

ASPERGILLUS FLAVUS Y AFLATOXINAS EN EL MAIZ
DEL DISTRITO FEDERAL

por *Genoveva García-Aguirre** y
*Rebeca Martínez-Flores**

ASPERGILLUS FLAVUS AND AFLATOXINS IN CORN
KERNELS FROM MEXICO, D.F.

SUMMARY

Ninety corn kernel samples were assayed qualitatively for aflatoxin; fungi profiles were also made. *Aspergillus flavus* strains isolated were induced to produce aflatoxin. One third of the corn samples were contaminated with aflatoxin. Among the isolated *Aspergillus flavus* strains, 48% were able to produce different levels of aflatoxins.

RESUMEN

Noventa muestras de maíz fueron analizadas cualitativamente para aflatoxinas; también se hizo un perfil de los hongos. Las cepas de *Aspergillus flavus* aisladas, fueron inducidas a producir aflatoxinas. Entre las cepas de *Aspergillus flavus* aisladas, 48% fueron capaces de producir aflatoxinas en diferentes niveles.

* Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM, Apdo. Postal 70-233, México, D.F. 04510.

INTRODUCCION

Debido a que se considera importante conocer las condiciones de contaminación con aflatoxinas, en las que se encuentra el maíz que se consume en el Distrito Federal, se plantearon los siguientes objetivos: detectar la presencia de aflatoxinas en el maíz, determinar la micoflora en los granos identificando hasta especie las cepas del género *Aspergillus* y determinando además su capacidad para producir aflatoxinas.

MATERIALES Y METODOS

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

Determinación de aflatoxinas. Fueron utilizados dos métodos. Uno presuntivo (BGYF) descrito por Shotwell y Hesseltine (1981) y un método rápido semicuantitativo descrito por Shannon *et al.* (1973).

Micoflora. Los granos fueron desinfectados superficialmente y colocados en cajas de petri con extracto de malta (2%), NaCl (6%) y agar (2%) según Tuite (1969) e incubados durante ocho días a una temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Transcurrido ese tiempo, fueron contados e identificados a género los hongos de campo (*Penicillium*) y a grupo las cepas de *Aspergillus* que aparecieron. Todas las colonias fueron aisladas y purificadas para su posterior identificación a especie. En el caso del género *Aspergillus*, la identificación a especie se llevó a cabo mediante el uso de las claves de Raper y Fennell (1965). *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Penicillium* fueron identificados hasta género siguiendo la clave de Barnett y Hunter (1972).

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

Inóculo. Fueron utilizadas 46 cepas de *Aspergillus flavus* aisladas y purificadas del maíz en estudio. El inóculo fue incrementado en tubos inclinados con papa-dextrosa-agar.

Fermentación del sustrato. 150 g de arroz pulido más 75 ml de agua des-

tilada fueron agitados continuamente durante 2 horas, en matraces Erlenmeyer de 100 ml esterilizados a 121°C y 15 libras de presión por 15 min, y agitados nuevamente hasta su total enfriamiento. Para la inoculación, fueron utilizados 3 tubos de 7 días de incubación de cada cepa de *A. flavus* a los que les fue agregado 5 ml de agua destilada estéril para hacer una suspensión de esporas. El contenido de cada uno de los tubos fue agregado a cada uno de los matraces con el sustrato, quedando así una concentración de 15 ml de la suspensión de esporas, por 150 g de sustrato. La fermentación duró seis días a 30°C con agitación continua. Posteriormente los matraces fueron colocados 24 horas en cada una de las siguientes temperaturas sucesivamente: 15, 20 y 30°C . Al final de la fermentación los matraces fueron esterilizados.

Extracción. Después de la fermentación, muestras de 25g fueron tratadas con 250 ml de agua destilada y molidas en una licuadora durante cinco minutos; la mezcla fue centrifugada durante 15 minutos a 3000 rpm y filtrada a través de cuatro capas de manta de cielo a un matraz de separación. La fase de cloroformo fue tratada con 20g de Na_2SO_4 anhidro. Esta mezcla fue recibida en un embudo de Büchner y el filtrado reconcentrado al vacío en un evaporador rotatorio. Finalmente el residuo fue resuspendido en 10 ml de cloroformo y reconcentrado en viales de 20 ml en baño de vapor y una atmósfera de nitrógeno.

Cromatografía. Fueron utilizadas placas para cromatografía en capa fina precubiertas, de 20 x 20 cm, con un espesor de 0.25 mm (Merk 2721 D.C.). Los extractos fueron resuspendidos en 200 μl de una solución de benceno/cloroformo, 98/2, v/v, y agitados en un agitador Vortex durante un minuto. Las manchas fueron hechas siguiendo las rutinas corrientes para cromatografía en capa fina. La placa fue desarrollada en éter/metanol/agua destilada, 96/3/1, v/v/v, durante ± 40 min. Las concentraciones fueron calculadas por comparación visual.

Confirmación. Para confirmar los resultados del análisis químico fue utilizado el bioensayo de las larvas de *Artemia salina* (Denizel, 1982), que a pesar de no ser el mejor, resulta fácil y rápido de aplicar.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Fig. 1 se presenta el porcentaje de muestras de maíz, en las que fueron detectadas aflatoxinas. En 34% del total de las muestras analizadas con el método presuntivo (BGYF) fueron detectadas aflatoxinas; 32% resultaron positivas cuando se analizaron con el método rápido semicuantitativo.

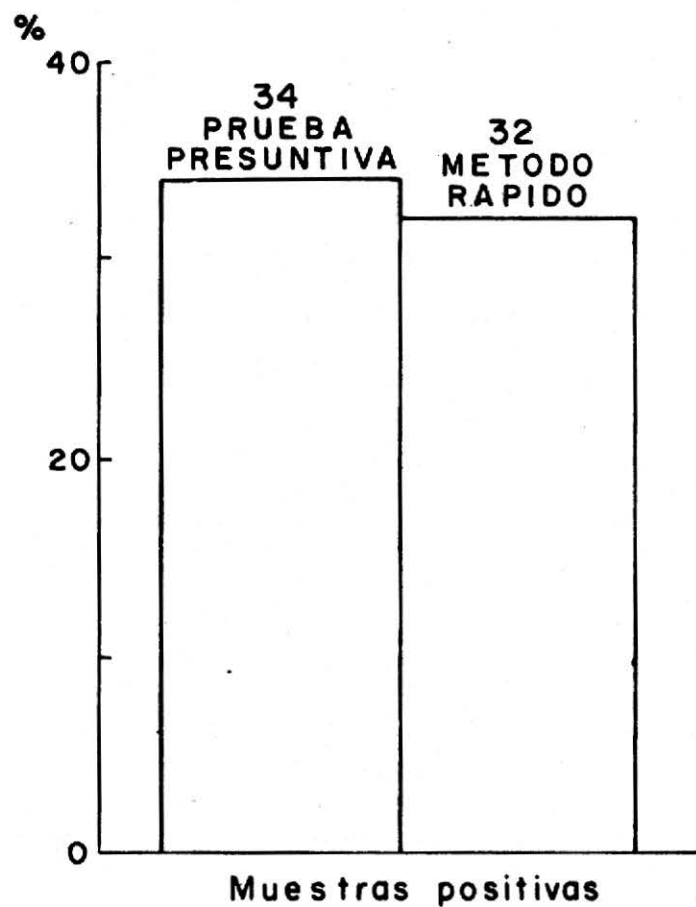


Fig. 1. Por ciento de muestras de maíz positivas para aflatoxinas según las técnicas usadas.

En la Fig. 2 se presenta el porcentaje de los granos invadidos por hongos, así como los géneros aislados y la proporción de los mismos en malta-sal-agar.

Ha sido demostrado que la mayoría de las especies de hongos de almacén no invaden significativamente a los productos agrícolas antes de su cosecha

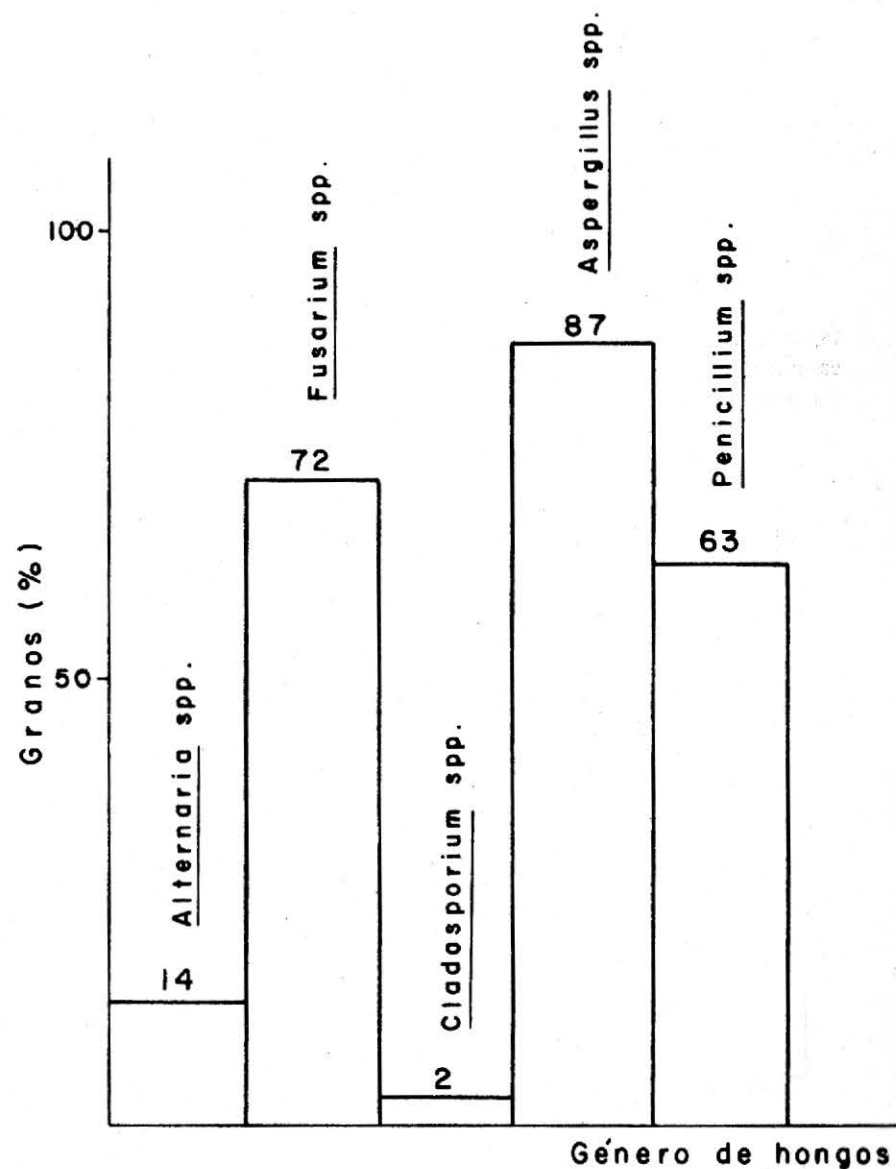


Fig. 2. Por ciento de granos de maíz invadidos por hongos.

(Tuite y Christensen, 1957). La presencia de *Aspergillus* en las proporciones encontradas (87%) hacen pensar en lotes de maíz mal almacenados; sin embargo, la presencia de las especies de *Fusarium* en proporciones tan altas (72%) sugiere que se trata de maíz recién cosechado de lo que se infiere que el grano analizado estaba mezclado, ya que las poblaciones de hongos de campo se van reduciendo con el tiempo de almacenamiento y en el caso particular de *Fusarium*, éste muere relativamente rápido en los granos almacenados (Christensen y Kaufmann, 1976).

El caso de *Penicillium* es particularmente interesante ya que algunas especies han sido aisladas de maíz en sus últimas etapas de formación en el campo (Mislivec, 1970) y otras en granos después de períodos largos de almacenamiento. En la Fig. 3 se presenta la frecuencia con la que los granos fue-

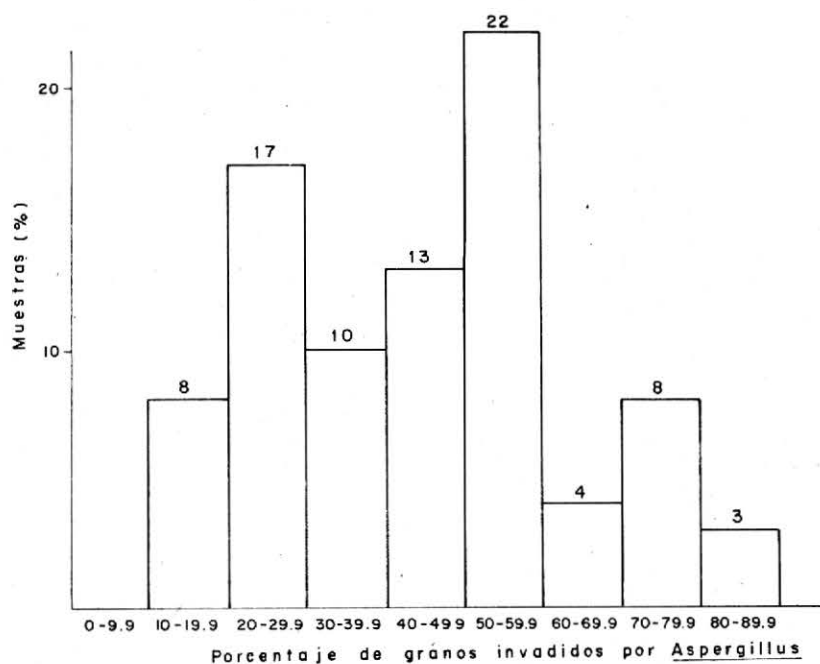


Fig. 3. Porcentaje de granos invadidos por *Aspergillus* en las diferentes muestras de maíz analizadas.

ron invadidos por especies de *Aspergillus* en las diferentes muestras analizadas. No hubo muestras contaminadas con menos de 9.9 % de *Aspergillus*. En 22% de las muestras, 50-59.9% de los granos estuvieron contaminados con el hongo y más del 80 % de los granos invadidos por *Aspergillus* fueron encontrados en 3% de las muestras.

Los grupos de *Aspergillus* a los que pertenecen las especies aisladas son: *Aspergillus glaucus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. flavus* y *A. terreus*. Las especies identificadas (Fig. 4) fueron, dentro del grupo *Aspergillus glaucus*: *A. repens* De Bary en 72% del total de los granos, *A. ruber* (Konig, Spieckerman & Bremer) Thom & Church en 59% de los granos, *A. chevalieri* (Mangi) Thom & Church en 99% de los granos y *A. amstelodami* (Mangin) Thom & Church en 33% del total de los granos. El grupo *A. glaucus* ha sido registrado como uno de los que se encuentran con más frecuencia deteriorando granos almacenados (Christensen y Kaufmann, 1974).

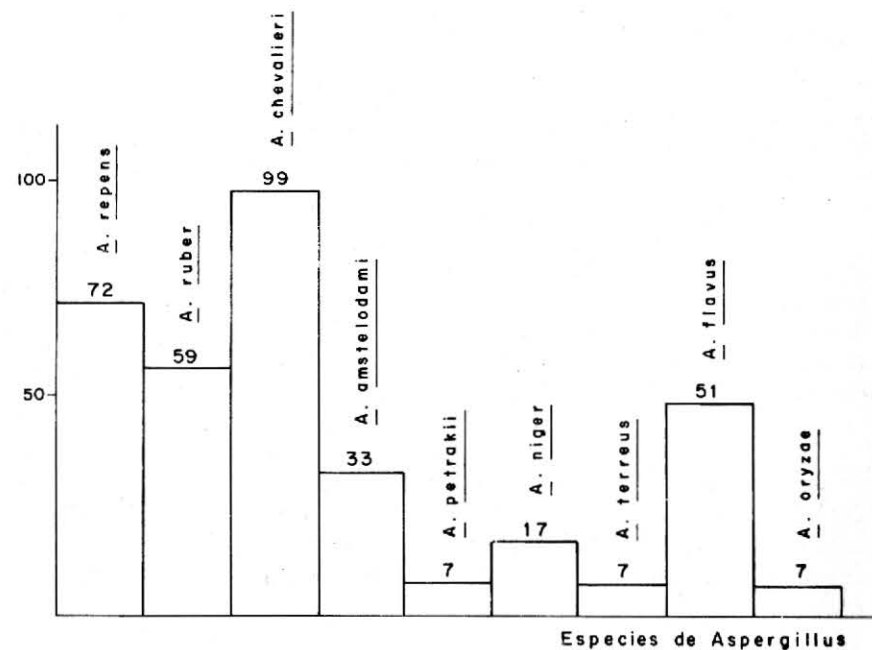


Fig. 4. Porcentaje de granos invadidos por especies del género *Aspergillus*.

El grupo *A. ochraceus* es uno de los que tienen el número mayor de especies dentro del género; además algunas de sus especies producen compuestos tóxicos, llamados ocratoxinas. De este grupo fue identificada una sola especie, *A. petrakii* Voros en 7% del total de los granos.

El grupo *A. niger* es especialmente amplio por el número de especies que lo forman. A pesar de ser muy importante por el número de especies y las características de las mismas, algunas de las cuales son usadas en diferentes industrias, no son hongos que se consideren importantes en el deterioro de los granos almacenados. De este grupo fue aislado *A. niger* V. Tiegh. en 17% de los granos.

El grupo *A. terreus*, solamente tiene una especie y dos variedades. Este grupo no es común en los granos y es poco frecuente en maíz (Lichtwardt *et al.* 1958); *A. terreus* Thom, fue identificado en 7% del total de los granos.

El grupo *A. flavus* resulta particularmente importante, ya que algunas cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* son capaces de producir aflatoxinas, consideradas como los carcinógenos más potentes conocidos a la fecha y ésta es la razón por la cual las especies aisladas fueron inducidas para producir dichas substancias. Las especies aisladas fueron *A. flavus* Link en 51% del total de los granos y *A. oryzae* en 7%.

En la Fig. 5 se presenta la frecuencia de los granos invadidos por el grupo *A. flavus* en las diferentes muestras examinadas. No hubo muestras contaminadas con menos del 9.9%, de ellas el 22% tuvieron una contaminación de 10-19.9%; en 8% de las muestras 20-29.9% de los granos estuvieron contaminados; 30-39.9% de los granos estuvieron invadidos en el 3% de las muestras; el 1% de las muestras presentaron 50-59.9 % de granos invadidos.

De las 46 cepas de *Aspergillus flavus* inducidas a producir aflatoxinas, 30 (65%) fueron capaces de producirlas. La producción de aflatoxinas varía de cepa a cepa; así de las 30 cepas productoras, 16 (53%) produjeron los mencionados compuestos en cantidades detectables pero no cuantificables con el método utilizado y 14 (47%) produjeron aflatoxinas en cantidades cuantificables.

En la tabla 1 se presentan los resultados de la producción de aflatoxinas expresada en $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de granos de las diferentes cepas de *A. flavus* y se com-

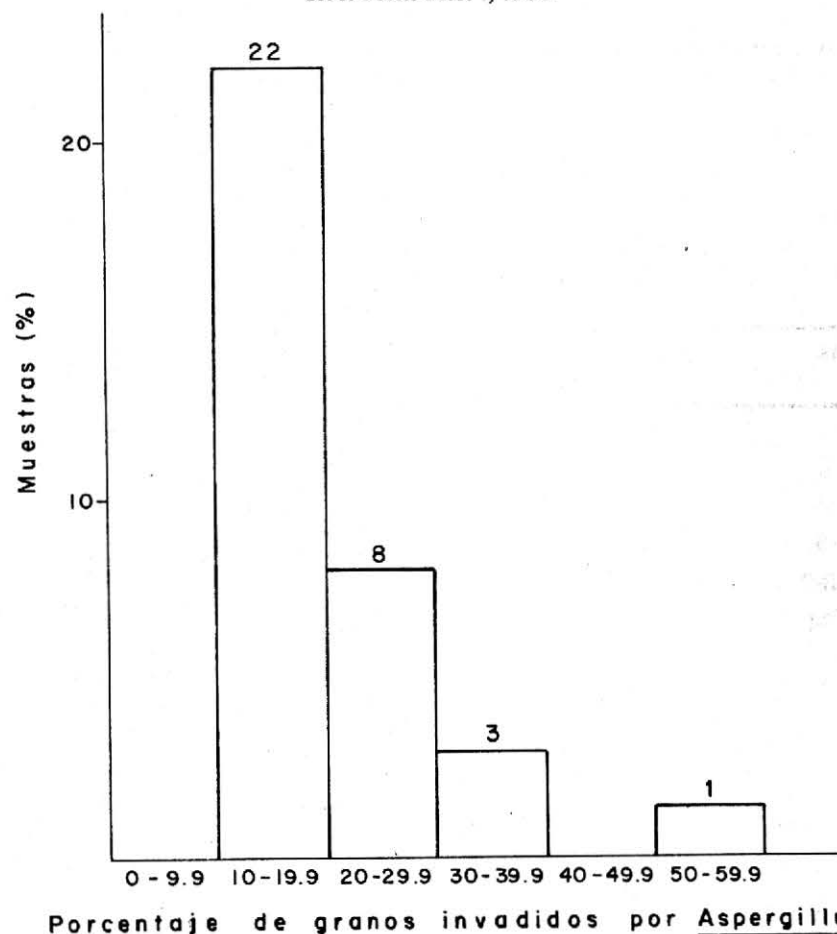


Fig. 5. Porcentaje de granos invadidos por el grupo *Aspergillus flavus* en las diferentes muestras analizadas.

para las concentraciones de los extractos con la mortalidad de las larvas.

Es preocupante observar las concentraciones de aflatoxinas obtenidas, ya que son muchos los países que han establecido tolerancias que han o están

siendo incorporadas en sus legislaciones para concentraciones de aflatoxinas en diferentes alimentos o productos alimenticios y éstos van de 0-1000 μ g/Kg. (Krogh, 1977).

Tabla 1

Relación entre niveles de aflatoxinas (μ g/Kg) y porcentaje de larvas de *Artemia salina* muertas.

Cepas.	Concentración de aflatoxinas	% de larvas muertas
4-17-B	200,000	100
5-23-A	132,000	100
5-33-B	52,000	99
5-13-B-2	20,000	100
4-13-B-1	14,000	100
5-4-A	8,000	44
5-7-A	7,000	52
5-7-B-1	1,000	14

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, es posible concluir que el maíz consumido durante el verano de 1983 estaba altamente contaminado con aflatoxinas, una tercera parte del total, así como con hongos (87% de *Aspergillus*, 72% de *Fusarium* y 63% de *Penicillium*).

Este trabajo se centró en el grupo *Aspergillus flavus*, aislado en 58% del total de los granos analizados; de las dos especies estudiadas, *A. flavus* ha sido registrada como productora de aflatoxinas. La presencia de *Fusarium* y *Penicillium* en las proporciones encontradas es inquietante, ya que ambos géneros han sido registrados como productores de micotoxinas.

LITERATURA CITADA

- Barnett, H.L. y B.H. Hunter, 1972. **Illustrated genera of imperfect fungi**. Burgess, Minneapolis, 3a. ed. 241 p.
- Christensen, C.M. y H.H. Kaufmann, 1974. **Micoflora**. In: C.M. Christensen. Ed., **Storage of cereal grains and their products**. American Association of Cereal Chemists, St. Paul. 158-192.
- Denizel, T., 1982. A rapid bio-assay for screening mycotoxins using brine shrimp (*Artemia salina*) larvae. In: **Handbook on rapid detection of mycotoxins OCDE OECD**. 8-12.
- FAO, 1978. Informe de la conferencia mixta FAO/OMS/PNUMA, sobre micotoxinas celebrada en Nairobi del 19-27 de septiembre de 1977. Roma.
- Krogh, P., 1977. Mycotoxin tolerances in foodstuffs. **Pure and Appl. Chem.** 49: 1719-1721.
- Lichtwardt, W.R., G.L. Barron y L.H. Tiffany, 1958. Mold flora associated with shelled corn in Iowa. **Iowa State Coll. J. Sci.** 33: 1-11.
- Mislivec, P.B. y J. Tuite, 1970. Species of *Penicillium* occurring in freshly harvested and in stored dent corn kernels. **Mycologia** 62: 67-74.
- Raper, K.B. y D.I. Fennell, 1965. The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins, Baltimore. 686 p.
- Shannon, G.M., R.D. Stubblefield y O.L. Shotwell, 1973. Modified rapid screening method for aflatoxin in corn. **JAOAC** 56: 1024-1025.
- Shotwell, O.L. y C.W. Hesseltine, 1981. Use of Bright Greenish Yellow Fluorescence as a Presumptive Test for Aflatoxin in Corn. **Cereal Chem.** 58: 124-127.
- Shotwell, O.L., C.W. Hesseltine, R.D. Stubblefield y W.G. Sorenson, 1966. Production of aflatoxin on rice. **Appl. Microbiol.** 14: 425-428.
- Tuite, J., 1969. **Plant pathological methods in fungi and bacteria**. Burgess, Minneapolis. 239 p.
- Tuite, J. y C.M. Christensen, 1957. Grain Storage studies XXIII. Time of invasion of wheat seed by various species of *Aspergillus* responsible for deterioration of stored grain, and source of inoculum of these fungi. **Phytopathology** 47: 265-268.