

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Detección de Hongos Fitopatógenos y sus Micotoxinas en Harina de Maíz

Por:

**ISAC AGUILUS MARISCAL GUTIÉRREZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio del 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Detección de Hongos Fitopatógenos y sus Micotoxinas en Harina de Maíz

Por:


**ISAC AGUILUS MARISCAL GUTIÉRREZ**

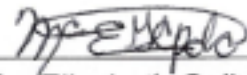
TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
M.C. Abiel Sánchez Arizpe  
Asesor Principal

  
Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda  
Coasesor

  
M.C. Elizabeth Laureano Luna  
Coasesor

  
Dr. Gabriel Gallegos Morales  
Coordinador de la División de Agronomía



Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Junio del 2019

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	i
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO .....	iv
RESUMEN .....	v
ÍNDICE DE CUADROS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
INTRODUCCIÓN .....	1
Justificación.....	2
Objetivo .....	2
Hipótesis.....	2
REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
Origen del Maíz .....	3
Importancia Económica .....	3
Producción Mundial de Maíz .....	4
Producción Nacional de Maíz .....	5
Pérdidas Causadas por Hongos en el Cultivo del Maíz.....	6
Hongos que producen Toxinas.....	7
Género <i>Aspergillus</i> .....	9
Clasificación Taxonómica .....	10
<i>Aspergillus flavus</i> .....	10
<i>Aspergillus niger</i> .....	11
Género <i>Penicillium</i> .....	12
Clasificación Taxonómica .....	13

<i>Penicillium oxalicum</i> .....	13
Género <i>Fusarium</i> .....	14
Clasificación Taxonómica .....	15
<i>Fusarium verticillioides</i> .....	16
Micotoxina .....	16
Tipos y Descripción de Micotoxinas .....	18
Aflatoxinas .....	18
Fumonisinias .....	19
Ocratoxina.....	20
Efecto de las Micotoxinas en Humanos y Animales .....	21
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
Ubicación del Experimento.....	23
Preparación de Medios de Cultivo.....	23
Diluciones Seriadas.....	24
Purificación de Hongos.....	24
Identificación de las Cepas.....	25
Pruebas de Micotoxinas .....	25
Aflatoxina.....	25
Ocratoxina.....	25
Fumonisina.....	25
Análisis Estadístico.....	26
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	27
<b>CONCLUSIONES</b> .....	39
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	40
<b>ANEXOS</b> .....	46

## DEDICATORIAS

A **Dios** porque gracias a el estoy en este mundo, sé que él no me abandona a pesar de que pasen las cosas y gracias a el seguimos luchando nuestro sueño.

A mis **papas** en primera por darme la vida y su gran apoyo que durante que puse un pie en la escuela, ellos jamás me abandonaron. En especial a mi papa que dios lo tenga en su santa gloria (en paz descanse) que me daba sus consejos para llegar a ser alguien en la vida y a mi madre que aún me apoya, la verdad mil gracias papas.

A mis **hermanos** que también son la fuerza y el sustento para salir adelante a pesar de que pasen las cosas, en especial a mi hermano mayor Jorge que él me da sus consejos y apoyos, la verdad gracias carnales.

A mi **novia** también gracias a ella por su gran apoyo y dedicación a mí y estoy muy agradecido a ella por su gran espera y así poder seguir juntos, la verdad gracias amor por todo lo que haces por mí.

A mis **abuelitos** en general por sus bellas palabras, por estar atentos o preguntar cómo nos va, mil gracias la verdad.

A **todos** mis amigos, tíos, primos, compañeros y conocidos que también son pieza clave para el éxito, les agradezco por sus palabras, ánimos y así salir adelante, la verdad gracias.

## AGRADECIMIENTO

A **Dios** por darme la oportunidad de venir en este mundo y guiarme al camino bueno lleno de paz y amor.

A mi **Alma Mater** por abrirme las puertas del camino de la excelencia y darme una oportunidad de realizar mis estudios y así ser una persona capaz y eficiente preparada y enfrentarme con el mundo laboral que nos rodea.

A el **Departamento de Parasitología** por ser parte de la formación profesional y emprender nuevos logros y dentro de esta al laboratorio de fitopatología que fue clave para el término del experimento.

A el **M.C Abiel Sánchez Arizpe** por su valioso apoyo incondicional, sus savias palabras, consejos, tiempo que me dio, dedicación y por su gran aporte de esta investigación que él fue el motor para terminarlo, la verdad gracias.

A la **M.C Elizabeth Laureano Luna** por su entrega, tiempo, consejos y dedicación que también fue parte de la investigación y gracias a ella por apoyarme en todo el tiempo que tardo el proyecto, no sé cómo agradeceréte, pero mil gracias.

A la **Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda** por su tiempo, contribución de conocimiento y aporte de este trabajo que fue énfasis para terminarlo.

## RESUMEN

El maíz (*Zea mays*) es una de las plantas más cultivada a nivel mundial, es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea. Se considera de gran importancia para los agricultores por su consumo, para alimento de animales y el comercio. Cada año la producción de este cultivo se ve afectado por la presencia de plagas y enfermedades que afecta el rendimiento y calidad del producto. Los hongos son los microorganismos que más enfermedades ocasionan siendo los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* los que atacan al maíz tanto en campo como en almacén, ya que también son productores de micotoxinas y puede tener serios problemas para los humanos y animales que consuman alimentos derivados de maíces contaminados.

La presente investigación tuvo como finalidad detectar cepas de diferentes especies de hongos fitopatógenos y presencia de micotoxinas de 7 materiales de harina de maíz de la región Poblana. Para la cuantificación de hongos se implementó el método de prueba diluciones seriadas utilizando papa dextrosa agar e incubación de 8 a 10 días a 28°C para su propia identificación. Para la determinación de micotoxinas se realizó la prueba ELISA. Los resultados fueron sometidos a un diseño completamente al azar con arreglo factoriales al 0.05 nivel de significancia en el sistema (SAS ver. 9.1.3). Para la prueba de micotoxinas los resultados no presentaron presencia de micotoxinas, las colonias de hongos oscilaron entre 441 UFC por el total de 10 gramos de muestra de harina de maíz por cada material y las especies fúngicas que se identificaron fueron *Fusarium verticillioides*, *Penicillium oxalicum*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*.

**Palabras clave:** Hongos Fitopatógenos, harina de maíz, micotoxinas.

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>Pág.</b>
<b>Cuadro 1.</b> Países con mayor producción en el año 2016. ....	4
<b>Cuadro 2.</b> Participación en la producción de maíz por estado en México en el año 2018. Fuente: SIAP 2018. ....	5
<b>Cuadro 3.</b> Especies fúngicas productoras de micotoxinas de importancia biológica y económica en humanos, animales y agricultura. ....	8
<b>Cuadro 4.</b> Clasificación Taxonómica de <i>Aspergillus spp.</i> Según (Link, 1809).....	10
<b>Cuadro 5.</b> Clasificación Taxonómica de <i>Penicillium</i> según (Link 1809). ....	13
<b>Cuadro 6.</b> Clasificación taxonómica de género <i>Fusarium</i> según Barnett y Hunter (1978). ....	15
<b>Cuadro 7.</b> Micotoxinas en la historia (Soriano <i>et al.</i> , 2007). ....	17
<b>Cuadro 8.</b> Material Albatros en diluciones seriadas. ....	27
<b>Cuadro 9.</b> Material criollo de la región Tlachichuca en diluciones seriadas. ....	27
<b>Cuadro 10.</b> Material criollo de la región Atenco en diluciones seriadas. ....	28
<b>Cuadro 11.</b> Material A-722 de la región Mazapiltepec en diluciones seriadas. ....	28
<b>Cuadro 12.</b> Material Faisan en diluciones seriadas. ....	28
<b>Cuadro 13.</b> Material HC8 en diluciones seriadas. ....	28
<b>Cuadro 14.</b> Material Star de la región Cerro Alto en diluciones seriadas. ....	29



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Ejemplo de los principales hongos productores de micotoxinas en alimentos de consumo humano y animal. ....	8
<b>Figura 2.</b> Estructura morfológica en <i>Aspergillus</i> (Samson <i>et al.</i> , 1979). ....	9
<b>Figura 3.</b> Desarrollo de <i>Aspergillus flavus</i> en papa-agar-dextrosa. ....	10
<b>Figura 4.</b> Desarrollo de <i>Aspergillus niger</i> en papa-agar-dextrosa. ....	12
<b>Figura 5.</b> Aspecto de penicilios: monoverticilado, biverticilado, terverticilado. ....	13
<b>Figura 6.</b> Características morfológicas microscópicas del género <i>Fusarium</i> . ....	15
<b>Figura 7.</b> Cultivo de <i>F. verticillioides</i> en agar papa-dextrosa. ....	16
<b>Figura 8.</b> Estructura química de la aflatoxinas B1. ....	18
<b>Figura 9.</b> Estructura química de la Fumonisina B1. ....	19
<b>Figura 10.</b> Estructura química de la ocratoxina A, toxina principal de este grupo. ....	20
<b>Figura 11.</b> Ubicación del experimento. ....	23
<b>Figura 12.</b> Rango de variación de las medias en los niveles dentro del factor A. ....	31
<b>Figura 13.</b> Rango de variación de las medias en los niveles dentro del factor B. ....	31
<b>Figura 14.</b> Rango de variación de las medias en los niveles dentro del factor C. ....	32
<b>Figura 15.</b> Estructura de <i>Aspergillus flavus</i> en 100X. ....	33
<b>Figura 16.</b> Estructura de <i>Aspergillus niger</i> en 100X. ....	33
<b>Figura 17.</b> Estructura de <i>Penicillium oxalicum</i> en 100X. ....	34
<b>Figura 18.</b> Estructura de <i>Fusarium verticillioides</i> en 100X. ....	34
<b>Figura 19.</b> Detección de fumonisina en harina de maíz. ....	36

## INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays*) es la segunda planta más cultivada de importancia a nivel mundial, después del trigo, mientras que el arroz ocupa el tercer lugar. Es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea y el segundo, después del trigo, en producción total. El maíz es de gran importancia para los agricultores por su consumo, para alimento de animales y el comercio.

Cada año, la producción de maíz se ve afectada por la presencia de plagas y enfermedades que repercuten fuertemente en el rendimiento y calidad del producto. El volumen de la producción de este grano en nuestro país es limitado debido a factores abióticos como altas y bajas temperaturas, salinidad y deficiencia de nutrimentos en los suelos. De León, (2008) menciona que este cultivo es afectado por al menos 23 insectos plagas y 18 enfermedades. Entre las enfermedades producidas por organismos fitopatógenos se encuentran bacteria, nematodos, hongos y virus constituyendo la mayor pérdida en la producción agrícola (Benítez *et al.*, 2004).

Los hongos son el grupo que más enfermedades ocasiona, se sabe que más de 8,000 especies pueden causar enfermedades en las plantas. Los hongos que normalmente atacan el maíz en el campo como en el almacén generalmente pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*; Estos organismos son potencialmente productores de micotoxinas que a su vez contaminan a los alimentos que contengan dichos microorganismos (Hernández *et al.*, 2007; Montes *et al.*, 2009).

En forma general, para que los hongos produzcan micotoxinas necesitan humedad, temperatura y un substrato adecuado. Los hongos se desarrollan en climas cálidos y húmedos produciendo sus toxinas cuando las plantas se encuentran sometidas a estrés, durante su desarrollo en el campo y también durante etapas posteriores a la cosecha bajo condiciones inadecuadas de almacenamiento.

## **Justificación**

El presente trabajo se realizó para detectar presencia de hongos y micotoxinas en maíces que afectan la calidad agroalimentaria de la zona de estudio.

## **Objetivo**

Detectar cepas de diferentes especies de hongos y sus micotoxinas provenientes de maíces de la región del estado de Puebla.

## **Hipótesis**

Dichos maíces de la región presentaran hongos de especies diferentes y contaminación de micotoxinas.

## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **Origen del Maíz**

El maíz es un cereal nativo de América, cuyo centro original de domesticación fue Mesoamérica, desde donde se difundió hacia todo el continente. Cazco (2006) menciona que su origen geográfico del maíz no se conoce exactamente, aunque hay evidencias que se sitúa en México desde los años 5000 A.C.

El maíz se originó de una forma antigua salvaje del maíz nativo, ahora extendido en las partes de México y Guatemala. El maíz primitivo y el teosinte se establecieron entre ellos miles de años atrás antes de que el maíz silvestre evolucionara para poder ser una planta cultivada, ya que hoy en día no se ha encontrado el maíz silvestre o de una forma silvestre por lo que no es de gran consideración (Acosta, 2009).

### **Importancia Económica**

El maíz es el cultivo más importante de la agricultura mexicana, no solo por la relevancia que en materia de alimentación representa para la población, sino por sus múltiples usos como materia prima en la industria, se ha convertido en uno de los productos más sobresaliente en los mercados internacionales. Su relevancia, transformación económica y social supera a la de cualquier otro cultivo (Panorama Agroalimentario/ Maíz 2016).

## Producción Mundial de Maíz

En el mes de junio del 2017 el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) estimó que la producción mundial de maíz 2017/18 sería de 1031.86 millones de toneladas, cerca de 1.8 millones de toneladas menos de lo estimado del mes pasado.

**Cuadro 1.- Países con mayor producción en el año 2016.**

<b>PRODUCCIÓN MUNDIAL DE MAÍZ 2017/2018</b>	
<b>PAÍS</b>	<b>VALORES EN TONELADAS METRICAS</b>
E.U.A	357 267 000
CHINA	215 000 000
BRASIL	95 000 000
UNION EUROPEA	62 000 000
ARGENTINA	40 000 000
UCRANIA	28 500 000
MÉXICO	25 000 000
INDIA	25 000 000
RUSIA	16 000 000
CANADA	14 400 000

Mientras que México se ubica en la séptima posición del ranking; por debajo de Brasil y Argentina. Reportando Brasil un incremento del 38.9 % en la cosecha del maíz. Mientras que Argentina sembró una superficie aproximada de 5,4 millones de hectáreas cosechando más de 41 millones de toneladas.

En el 2016 México importó alrededor de 13,8 millones de toneladas de maíz de las cuales 12.7 millones fueron de maíz amarillo; para complementar las 3.5 millones de toneladas que se produjeron en el país. El cual se utiliza para el ganado. Las 1.1 millones de toneladas restantes fueron de maíz blanco, que se usa para el consumo humano; principalmente en la elaboración de harina para tortillas.

## Producción Nacional de Maíz

La producción de este grano básico, se reporta en todas las entidades federativas del país, según el SIAP se reportó para ese año 2018 un bajón de 108 163 toneladas de producción obtenida, ya que para el 2017 se obtuvo una producción total de 7 866 223 t/ha. A continuación, en la siguiente tabla se muestra por estados y la producción Nacional total de este grano en cosechas de otoño-invierno de riego más temporal, así como la superficie cosechada y su rendimiento total por hectáreas.

**Cuadro 2.-** Participación en la producción de maíz por estado en México en el año 2018.  
Fuente: SIAP 2018.

ESTADO	SUPERFICIE (Ha)			Rendimiento (Ton)	Rendimiento (T/Ha)
	Sembrada	Cosecha	Siniestrada	OBTENIDA	OBTENIDA
SINALOA	304	304		5 002 748	11.661
TAMAULIPAS	157 556	155 475	2 082	926 737	5.961
SONORA	45 533	45 533		518 703	11.392
VERACRUZ	185 495	185 595		469 430	2.531
CHIAPAS	111 736	111 736		185 962	1.664
OAXACA	69 017	68 914	103	161 616	2.345
GUERRERO	30 475	30 475		116 154	3.811
TABASCO	34 783	32 570	2 212	64 571	1.982
PUEBLA	23 146	23 146		49 736	2.149
HIDALGO	25 100	25 100		40 882	1.629
NAYARIT	5 316	5 316		36 565	6.879
BAJA CALIF S	3 793	3 793		34 708	9.150
CAMPECHE	14 735	14 693	42	30 344	2.065
JALISCO	4 068	4 068		26 111	6.419
RESTO	33 149	32 308	841	93 791	58.864
<b>TOTAL</b>	<b>1 772 921</b>	<b>1 167 640</b>	<b>5280</b>	<b>7 758 060</b>	<b>6.644</b>

## **Pérdidas Causadas por Hongos en el Cultivo del Maíz**

El maíz, como otros cultivos de mayor importancia es susceptible a diversas enfermedades que le impide el crecimiento de la planta. Las enfermedades se ven favorecidas por las condiciones ambientales, el tipo de suelo, la susceptibilidad a las plagas, y cuando son enfermedades causadas por agentes virales, se afectan por condiciones que favorezcan la migración, supervivencia y establecimiento de vectores.

Las principales enfermedades del maíz suelen ser atacadas o causadas por hongos y virus entre otros patógenos que le afecte su desarrollo, ocasionando gran pérdida total económica, en menor grado se presentan las enfermedades causadas por bacterias que ocasionan frecuentemente menores daños y costos económicos. La mayor parte de las plantas, silvestres y cultivadas tienen inmunidad innata o resistencia a muchos patógenos que nos rodea en el ambiente (Varón y Sarria, 2007).

Las micotoxinas se encuentran contaminando cierto tipo de alimento natural que se encuentran expuestos a fitopatógenos productores de estas. Tenemos tres géneros productores, entre los que destacan *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Las micotoxinas poseen gran número de enfermedades carcinogénicas.

Debido a sus efectos químicos que reaccionan en dicho sistema humano, como también en su gran extremo a temperaturas muy altas de calor que ocasiona, la presencia de esta sustancia toxica en los alimento es considerado con un alto riesgo en la salud, tanto como seres humanos como los animales que consuman maíz u otro alimento. (Soriano 2007; Murray *et al.*, 2006; Miller, 1994; Resnik, 1997).

La contaminación de sustancias fuertemente toxicas en alimentos ocurren en diferentes etapas de almacenamiento o su proceso que en cierto lugar pueda desarrollarse como contaminante peligroso a su vez puede ser en el campo, cosecha o en el transporte que es muy favorecido por las condiciones de clima, (Bogates *et al.*, 2004).

La severidad de estas enfermedades en el cultivo del maíz causa un gran efecto directo en la reducción del rendimiento que para la zona central de México oscila entre 6-55% de su producción total a consecuencia de pérdidas que ocasionan estas (González *et al.*, 2007; Briones *et al.*, 2015).

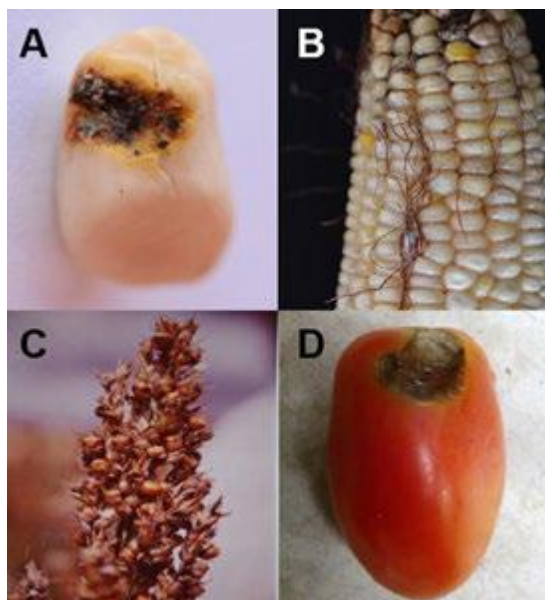
Como se puede ver que la mayor parte de las especies de hongos que hay en el mundo crecen en los cereales, produciendo sus contaminantes tóxicos con base a condiciones muy extremas que le sean favorables para hacer el efecto a cualquier individuo que consuma dichos alimentos. Según estudios un 25 y 40% de los cereales que se produzcan en cualquier parte del mundo, pueden estar contaminado con toxinas (Pittet, 1998).

### **Hongos que producen Toxinas**

Las micotoxinas están muy presentes en granos contaminados con hongos que contienen sustancias tóxicas, prevaleciendo, aunque después el hongo haya desaparecido, como así también se encuentran en sub-productos que están elaborado a base de estos, aun así, encontraremos presencia de estas mismas (Duniere *et al.*, 2013). Esto a su vez, se pueden encontrar en otros alimentos como leche, carne y huevo derivado de animales que consumieron granos ya contaminados, a referencia de estos la leche es el más trasferido de micotoxina (Lazzari, 1997).

Los principales géneros de hongos considerados de campo son requeridos con alto contenido de humedad relativa para su crecimiento (20-21%), esto a base de humedad, atacando con mucha frecuencia a los granos antes que sea cosechado. Entre estos géneros podemos encontrar *Penicillium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Fusarium*, en este último es muy relevante por su alta cantidad productora de micotoxina (Gonzales, 1995).





**Figura 1.-** Ejemplo de los principales hongos productores de micotoxinas en alimentos de consumo humano y animal.

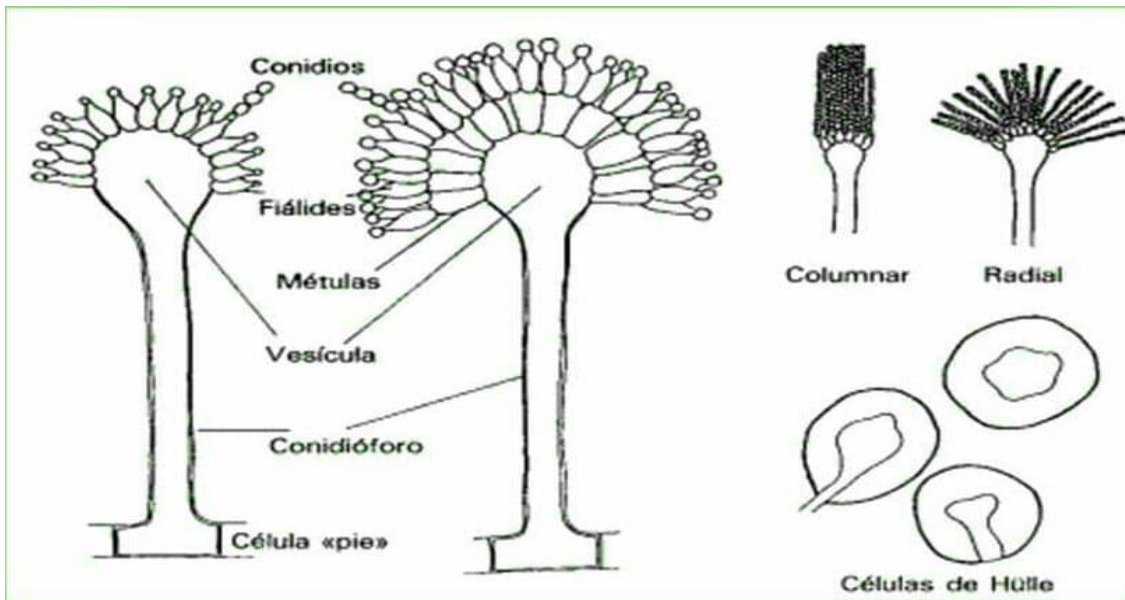
**Cuadro 3.-** Especies fúngicas productoras de micotoxinas de importancia biológica y económica en humanos, animales y agricultura.

<b>Especie</b>	<b>Micotoxina</b>	<b>Efecto</b>
<i>Aspergillus spp.</i>	Aflatoxinas	Carcinogénico y teratogénico
<i>Fusarium spp.</i>	Tricotecenos	Hepatotóxicos Inhibición de síntesis de proteínas
<i>Fusarium spp.</i>	Fumonisinias	Hepatotóxico y nefrotóxico
<i>Aspergillus spp.</i>	Ocratoxinas	Nefrotóxico
<i>Petromyces alliaceus</i>		Hepatotóxico
<i>Penicillium verrucosum</i>		Carcinogénico
<i>Fusarium spp.</i>	Zearalenona	Estrogénico

## Género *Aspergillus*

*Aspergillus* es un género de moho cuyas colonias crecen rápidamente de color blanco, amarillo, café, negro o verde que consisten en un denso conjunto de conidias con conidióforo y vesícula. En la estructura morfológica de las conidias se pueden observar que pueden acomodarse de forma columnar o radial.

**Figura 2.-** Estructura morfológica en *Aspergillus* (Samson *et al.*, 1979).



La mayor de las especies de este género son hongos filamentosos saprófitos por su degradación en la materia orgánica. Su hábitat natural es el suelo y se desarrolla en materia en descomposición; se reproduce por conidios cuya germinación da origen a las hifas y para su desarrollo *Aspergillus* requiere una humedad relativa entre 70 y 90% (Klich, 2002).

El desarrollo de *Aspergillus* y su contaminación en los productos alimenticios con micotoxina son consecuencia de la interacción entre el hongo, hospedero y el ambiente, a esto se determina la infestación y la colonización del sustrato, así como el tipo y cantidad de toxinas producidas (García y Heredia, 2006).

## Clasificación Taxonómica

**Cuadro 4.-** Clasificación Taxonómica de *Aspergillus spp.* Según (Link, 1809).

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Euascmycete
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Género	<i>Aspergillus</i>

### ***Aspergillus flavus***

Las colonias de *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) suelen formar una densa capa de conidias de color amarillo verdoso con un diámetro de 3-5 cm al incubarse a 25° C en agar. Las cabezas de las conidias típicamente son radiales y después se dividen en varias columnas que van desde amarillo verdoso claro a oscuro. Los conidióforos son ásperos que pueden crecer de 1 a 2.5 mm de longitud. Las vesículas tienen diámetro de 25-45  $\mu\text{m}$ . Las fialides nacen de la vesícula o de las metulas y miden de 6-10  $\mu\text{m}$  por 4-5.5  $\mu\text{m}$ . Las metulas miden de 6.5 a 10  $\mu\text{m}$  por 3.5  $\mu\text{m}$ . Además, las conidias miden 3.6 de diámetro de color verde pálido. La *esclerotia* se produce separada, de forma y dimensión variables de color café a negro (Samson *et al.*, 1995).



**Figura 3.-** Desarrollo de *Aspergillus flavus* en papa-agar-dextrosa.

*A. flavus* generalmente crece en nueces, especias, semillas, cereales y ocasionalmente en frutas secas. Dentro de los metabolitos tóxicos importantes de este moho se encuentran los siguientes: ácido 3-nitropropiónico, ciclopiazónico y aflatoxinas B (Samson *et al.*, 1995).

### ***Aspergillus niger***

Las colonias de *Aspergillus niger* en Agar incubadas a 25° C llegan a tener un diámetro de 4-5 cm en 7 días, formando una capa blanca o amarilla con conidióforo de color café oscuro a negro. Las cabezas de las conidias son negras y radiales, y tienen a separarse en columnas sueltas con el tiempo. Sus conidióforos tienen paredes suaves. Los diámetros de las vesículas son de 50-100 µm. Las fialides nacen de las métulas con 7.0-9.5 µm por 3-4 µm de tamaño. Las métulas están normalmente separadas y miden de 15-25 µm por 4.5-6.0 µm. Las conidias de color hialino a café y de 3.5-5 µm de diámetro, tienen verrugas y crestas irregulares (Samson *et al.*, 1995).

Esta especie es la principal productora de ácidos orgánicos, especialmente ácido cítrico y el glucónico, ya que disminuye el pH del producto que provoca sabores y olores desagradables. El ácido cítrico es uno de los principales productos que se juega el papel en la industria de los alimentos que se utilizan, y entre otros productos más, como por ejemplo refrescos, zumos de fruta, caramelos y el vino. Las enzimas que genera esta especie también es de gran importancia para la industria, ya que es muy trabajada como productora de catalasa (Hjort, 2003; Wösten *et al.*, 2007).



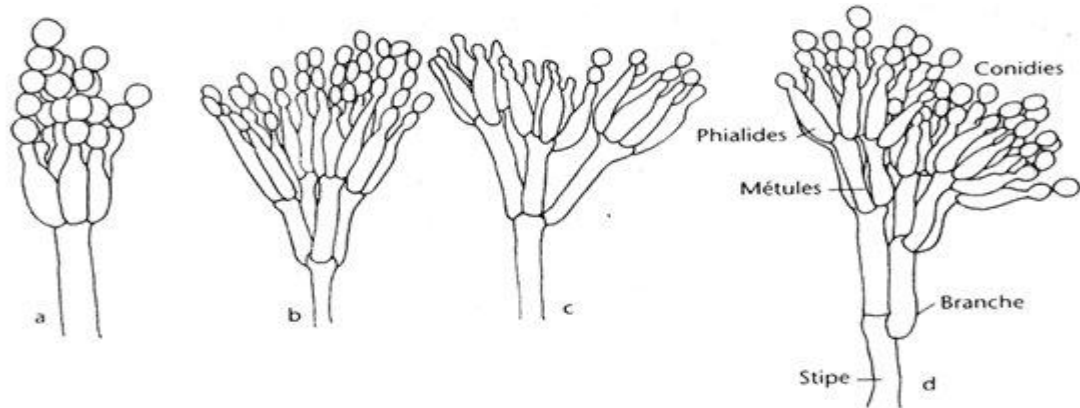
**Figura 4.-** Desarrollo de *Aspergillus niger* en papa-agar-dextrosa.

### **Género *Penicillium***

Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. Las ramificaciones de un pincel poliverticilado son ramas, rámulas, métulas y fiálides. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada. Se llama conectivo a la porción de pared que une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas (Webster, 1986).

Los filamentos o hifas alcanzan un diámetro entre dos o tres micrómetros y tienen septos con un poro central que no es visible al microscopio óptico. Las paredes del estípote, las ramas o las métulas pueden ser lisas, rugosas o equinuladas. La pared de las fiálides es siempre lisa. Las fiálides pueden tener forma de ánfora o bien ser casi cilíndricas con la porción apical en forma de cono. El tamaño máximo de las fiálides es de 15 mm y la parte terminal no supera los 3 mm de largo. Los conidios son esféricos o elipsoidales, unicelulares, hialinos que en masa se ven de color verde, verde azulado, verde aceituna o gris. La pared de los conidios es lisa o rugosa según las especies (Webster 1986).

**Figura 5.-** Aspecto de penicilios: monoverticilado, verticilado, terverticilado.



### Clasificación Taxonómica

**Cuadro 5.-** Clasificación Taxonómica de *Penicillium* según (Link 1809).

Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Euascomycete
Orden	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Género	<i>Penicillium</i>

### ***Penicillium oxalicum***

Esta especie de hongo las colonias alcanzan un tamaño de 35-60 mm de diámetro en 10 días, son planas con áreas centrales aterciopeladas abundante algodonosa de aspecto amplio a causa de mayor producción de conidios. El micelio es incospicuo de color blanco a amarillo y claro en las áreas algodonosas, superficie de crecimiento en general que lo rodea es de color verde. La producción de conidios es muy abundante, típica del género y de color verde grisáceo.

Los conidióforos (penicilio o pincel) nacen de la superficie del micelio dando lugar a las estructuras y algunas veces presentan ramas adicionales. En general el estipe tiene una longitud de 200-400  $\mu\text{m}$  que son delgadas y lisas, los verticilos son terminales característicos de 2-4 metulas de 10-15  $\mu\text{m}$  de longitud, fialides

cilíndricas con punta estrecha de 10-15  $\mu\text{m}$  de longitud. Los conidios son elipsoidales, muy grandes de (3.5-5.0)  $\mu\text{m}$  de longitud y de pared lisa o a veces rugosa (Samson *et al.*, 1995).

### **Género *Fusarium***

Este género es de mayor importancia ya que su desarrollo es muy rápido debido a que puede crecer en medios como el agar papa dextrosa con temperaturas de 25°C, el micelio es totalmente algodonoso y claro al principio, pero como avanzan los días su color es de mayor aumento y cambia a crema o amarillo y luego adquiere en su totalidad un color rosa pálido (Díaz de Castro *et al.*, 2007).

Se puede decir que este patógeno es productor de micelio dividido por paredes de células, que produce tres tipos de diferentes esporas asexuales. Las microconidias son productos del micelio ya sea aéreo o en cadenas, tienen micelio septado es decir de una o dos células y se forma la espora para que el hongo lo pueda producir con mayor abundancia en sus condiciones que le favorecen y se forma con mayor frecuencia en las células de las plantas ya infectadas, o dentro del cuerpo humano y de animales (Díaz de Castro *et al.*, 2007).

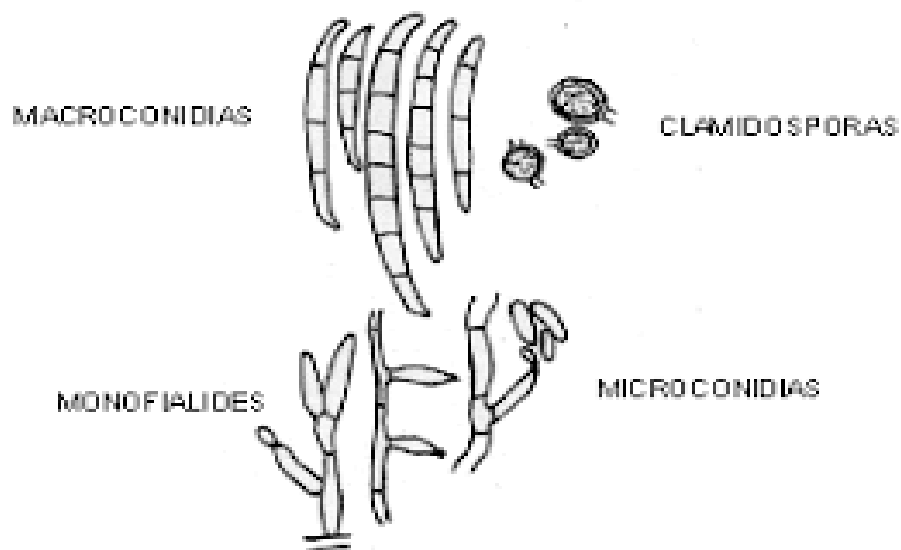
Las especies de *Fusarium* se consideran predominantemente hongos de campo Sumalan, Alexa, & Antena, (2013). Estos hongos son patógenos importantes que causan considerables pérdidas de rendimiento en los cereales de grano pequeño, *Fusarium* produce una variedad de metabolitos tóxicos (micotoxinas) que ponen en peligro la salud de los seres humanos y los animales. Las especies más comunes son *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides* y *F. moniliforme*. Estas especies producen colonias algodonosas, planas y estrelladas de color diverso según la especie. La mayoría de las especies son frecuentes en el maíz recién cosechado.

## Clasificación Taxonómica

El género *Fusarium spp.*, fue descrito por Link en 1809. Desde entonces la taxonomía ha sido muy complicada debido a que las descripciones iniciales se hicieron en base a las características que varían, según los medios que se utilizaban. Se considera que este género exhibe un grado de variación con respecto a la morfología microscópica y a sus características fisiológicas, debido a su gran habilidad para colonizar diversos hábitats ecológicos (Nelson *et al.*, 1994).

**Cuadro 6.-** Clasificación taxonómica de género *Fusarium* según Barnett y Hunter (1978).

Reino	Fungi
División	Eumycota
Clase	Deuteromycete
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Género	<i>Fusarium</i>

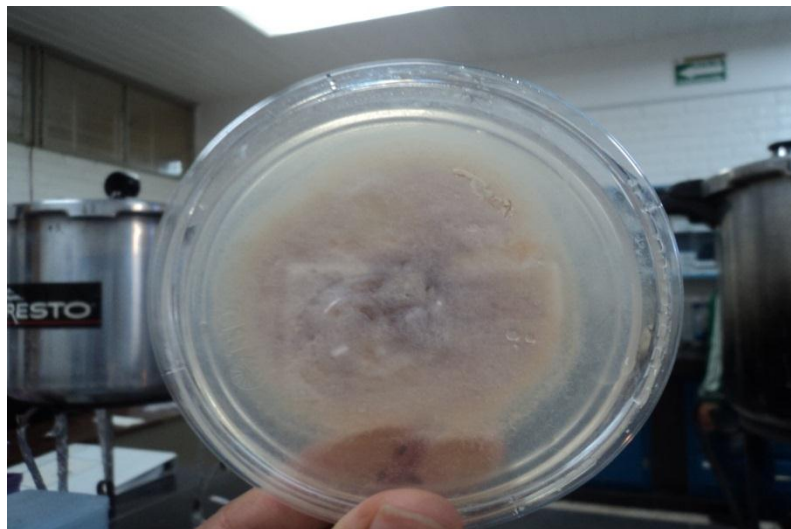


**Figura 6.-** Características morfológicas microscópicas del género *Fusarium*.



### ***Fusarium verticillioides***

Las colonias son de crecimiento moderadamente rápido, de 8 cm a los 8 días de color blanco a durazno. Las macroconidias son abundantes generalmente de una célula, de oval a ovoide, en largas cadenas o en falsas cabezas. Los conidióforos son largos, no ramificados y ramificados monofialides y polifialides. Las macroconidias están presentes, pero son escasas, y varían levemente de su forma curva a casi rectas, de paredes delgadas. Las clamidiosporas están ausentes (Sanabria *et al.*, 2002).



**Figura 7.-** Cultivo de *F. verticillioides* en agar papa-dextrosa.

### **Micotoxina**

Agente tóxico que es derivada de las palabras griegas: *mikes* y *toxina*, que significa hongo y veneno generalmente. Algunos o casi la mayoría de los hongos filamentosos producen sus metabolitos secundarios, por medio de su inhalación o absorción hace enfermar o causa la muerte en humanos y animales (Fokunang *et al.*, 2006; Soriano *et al.*, 2007). La contaminación por este compuesto peligroso,

plantea serios problemas para el consumo de los alimentos para el ser vivo (López-García *et al.*, 1999).

Estos agentes tóxicos desde tiempos muy atrás han presentado casos muy relevantes para la sociedad, ya sea enfermedad o hasta la muerte y grandes pérdidas en general en su totalidad. Las aflatoxinas fueron descubiertas en 1960, cuando en el Reino Unido cientos de pavos fueron alimentados con cacahuates provenientes de Brasil, los cuales murieron intoxicados, porque ciertos alimentos venían contaminados de dicha micotoxina.

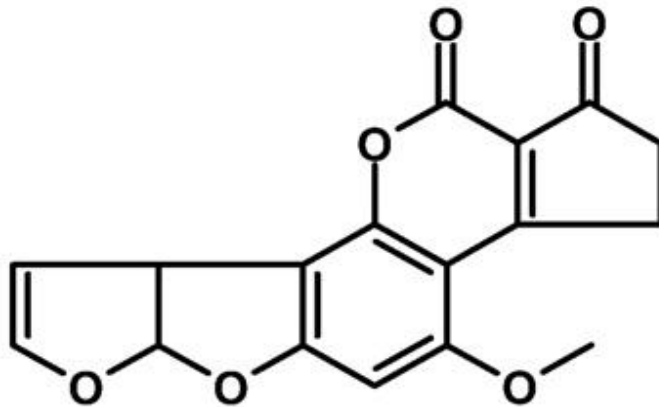
**Cuadro 7.-** Micotoxinas en la historia (Soriano *et al.*, 2007).

<b>Año</b>	<b>Acontecimiento</b>	<b>Causa</b>
1926	Epidemia de ergotismo en el norte y este de Europa	Alcaloide de <i>Claviceps</i>
1932	Epidemias en Rusia, tasas de mortalidad en un 60%	Toxina T-2, primera micotoxicosis por tricotecenos
1960	Muerte de 100, 000 pavos en Inglaterra	Consumo de cacahuates importados de Brasil contaminados con aflatoxina
1976	India, epidemia de hepatitis y muerte de 100 personas	Consumo de maíz con elevado nivel de aflatoxina. Se detectaron niveles elevados de aflatoxinas B1 en los hígados de los sujetos fallecidos
1977-78	Etiopia, muerte de 47 personas	Cereales contaminados con micotoxinas

## Tipos y Descripción de Micotoxinas

### Aflatoxinas

Las aflatoxinas es un grupo de compuesto químicos con metabolitos secundario toxico producido por el género *Aspergillus*, cuyo peso molecular es bajo y el esqueleto básico es un anillo de furano unido al núcleo, ya que son originados en el organismo de humanos y animales que han consumido alimentos contaminados con aflatoxinas (Rimblas, 2004). El micelio de esta y otras especies que son productoras de aflatoxinas tienen la capacidad de colonizar semillas de maní, girasol, arroz, soya, algodón y cereales. Como también sus derivados que son almacenados en sacos y silos. Se ha reportado presencia mundial de este compuesto, sobre todo en semillas de plantas que se encuentran en climas tropicales donde se encuentra un mayor rango de crecimiento de hongos aflotoxigénicos con una humedad relativa de 80-90% y una temperatura de 30-35°C; esto explica la frecuente contaminación del maíz (Soriano *et al.*, 2007).



**Figura 8.-** Estructura química de la aflatoxina B1.

## Fumonisin

Las fumonisinas son producidas por especies del género *Fusarium*, siendo el maíz el cereal principalmente afectado por este grupo de toxinas, aunque se han encontrado en sorgo y arroz (Richard, 2007). Éstas fueron las primeras micotoxinas implicadas en enfermedades en humanos desde 1988; posteriormente, en Estados Unidos se observó que el maíz contaminado con mohos productores de fumonisinas causó la muerte de centenas de caballos y cerdos (Missmer *et al.*, 2006).

La fumonisina más común encontrada en maíz es la fumonisina B1 (FB1); mientras que las fumonisinas B2 y B3 (FB2 y FB3) son contaminantes comunes de cereales u otros alimentos. Las condiciones exactas para que se dé la producción de micotoxinas en cereales no se conocen por completo, pero el estrés hídrico, seguido por clima cálido y al final del crecimiento, clima húmedo parecen ser importantes para la producción (Richard, 2007).

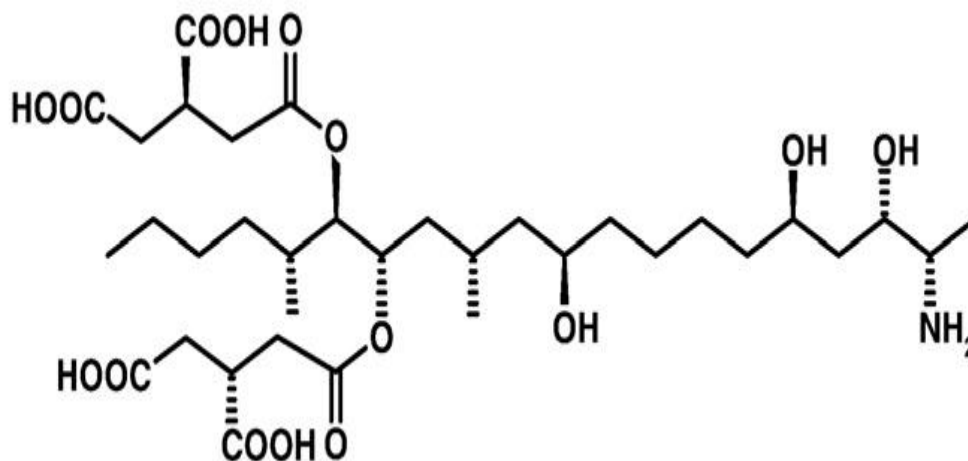
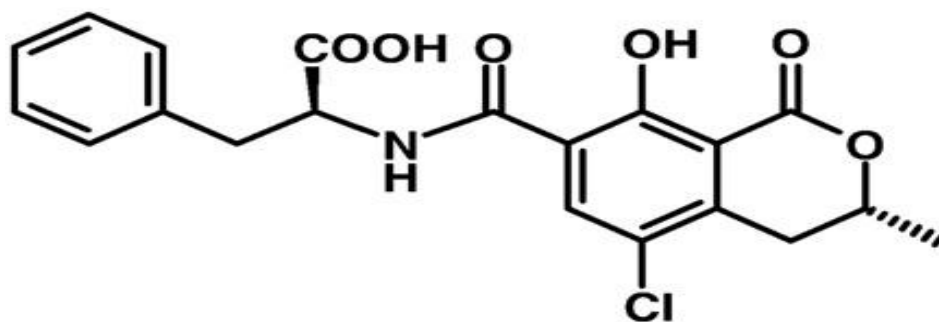


Figura 9.- Estructura química de la Fumonisin B1.

## Ocratoxina

Las ocratoxinas son producidas principalmente por las especies fúngicas *Penicillium verrucosum* y *Aspergillus ochraceus*. Estas toxinas, pueden contaminar una amplia variedad de alimentos. Además, tienen la capacidad de acumularse en la sangre y leche de los animales expuestos a ellas. Entre los productos contaminados se encuentran los cereales y sus productos finales. Como la solubilidad de las ocratoxinas en agua es baja, se absorben por el tracto gastrointestinal uniéndose fuertemente a las proteínas de membrana. Esto resulta en la reabsorción en el riñón, y la recirculación enterohepática, por lo que la biotransformación y eliminación renal se disminuye, resultando en un tiempo de vida largo de las ocratoxinas en el cuerpo, de aproximadamente 35 días (Ringot *et al.*, 2006; Richard, 2007; Wu *et al.*, 2014).



**Figura 10.-** Estructura química de la ocratoxina A, toxina principal de este grupo.

## **Efecto de las Micotoxinas en Humanos y Animales**

Las aflatoxinas en personas que las consuman pueden producir cáncer de hígado. La (OMS) y la Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer han estudiado los efectos de dicha enfermedad y los efectos de dicho compuesto en su consumo, existe una enfermedad llamada aflatoxicosis que conllevan a la persona, como vómito, dolor del abdomen y edema pulmonar (Wu *et al.*, 2014).

Un ejemplo reportado sobre el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas se dio en el occidente de la India en la década de 1970, donde el consumo de maíz contaminado causó envenenamiento y provocó la muerte de al menos 97 personas (Krishnamachari *et al.*, 1975). En reportes más recientes, en el año 2004, maíz contaminado con aflatoxinas causó uno de los brotes más grandes de aflatoxicosis en Kenia, resultando en 317 casos de intoxicación y 125 muertes (Azziz-Baumgartner *et al.*, 2005).

Las fumonisinas inhiben la síntesis de ceramida, ya que esta familia de lípidos se deriva del alcohol insaturado por 18 carbonos, la cual tiene muchas funciones en el cuerpo humano y forma membranas celulares e inducen o inhiben la diferenciación celular. Debido a su complejidad estas toxinas causan muchos tipos de enfermedades como la leucoencefalomalacia en los caballos, reducción de la ganancia de peso y daño del hígado en ganado porcino. El consumo de alimento con fumonisinas es un peligro para la humanidad ya que también se desarrolla el cáncer de esófago. Esta ocasión fue vista por primera vez en poblaciones de Sudáfrica que desarrollaron cáncer de esófago de manera paulatina, cuando ellos consumieron maíz contaminado con grandes cantidades de fumonisinas (Missmer *et al.*, 2006).

Otras enfermedades en los seres humano causado por consumo de alimentos que contienen dicho agente toxico son las alteraciones embriónicas, también como la medula espinal, irritación dérmica, hepatitis aguda entre otras perturbaciones metabólicas (Marasas *et al.*, 2004). La enfermedad AFB1 son metabolitos de aflatoxicol considerada por la Agencia Internacional para la

Investigación del Cáncer (IARC) como cancerígeno en animales y humanos de mayor importancia en la salud pública. La AFB1 se origina en el hígado de los mamíferos luego del consumo de los alimentos contaminados con AFB1. La AFB1 se excreta en la leche y puede ser ingeridas por personas al consumir dicho alimento contaminado siendo los menores los más expuestos (Duartes, 2006; IARC, 2012).

Las ocratoxinas han sido estudiados en laboratorio y mostraron que la exposición a estas toxinas causa una disminución en el funcionamiento del riñón, pudiendo llegar a inducir adenomas renales. En su mismo estudio se percata que el riñón es el órgano más afectado a comparación de otros por esta toxina, e incluso también sean observado en hámsteres que son afectados por anomalías cardíacas y hepáticas, como lesiones del tracto gastrointestinal (Hagelberg, Hult y Fuchs, 1989). Además, estas micotoxinas pueden cruzar la placenta y acumularse en el tejido fetal, induciendo malformaciones del feto (Wu *et al.*, 2014). Las ocratoxinas son consideradas como un grupo 2B de posibles carcinógenos para humanos (WHO-IARC, 1993).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del Experimento

El presente trabajo de investigación se inició el 14 de agosto del 2018 en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología de Posgrado del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, que se encuentra ubicado en Calzada Antonio Narro # 1923 Col. Buenavista, Saltillo, Coahuila. En las coordenadas  $25^{\circ} 21' 17''$  de latitud Norte y  $101^{\circ} 01' 58''$  de longitud Oeste con respecto al meridiano de Greenwich a una altura de 1781 metros sobre el nivel del mar (msnm).



**Figura 11.-** Ubicación del experimento.

### Preparación de Medios de Cultivo

Se pesó 19.5 g de Agar Dextrosa y Papa, para hacer un litro en total, vaciándolo el polvo en 2 matraces de 1000 ml, agregándole agua destilada, con una porción de 500 ml cada una y así agitándolo continuamente. Después en la olla de presión dejamos hervir por  $21^{\circ}\text{C}$  durante 15 min posteriormente se apaga y



dejamos enfriar, le agregamos 1/2 ml de Gentamicyn Super a los recipientes respectivamente esto con la finalidad de que no se contaminen, por último, se esteriliza la cámara bioclimática y se vacía el medio en cajas petri según (Samson *et al.*, 1995).

### **Diluciones Seriadadas**

Se realizó esta prueba con el fin de identificar los hongos asociados a la harina de maíz de diversos materiales de 5 localidades del estado de Puebla de los cuales 5 eran híbridos y 2 criollos. Se esterilizó agua destilada en la olla de presión, se pesaron 10 g de harina de maíz y se añadió en matraces erlenmeyer con 90 ml de agua ya esterilizadas, se agito durante 30 min cada material, se tomaron 4 tubos de ensaye (-1, -2, -3, -4), agregándole 9 ml de agua destilada y colocándolo en la gradilla correspondiente, de la solución madre se tomó 1 ml con la pipeta y se le agrego al tubo -1, se agitó durante 10 segundos y de el mismo tubo se tomó 1 ml y se vació al tubo -2, se vuelve agitar por 10 segundos y se toma 1 ml de dicho tubo y se agrega al tubo -3, se agita otra vez por los 10 segundos y de el mismo -3 se toma 1 ml y se vacía al tubo -4. Después con la micropipeta se toman 1000 microlitros y se agregan al medio de cultivo ya identificado (cajas petri), se sella y se dejan encubar a 28°C para que el hongo desarrolle (NORMA COVENIN, 1995).

### **Purificación de Hongos**

De medios de cultivos se hicieron aislamientos, se dejaron encubar de 8 a 10 días para su desarrollo y así su propia identificación, con la finalidad de poder identificar la estructura del hongo y llegar a la especie.

## **Identificación de las Cepas**

Se desinfecto el lugar de trabajo y junto a un mechero, con una aguja de disección se extrajo el micelio del hongo aislado, en un portaobjeto con una gota de lactofenol se colocó el micelio extraído y se observó en el microscopio compuesto a 5X, 10X 40X y 100X, hasta obtener la estructura y forma del hongo aislado para su posterior identificación.

## **Pruebas de Micotoxinas**

**Aflatoxina:** Se pesaron 3 gr de harina de maíz, se pasaron a tubos de 50 ml agregándole 15 ml de metanol al 70% y se agitaron durante 3 min, posteriormente se filtró en vasos de precipitados. Se colocó una línea de micropocillos marcados en rojo y se agregó el material azul de conjugado de aflatoxina y peroxidasa de rábano (HRP) a cada micropocillo con la micropipeta a 100 microlitros, después le agregamos 100 microlitros de los controles (0, 5, 10 y 25) y a partir del micropocillo 5 se le agrega 100 microlitros de la muestra, pasamos 100 microlitros del micropocillo rojo al blanco que es el que contiene el anticuerpo y dejamos incubar 10 min a temperatura ambiente, movemos de enfrente hacia atrás por 30 seg, luego tiramos la muestra y lavamos 5 veces con agua desionizada y secamos con papel estéril, agregamos 100 microlitros del material verde de solución de sustrato K-Blue a los micropocillos con anticuerpo, reposamos 10 min a temperatura ambiente y movemos de enfrente hacia atrás, por último agregamos el material rojo que es nuestra sustancia detenedora 100 microlitros y leemos.

Para la prueba de ocratoxinas y fumonisinas el procedimiento fue el mismo a diferencia que la fumonisina ya no se hace el movimiento de los 30 seg.

## **Análisis Estadístico**

Se desarrolló un diseño completamente al azar con arreglo factorial donde el factor A corresponde a los materiales (b, m y p), Factor B son las diluciones (-1, -2, -3, y -4) y el Factor C el número de colonias de géneros de hongos identificados (*Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*).

Los datos se analizaron con el programa estadístico SAS ver. 9.1.3 Con un análisis de varianza (ANOVA) 0.05 % y separación de medias tomando como dato las UFC (unidad formadora de colonia).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Obtención de Número de Colonias en Cada Dilución

Como resultados obtenidos en cuanto a la prueba de Diluciones Seriadadas, donde trabajamos con 7 materiales de harina de maíz las cuales fueron 5 híbridos y 2 criollos, en el cual los híbridos se identificaron como Albatros, A-722 (este proveniente de la región Mazapiltepec), Faisan, Star y HC8. Los dos criollos uno de la región Tlachichuca y el otro de Atenco del Estado de Puebla.

En cada material se tomó una mazorca y se dividió en tres partes (b, m y p) de acuerdo a las diluciones seriadas se obtuvo el número de colonias, las cuales se registraron como UFC. En los siguientes cuadros se presentan el número de colonias y géneros de hongos que obtuvimos de la dilución (-1, -2, -3, y -4), con un periodo de 8 a 10 días de incubación a 28°C.

**Cuadro 8.-** Material Albatros en diluciones seriadas.

ALBATROS	DILUCIONES			
	-1	-2	-3	-4
Base	<i>Penicillium</i> (10)	<i>Aspergillus</i> (2)	<i>Aspergillus</i> (1)	<i>Penicillium</i> (1)
Media	Bacteria	<i>Penicillum</i> (1)	Bacteria	<i>Penicillium</i> (1)
Punta	Bacteria	<i>Aspergillus</i> (1)	<i>Aspergillus</i> (1)	Bacteria

**Cuadro 9.-** Material criollo de la región Tlachichuca en diluciones seriadas.

CRIOLLO (TLACHICUCA)	DILUCIONES			
	-1	-2	-3	-4
Base	<i>Penicillium</i> (2)	Bacteria	Bacteria	<i>Fusarium</i> (1)
Media	<i>Penicillium</i> (1)	<i>Penicillium</i> (50)	Bacteria	<i>Penicillium</i> (8)
Punta	<i>Penicillium</i> (4)	<i>Penicillium</i> (1)	Bacteria	<i>Penicillium</i> (1)

**Cuadro 10.-** Material criollo de la región Atenco en diluciones seriadas.

CRIOLLO (ATENCO)	DILUCIONES			
	-1	-2	-3	-4
Base	<i>Penicillium</i> (70)	<i>Penicillium</i> (40)	<i>Penicillium</i> (30)	<i>Penicillium</i> (20)
Media	<i>Penicillium</i> (1)	<i>Penicillium</i> (40)	<i>Penicillium</i> (7)	<i>Penicillium</i> (3)
Punta	<i>Aspergillus</i> (10)	Bacteria	Bacteria	Bacteria

**Cuadro 11.-** Material A-722 de la región Mazapiltepec en diluciones seriadas.

A-722 (MAZAPILTEPEC)	DILUCIONES			
	-1	-2	-3	-4
Base	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Media	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Punta	<i>Penicillium</i> (1)	<i>Penicillium</i> (20)	<i>Penicillium</i> (1)	Bacteria

**Cuadro 12.-** Material Faisan en diluciones seriadas.

FAISAN	DILUCIONES			
	-1	-2	-3	-4
Base	<i>Aspergillus</i> (1)	<i>Penicillium</i> (1)	Bacteria	Bacteria
Media	Bacteria	Bacteria	Rhizopus (1)	<i>Fusarium</i> (1)
Punta	<i>Fusarium</i> (1)	<i>Fusarium</i> (3)	<i>Penicillium</i> (1)	<i>Fusarium</i> (1)

**Cuadro 13.-** Material HC8 en diluciones seriadas.

HC8	DILUCIONES			
	-1	-2	-3	-4
Base	<i>Aspergillus</i> (5)	<i>Penicillium</i> (1)	Bacteria	<i>Fusarium</i> (1)
Media	<i>Penicillium</i> (50)	<i>Penicillium</i> (10)	<i>Penicillium</i> (2)	<i>Penicillium</i> (1)
Punta	<i>Aspergillus</i> (20)	<i>Aspergillus</i> (2)	<i>Aspergillus</i> (1)	Bacteria

**Cuadro 14.-** Material Star de la región Cerro Alto en diluciones seriadas.

STAR Cerro Alto	DILUCIONES			
	-1	-2	-3	-4
Base	<i>Penicillium</i> (4)	<i>Penicillium</i> (1)	<i>Penicillium</i> (1)	Bacteria
Media	<i>Aspergillus</i> (1)	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Punta	<i>Penicillium</i> (1)	<i>Fusarium</i> (1)	<i>Aspergillus</i> (1)	Bacteria

Las tablas muestran cómo en cada dilución de acuerdo al experimento dado sube el número de colonias y en ocasiones en otras es muy baja que a su vez también no solo géneros de hongos es lo que pudimos encontrar, sino que también se encontraron bacterias.

En las bacterias se hizo una prueba rápida “tinción de gram” donde en un portaobjeto se agrega una gota de agua destilada y del medio de cultivo se extra la muestra con un haza bacteriológica y se mezcla, dejándolo secar junto a un mechero pasando encima de la flama, se añade cristal violeta cubriendo toda la muestra y se deja actuar por 1 minuto para que tiña la bacteria y lavamos suavemente con agua, agregamos lugol y se deja actuar por 30 segundos y esto actúa como mordiente fijando el colorante, se lava con agua nuevamente y se agrega alcohol cetona 96 % para que se produzca la coloración de las bacterias y esperamos 15 segundos, lavamos con abundante agua y agregamos safranina con la finalidad que se tiñan las bacterias esperando 1 minuto y se lava con mucha agua y secamos pasando por la flama de un mechero y se observa la preparación al microscopio con el objetivo de 100 aumento con una gota de aceite de inmersión.

Bacterias gram (-) se tiñen de rosa o rojo por la safranina y bacterias gram (+) se tiñen de violeta por el cristal violeta (azul). Como resultados de los 7 materiales A-722 (Mazapiltepec) (M-4), Faisán (B-4), Albatros (M-1), criollo (Tlachicuca) (P-3) fueron negativos mientras que HC8 (B-3) y Star (P-4) fueron positivos, ya que el criollo Atenco no se encontró la cepa.

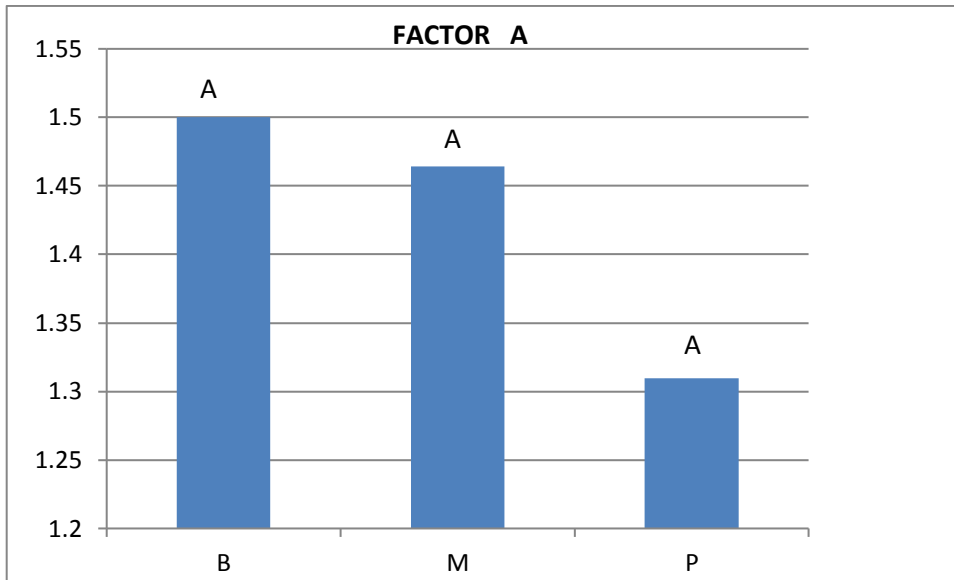
## Análisis Estadístico

Para obtención de análisis en el SAS ver. 9.1.3 (diseños factoriales) se usó una fórmula para obtener la UFC/ml. Donde el número de colonia por placa se multiplica por el factor de dilución [ $1 \cdot 10^9(-1)$ ,  $1 \cdot 10^8(-2)$ ,  $1 \cdot 10^7(-3)$ ,  $1 \cdot 10^6(-4)$ ] y dividiéndolo entre el ml de la muestra sembrada en este caso se sembró 0.5 ml y el resultado se analizó para la obtención de medias y el modelo estadístico.

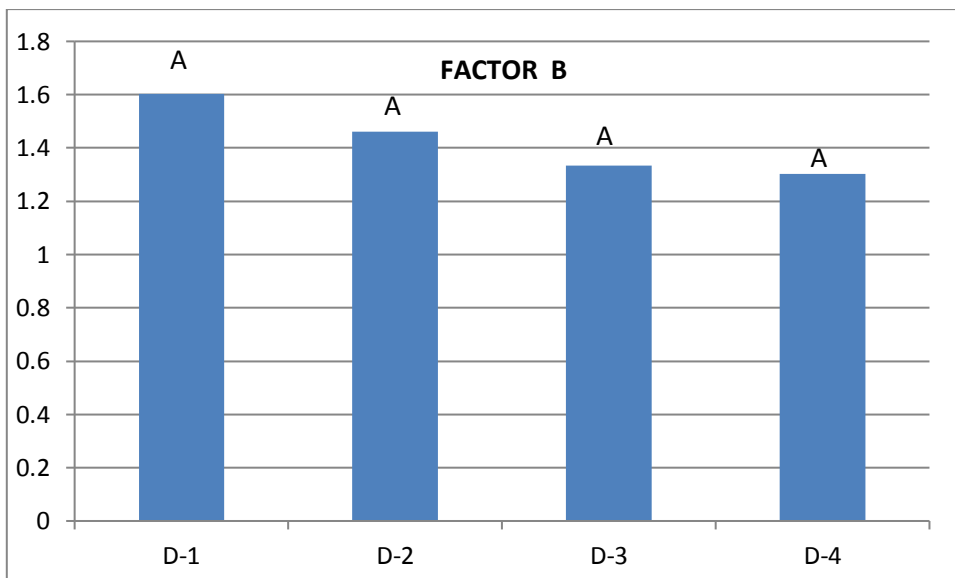
Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial donde el factor A son las partes analizadas (b, m, p), el factor B las diluciones, (-1, -2, -3 y -4) y el factor C géneros de hongos obtenidos (*Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium*). Los resultados obtenidos en el programa SAS ver. 9.1.3 nos muestra que en los factores A y B, existe diferencia significativa mientras que en el factor C no encontramos.

De acuerdo a las medias obtenidas y las diferencias que existen entre los factores se hicieron las gráficas donde se presentan los rangos que hay dentro de los factores (Figura 12) en el factor A que corresponde las partes analizadas podemos observar cómo cada nivel en el factor es elevado y en los otros muy bajos es decir que en la base de la mazorca hay más infestación de hongo a diferencia de la punta que es muy baja. Y en el factor B la dilución (-1) dentro del medio de cultivo presento más número de colonias siendo *Penicillium* de mayor rango.

El factor C es de más relevancia porque acá se presentan los hongos con mayor colonia siendo *Penicillium* el género que más se presenta en esa región, le sigue *Aspergillus* y después *Fusarium* es por ello que a continuación se presentan las siguientes gráficas obtenidas.

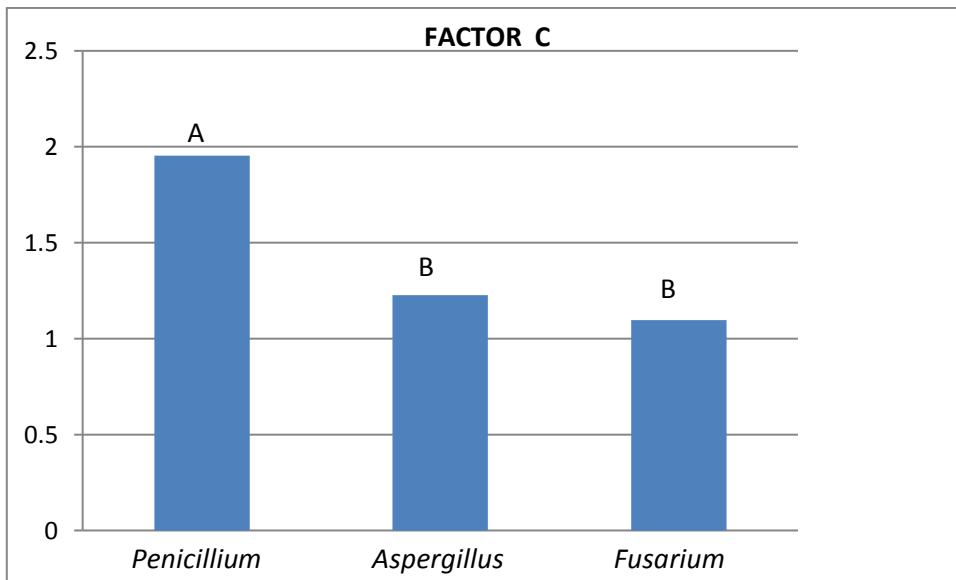


**Figura 12.-** Rango de variación de las medias en los niveles dentro del factor A.



**Figura 13.-** Rango de variación de las medias en los niveles dentro del factor B.





**Figura 14.-** Rango de variación de las medias en los niveles dentro del factor C.

### Observación e Identificación Microscópica

De acuerdo al número de colonias obtenidas y el género de hongos encontrados en maíz, pudimos observar e identificar los géneros de hongos y la especie que más se asemejan de acuerdo el color del micelio su crecimiento y la estructura. Como se muestran en las tablas anteriores encontramos 3 géneros de hongos distintos, las cuales en *Aspergillus* encontramos dos especies distintas *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*. Y los otros dos fueron *Penicillium oxalicum* y *Fusarium verticilloides* que a continuación se presentan.



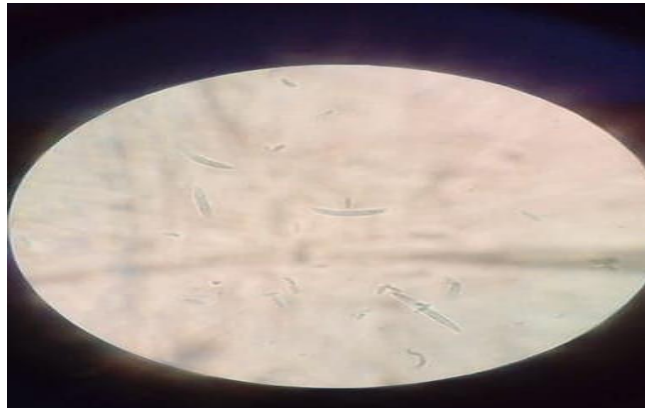
**Figura 15.-** Estructura de *Aspergillus flavus* en 100X.



**Figura 16.-** Estructura de *Aspergillus niger* en 100X.



**Figura 17.-** Estructura de *Penicillium oxalicum* en 100X.



**Figura 18.-** Estructura de *Fusarium verticillioides* en 100X.

Los hongos en harina de maíz se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las partes analizadas, mientras que en los géneros de hongos no se encontró diferencia por su alta incidencia. Los contajes de hongos oscilaron entre un rango de 441 de UFC por los gramos totales de harina de los 7 materiales. Para este caso el material criollo (Atenco) presento la mayor incidencia de hongos; estos resultados coincidieron con los reportados por la Organización

de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura FAO (1993), ya que las harinas con mayor proporción de germen se caracterizan por presentar alta contaminación fúngica.

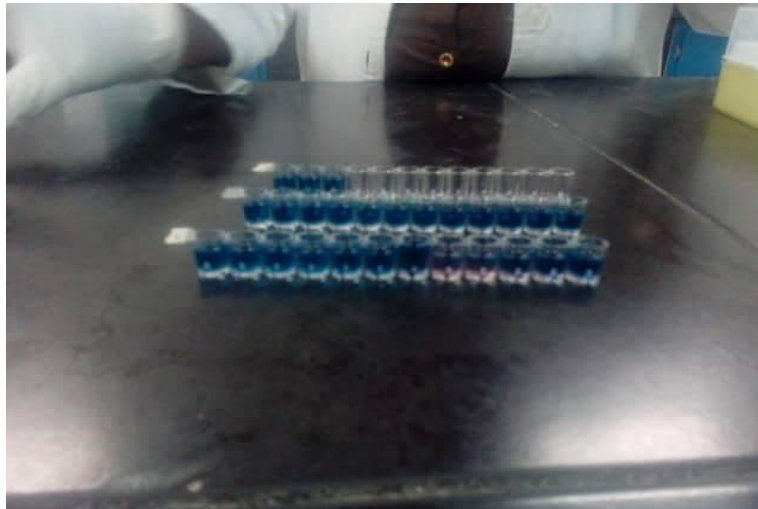
Los géneros y especies detectados fueron: *Aspergillus spp.* *A. niger*, *A. flavus*, *Penicillium oxalicum* y *Fusarium verticilloides*. Los hongos *Aspergillus flavus* y *Penicillium oxalicum* presentaron la mayor frecuencia e incidencia en las muestras analizadas en harina de maíz, aun la presencia de *P. oxalicum* en todas las muestras de materiales de cada región es relevante ya que esta especie es capaz de producir ocratoxina y presenta riesgos para la salud humana y de animal según (Aleph, 2004).

Coincidiendo estos resultados con la presente investigación. Otros hongos como *Penicillium aurantiogriseum* y *Aspergillus terreus* También han sido contaminantes en harina de maíz (Muriuki, 1995).

## Detección de Contaminación de Micotoxinas en Harina de Maíz

### Fumonisina

Para la prueba ELISA de micotoxina en harina de maíz se observó más color azul que significa menos fumonisina, en la figura (16) podemos observar en los micropocillos tenemos más color azul, que con los 5 controles que hicieron diferencia por su alta concentración de fumonisina en ppm. Ya que el micropocillo 1 tiene (0 ppm), el 2 (1 ppm), 3 (2 ppm), 4 (4 ppm) y el 5 (6 ppm), comparando con los que contiene la muestra.



**Figura 19.-** Detección de fumonisina en harina de maíz.

En este caso se mostró menos contaminación de fumonisina para la región del estado de Puebla ya que hubo más concentración en el color azul y para ello podemos decir que hay menos contaminación con cepas de hongos productores de estas, que en este caso es el género *Fusarium* y también menos casos en enfermedades para consumo humano y de animales.

## **Ocratoxina**

Para esta prueba de micotoxina en sus resultados esperados podemos mencionar que presentaron en los micropocillos un color azul muy fuerte a diferencia con los controles que presento disminución de color azul por su alta o baja concentración de ocratoxina en ppm. Donde el micropocillo 1 contiene (0 ppm), 2 (2 ppm), 3 (5 ppm), 4 (10 ppm) y 5 (25 ppm). Cabe señalar que también no tenemos contaminación de ocratoxina de la misma región con cepas de hongos productores de *Penicillium*, y otras especies de *Aspergillus* de esta manera podemos destacar que tanto como humanos y animales no existen casos en enfermedades producidas por este compuesto toxico.

## **Aflatoxina**

En esta prueba también son las mismas que fumonisina y ocratoxina, ya que en los resultados también nos presentó color azul a diferencia con los controles que contienen alta concentración de aflatoxina en ppm. Donde el micropocillo 1 contiene (0), 2 (5), 3 (15) y 4(50). Mas color azul menos fumonisina y en este caso la prueba mostro más color azul es por ello que también para esa región no existe contaminación de esta toxina que es productora de cepas de hongos del género *Aspergillus* con especies *A. flavus* y *A. niger* y así podemos mencionar que no hay casos en enfermedades tanto en humanos como en animales por esta toxina en dicha región.

De acuerdo a las pruebas realizadas cada tipo de micotoxina de la región del estado de Puebla de 7 materiales distintos de harina de maíz, donde podemos ver que no hubo niveles de contaminación en cada una de ellas al respecto Velluti (2002) menciona que existen muchos factores que determinan la producción de micotoxina tales como el potencial genético del hongo, actividad del agua, temperatura y nutrientes, es por eso que es probable que por estos factores influyeron su presencia de contaminación, además señala que la incidencia de una

especie fúngica micotoxigénica no indican necesariamente la presencia de micotoxinas, ya que no todas las cepas de las especies son toxicogénicas, aun con las condiciones óptimas, la producción de toxinas pueden ser nula. Las micotoxinas pueden persistir por un largo tiempo después que su desarrollo vegetativo del hongo haya cesado e incluso si el hongo ha muerto por lo que es posible detectado las cepas de la región Poblana y en este caso no obtuvimos presencia de estas toxinas.

## CONCLUSIONES

- ❖ Los géneros de hongos predominantes en harina de maíz fueron encontrados *Aspergillus*, *Fusarium* Y *Penicillium*. Siendo *Penicillium* el mayor género fúngico de contaminación.
  
- ❖ Dentro de los tres géneros de hongos las especies identificadas fueron: *Aspergillus spp.* *A. niger* y *A. flavus*, *Fusarium verticillioides* y *Penicillium oxalicum*.
  
- ❖ Dentro el análisis estadístico para la UFC en los factores A y B existe diferencia significativa y el C no existe diferencia por la mayor población de colonias.
  
- ❖ De las tres partes analizadas de la mazorca (b, m y p), la base es la más infestada de hongo.
  
- ❖ De los 7 materiales, el criollo (Atenco) es la que presento el 100% de colonias de *Penicillium* siendo el mismo con mayor incidencia, donde el material Faisan y Star presento 4.5 % de colonias.
  
- ❖ Los tres géneros encontrados pueden ser potencialmente toxigenicos.
  
- ❖ De los 7 materiales distintos, no se detectaron ningún tipo de micotoxina que pueda afectar a la población.



## BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, R. (2009). *El Cultivo del Maíz, su Origen y Clasificación*. El Maíz en Cuba. Cultivos Tropicales, vol. 30, N°2, p. 113-120.
- Aleph, Z. (2004). *Hongos y Micotoxinas*. Contaminantes Naturales y gran Riesgos para la Salud. 33:1-9.
- Azziz-Baumgartner, E., Lindblade, K., Gieseke, K., Schurz-Rogers, H., Kieszak, S., Njapau, (2005). H., *Aflatoxin Investigative group*. Case-control study of an acute aflatoxicosis outbreak, Kenya, 2004. Environmental Health Perspectives. 113(12), 1779-1783.
- Barnet, H.L., and Hunter, B.B. (1978). *Illustrated genera of imperfect fungi*. New York, USA: Fourth Edition. MacMillan Pub.Company. 217 p.
- Benitez, T., Rincon, A.M, Limon, M.C., Codon, A. (2004). *Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains*. International Microbiology. Vol 7: 249-260
- Bogates, L. P. Bogates, L. D. Bogates, L. S., (2004). *Aflatoxinas*. Acta médica costarricense Vol. 46 N°4.
- Briones, R. D.; Castillo, G. F.; Chávez, S. J. L.; Aguilar, R. V. H.; García, A. C. L. y Ramírez, H. A. (2015). *Respuesta del maíz nativo del altiplano mexicano a pudrición de mazorca, bajo infección*. Natural. Agron. Mesoam. 26(1):73-85.
- Cazco, C. (2006). *Maíz Cultivos andinos*. Clase tercer año de Ingeniería Agropecuaria. Universidad Técnica del Norte. Ibarra - Ecuador
- De León, C. (2008). *Principales enfermedades. En el Cultivo del Maíz Temas Selectos*. México: Mundi-prensa, 127 p.
- Díaz De Castro, F. J.; RESTREPO, M.A.; ROJAS W. (2007). *Microbiología de las infecciones humanas*. Medellín. Colombia: Primera Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas.

- Duartes, S, Villamil., LC. (2006). *Micotoxinas en alimentos*. Revista Salud Pública; 8(1): 129-135.
- Dunière, L., Sindou, J., Chaucheyras-Durand F. Chevallier, I. y Thevenot-Sergentet, D., (2013). *Silage precessing and strategies to prevent percistence of undesirable microorganisms*. Animal Feed Science and technology, 182:1-15.
- FAO. (1993). *El maíz en la nutrición humana*. Viale Terme di Caracalla, Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Fokunang, C. N., Tembe, E. A., Tomkins, P., Barkwan, S. (2006). *Global Impact of mycotoxins on human and animal health management*. Agriculture 35:247-253 pp.
- García, S. and Heredia, N. (2006). *Mycotoxins in Mexico: epidemiology, management, and control strategies*. Mycophatologia 162:255-264
- Gonzales, A. V. (1995). *El maíz y su conservación*. México: edit. Trillas, 214-252.
- González, H. A.; Vázquez, G. L. M.; Sahagún, C. J.; Rodríguez, P. J. E. y Pérez, L. D. J. (2007). *Rendimiento del maíz de temporal y su relación con la pudrición de mazorca*. Agric. Téc. Méx. 33(1):33-42.
- Hagelberg, S., Hult, K. y Fuchs, R. (1989). *Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties*. Journal Applied Toxicology. 9(2), 91-96.
- Hernández DS, Reyes LA, Reyes MCA, García OJG y Mayek PN. (2007). *Incidencia de hongos potencialmente tóxicos en maíz (Zea mays L.) almacenado y cultivado en el norte de Tamaulipas, México*. Revista Mexicana de Fitopatología 25:127-133.
- Hjort, C.M. (2003). *Genetically Engineered Food*. Alemania: Wiley, Wenheim, Págs. 86-89.

- IARC. (2012). Chemical Agents and Related Occupations: Review of Human Carcinogens-Aflatoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; 100: 225-248.
- Klich, MA. (2002). Identification of Common *Aspergillus* Species. First edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. The Netherlands. 166p.
- Krishnamachari, K. A. V. R., Bhat, R. V., Nagarajan, V. y Tilak, T. B. G. (1975). *Hepatitis due to aflatoxicosis an outbreak in western India. The Lancet.* 305(7915), 1061-1063.
- Lazzari, F. A., (1997). *Fungos. En: Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de sementes, Graos, e Racoes.* Paranaset, Curitiba. Pp. 23-38.
- Link H. F (1809). *Observationes in Ordines plantarum naturales.* Berlin: Dissertatio 1ma Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde, 3 (1809), pp. 3-42
- López-García López, G. Park, D., Phillips, T., (1999). *Sistema integrado de geastión de micotoxina.* Túnez, Túnez: Tercera Conferencia Internacional sobre micotoxinas. FAO/OMS/PMA.
- Marasas, W. F. O., Riley, R. T., Hendricks, K. A., Stevens, V. L., Sadler, T. W., van Waes, J. G. y Merrill Jr, A. H. (2004). *Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize.* The Journal of Nutrition. 134(4), 711-716.
- Missmer, S. A., Suarez, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill Jr, A. H., Rothman, K. J. y Hendricks, K. A. (2006). *Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas–Mexico border.* Environmental Health Perspectives. 114(2), 237-241.
- Miller, J. D. (1994). *Conference Report: Gth International Working Conference an stored – product Protection.* Australian Mycotoxin Newsletter. S: 1-8 pp.

- Montes, GN. Reyes, MCA, Montes RN, and Cantú AMA. (2009). *Incidence of potentially toxigenic fungi in maize (Zea mays L.) grain used as food and animal feed*. Journal of Food 7:119-125.
- Murray, P. R., Pfaller, M. A., Rosenthal, K. S. (2006). *Microbiología médica*. 5ta ed. Elsevier. 974 p.
- Muriuki, GK., (1995). *Maize flour contaminated with toxigenic and mycotoxins*. Kenya. Af J Health Sci; 2:236-41.
- Norma Venezolana COVENIN 1337-90 (1990). *Alimentos. Método para recuento de hongos y levaduras*. Comisión Venezolana de Normas Industriales.
- Nelson, P.E., Digna, M.C., and Anaissie E. J. (1994). *Taxonomy, biology and clinical aspects of Fusarium species*. Clinical Microbiology Reviews 7: 479-504.
- Pittet, A. (1998). *Natural Occurrence of mycotoxins in foods and feeds an updated review*. Rev Med Vet. 149:479-492 pp.
- Resnik, S.L. (1997). *Micotoxinas. Conferencia en el Primer Congreso Binacional de Producción Animal*. 21° Congreso Argentino (AAPA) y 2° Congreso Uruguayo (AUPA). Revista Argentina Producción Animal. 17: 221-225 pp.
- Richard, J. L. (2007). *Some major mycotoxins and their mycotoxicose - An overview*. International Journal of Food Microbiology. 119(1-2), 3-10.
- Rimblas, C. ME. (2004). *Los Compuestos Químicos en Alimentos desde la Perspectiva de las Seguridad Alimentaria*. España; ISBN 84-95393-46-8.
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J. y Larondelle, Y. (2006). *Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update*. Chemico-Biological Interactions. 159(1), 18-46.
- Samson R, Hoekstra E, Frisvad J, Filteborg O. (1995). *Introduction 19. to food borne fungi*. 4 Ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

- Samson, R.A., (1979). A compilation of the *Aspergillus* described since 1965. Stud. Mycol. 18: 1-40
- Sanabria, N; Guadarrama, A.; Romero, H. (2002). *Caracterización de especies de Fusarium mediante patrones electroforéticos de proteínas*. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Zulia. 28: 161-173.
- Soriano, J. M., Molto. J., Mañes, J. (2007). *Micotoxinas en Alimentos*. Días de Santos, España. Coord. Jose M. Soriano del Castillo. 396 p.
- Sumalan, R., Alexa, E., & Antena, M. (2013). *Assessment of inhibitory potential of essential oils on natural mycoflora and Fusarium mycotoxins production in wheat*. Chemistry Central Journal, 32.
- Varón de Agudelo, F. & Sarra V. A. (2007). *Enfermedades del maíz y su manejo*. Colombia: Produmedios.
- Velluti A. (2002). *Ecofisiología de especies de Fusarium productoras de fumonisinas, zearalenona y deoxinivalenol en maíz: aceites esenciales como inhibidores fúngicos*. Tesis doctoral. Universitat de Lleida. Lleida, España. 139 p.
- WHO-IARC, (1993). World Health Organization-International Agency for Research on Cancer. *Toxins derived from Fusarium moniliforme: fumonisins B1 and B2 and fusarin C*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 56, 445-462.
- Webster J. (1986). *Introduction to Fungi*. 2<sup>o</sup> ed. Cambridge University Press.
- Wu, F., Groopman, J. D. y Pestka, J. J. (2014). *Public health impacts of foodborne mycotoxins*. Annual Review of Food Science and Technology. 5, 351-372.
- Wösten, H.A.B., Scholtmeijer, K. y de Vries, R.P. (2007). *Hyperproduction of enzymes by fungi*. En: *Food Mycology*. Florida EEUU: A multifaceted approach to fungi and food. CRC Press, Boca Raton. Págs. 183–196.

[http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/ResumenProducto.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do)

<https://agriculturers.com/los-mayores-productores-de-maiz-encuentra-tu-pais/>

[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200637/Panorama\\_Agroalimentario\\_Maiz\\_2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200637/Panorama_Agroalimentario_Maiz_2016.pdf)

## ANEXOS

Fuente	DF	Cuadrado	Media de Cuadrado	Valor F	Pr > F
<b>Modelo</b>	35	72.4246032	2.0692744	1.69	0.0135
<b>Error</b>	216	265.1428571	1.2275132		
<b>Corrección total</b>	251	337.5674603			

R. Cuadrada	C. V	Raíz MSE	Media (UFC)
0.214549	77.77127	1.107932	1.424603

**Cuadro 1.-** Cuadrados medios y coeficiente de variación de variables cuantitativas de la UFC.

Fuente	DF	Tipo III SS	Media de Cuadrado	Valor F	Pr > F
FacA	2	1.72222222	0.86111111	0.70	0.4970
FacB	3	3.56746032	1.18915344	0.97	0.4083
FacC	2	35.81746032	17.90873016	14.59	< .0001
FacA* FacB	6	6.56349206	1.09391534	0.89	0.5022
FacA* FacC	4	14.20634921	3.55158730	2.89	0.0231
FacB* FacC	6	3.32539683	0.55423280	0.45	0.8434
FacA* FacB* FacC	12	7.22222222	0.60185185	0.49	0.9192

**Cuadro 2.-** Media de cuadrado por factores A, B, C y su probabilidad del valor F.

<b>Alfa</b>	0.05
<b>Grados de libertad error</b>	216
<b>Media de cuadrado error</b>	1.227513
<b>Valor crítico del rango</b>	3.33760
<b>Diferencia mínima significativa</b>	0.4035

**Cuadro 3.-** Tasa de error experimental tipo I y diferencia significancia de la facA.

<b>FACTOR A</b>	
<b>DMS</b>	<b>MEDIAS</b>
A	1.5000
A	1.4643
A	1.3095

**Cuadro 4.-** Factor A de rango de media donde existe diferencia entre los factores.

<b>Alfa</b>	0.05
<b>Grados de libertad error</b>	216
<b>Media de cuadrado error</b>	1.227513
<b>Valor crítico del rango</b>	3.66163
<b>Diferencia mínima significativa</b>	0.5111

**Cuadro 5.-** Tasa de error experimental tipo I y diferencia significancia del facB.



<b>FACTOR B</b>	
<b>DMS</b>	<b>MEDIAS</b>
A	1.6032
A	1.4603
A	1.3333
A	1.3016

**Cuadro 6.-** Factor B de rango de media donde existe diferencia entre los factores.

<b>Alfa</b>	0.05
<b>Grados de libertad error</b>	216
<b>Media de cuadrados error</b>	1.227513
<b>Valor crítico del rango</b>	3.33760
<b>Diferencia mínima significativa</b>	0.4035

**Cuadro 7.-** Tasa de error experimental tipo I y diferencia significancia del facC.

<b>FACTOR C</b>	
<b>DMS</b>	<b>MEDIAS</b>
A	1.9524
B	1.2262
B	1.0952

**Cuadro 8.-** Factor C de rango de media donde no existe diferencia entre los factores.