In: AOAC International (ed.), Official Methods of Analysis. Natural Toxins. Chapter 49. Maryland, pp. 31-32.*
3. Ayerst, G., 1969. The effects of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Products Research* 5:127-141.
4. Buchanan, R. L., J. C. Ayres, 1976. Effect of sodium acetate on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL2999. *Journal of Food Science* 41:128-132.

5. Council for Agricultural Science and Technology, 1989. Mycotoxins economic and health risks. Council for Agricultural Science and Technology. Iowa. 99 p.
6. Davis, N. D., S. K. Iyer, U. L. Diener, 1987. Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1593-1595.
7. Davis, N. D., U. L. Diener, 1983. Some characteristics of toxigenic and nontoxigenic isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. In: Diener, U. L., R. L. Asquith, J. W. Dickens (eds.), *Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn*. Southern Cooperative Series Bulletin 279 for Southern Regional Research Project S-132. Department of Research Information Alabama Agricultural Experiment Station Auburn University, Alabama. pp. 1-5.
8. Diener, U. L., N. D. Davis, 1967. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. *The Journal of the American Oil Chemists' Society* 44: 259-263.

9. Diener, U. L., N. D. Davis, 1969. Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. In: Goldblatt, L. A. (ed.), Aflatoxin Scientific Background, Control, and Implications. Academic Press. Nueva york. pp. 13-45.
10. Fente, C. A., J. Jaimez Ordaz, B. I. Vázquez, C. M. Franco, A. Cepeda, 2001. New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. Applied and Environmental Microbiology 67: 4858-4862.
11. Hara, S., D. I. Fennell, C. W. Hesseltine, 1974. Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* detected by fluorescence of agar medium under ultraviolet light. Applied Microbiology 27: 1118-1123.
12. Jaimez Ordaz, J., C. A. Fente, B. I. Vázquez, C. M. Franco, A. Cepeda, 2003. Development of a method for direct visual determination of aflatoxin production by colonies of the *Aspergillus flavus* group. International Journal of Food Microbiology 83: 219-225.
13. Koehler, P. E., L. R. Beuchat, M. S. Chhinnan, 1985. Influence of temperature and water activity on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds and meal. Journal of Food Protection 48: 1040-1043.

14. Kozakiewicz, Z., 1994. *Aspergillus* toxins and taxonomy. In: Powell, K. A., A. Renwick, J. F. Peberdy. (eds.), The genus *Aspergillus*. Plenum Press. Nueva york. pp. 303-309.
15. Kurtzman, C. P., B. W. Horn, C. W. Hesseltine, 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 53: 147-158.
16. Klich, M. A., 2002. Identification of Common *Aspergillus* Species. Centraalbureau voor schimmelcultures, Utrecht. The Netherlands. pp 1-4
17. Little, T. M., F. J. Hills, 1976. Métodos Estadísticos para la Investigación en la Agricultura. Trillas. D. F. pp. 95-112
18. Martínez-Flores, R., 1984. Micoflora de maiz (*Zea mays* L.), para consumo humano, con especial atención a la especie *Aspergillus flavus* Link, y su capacidad para producir aflatoxinas. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

19. Northolt, M. D., H. P. van Egmond, W. E. Paulsch, 1977. Differences between *Aspergillus flavus* strains in growth and Aflatoxin B1 Production in Relation to Water activity and temperature. *Journal of Food Protection* 40: 778-781.
20. Pallavi, R. M. V., D. Ramana, R. B. Sashidhar, 1997. Short Note: A simple test tube screening method for identifying aflatoxin-producing strains of *Aspergillus* sp. using coconut milk agar medium. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13: 713-714.
21. Pitt, J. I., 1979. The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press. Lóndres. pp. 17-18.
22. Pitt, J. I., B. F. Miscamble, 1995. Water relations of *Aspergillus flavus* and closely related species. *Journal of Food Protection* 58:86-90.
23. Pitt, J. I., R. A. Samson, J. C. Frisvad, 2000. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. *In*: Samson, R. A., J. I Pitt (ed.), *Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification*. Hardwood Academic Publishers. The Netherlands. pp. 9-49

24. Raper, K. B., D. I. Fennell, 1965. The Genus *Aspergillus*. The Waverly Press. Baltimore. 686 p.
25. Saito, M., S. Machida, 1999. A rapid identification method for aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* by ammonia vapor. *Mycoscience* 40: 205-208.
26. Smith, J. E., 1997. Aflatoxins. *In*: Felix D'Mello, J. P. (ed.), Handbook of Plant and Fungal Toxicants. CRC Press, Nueva York. pp. 269-282.
27. Steel, R. G. D., J. H. Torrie, 1980. Principles and Procedures of Statistics. McGraw-Hill Book Company. Nueva York. pp. 187-188.
28. Tuite, J., 1969. Plant pathological methods fungi and bacteria. Burgess Publishing Company. Minneapolis. pp. 52-61.
29. Vázquez, M. L., A. Cepeda, P. Prognon, G. Mahuzier, J. Blais, 1991. Cyclodextrins as modifiers of the luminescence characteristics of aflatoxins. *Analytica Chimica Acta* 255: 343-350.

30. Wheeler, K. A., B. F. Hurdman, J. I. Pitt, 1991. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology* 12:141-150.