

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas.



**ANALISIS DE LA PRODUCCIÓN DE
AFLATOXINAS EN LAS CEPAS DE *Aspergillus sp.*
RELACIONADO AL EFECTO DE LA
TEMPERATURA SOBRE LOS FRUTOS DE
CASTAÑA (*Castanea sativa miller*).
PANDO-BOLIVIA, 2009**

Tesis para optar al título de licenciatura en Bioquímica

Elaborado por: Julio Cesar Gutierrez Condori.

**La Paz – Bolivia
2010**

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas.



**ANALISIS DE LA PRODUCCIÓN DE
AFLATOXINAS EN LAS CEPAS DE *Aspergillus sp.*
RELACIONADO AL EFECTO DE LA
TEMPERATURA SOBRE LOS FRUTOS DE
CASTAÑA (*Castanea sativa miller*). PANDO-
BOLIVIA, 2009**

Tesis para optar al grado de licenciatura en Bioquímica

Elaborado por: Julio Cesar Gutierrez Condori.

**Asesores: Enrique Terrazas Siles Ph.D.
Teresa Alvarez Ph.D.
Mg.Sc. Oscar Cardenas Alegria**

**La Paz – Bolivia
2010**

Con gratitud dedico este trabajo a:

Mi madre Pilar



Agradecimientos

Esta tesis se ha podido realizar gracias a la colaboración de muchas personas. Quisiera agradecer a todas ellas en su participación.

Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. Enrique Terrazas Siles por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador. Las ideas propias, siempre enmarcadas en su orientación y rigurosidad, han sido la clave del buen trabajo que hemos realizado juntos, el cual no se puede concebir sin su siempre oportuna participación. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Muchas gracias Doctor.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al Mg.Sc. Oscar Cardenas por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar, por encima de todo, su disponibilidad y paciencia que hizo que nuestras siempre acaloradas discusiones redundaran benéficamente tanto a nivel científico como personal. No cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado y, además, ha significado el surgimiento de una sólida amistad.

Para mis compañeros de grupo, pregrado y posgrado que contribuyeron en el desarrollo de esta tesis Christian (Alocubano), Ivan (El fraile), Reynaldo (El topo), Nestor (Sagan), Gatuzo (bebe con barba), Carla (Chica sexi), Claudia (Pollitos) y Marcelo Maldonado (Patricio). Si me olvide de alguien como Farha no fue intencional como en el caso de "Q" o de otros amigos.

A mis hermanos Martin, Raúl Elizabeth e Isabel les agradezco el apoyo moral y confianza a mi persona que siempre me lo demostraron.

GRACIAS

RESUMEN.

En el presente trabajo de tesis se realizó una primera investigación sobre la producción de micotoxinas por *Aspergillus* en muestras de castañas provenientes del departamento de Pando. Las aflatoxinas son agentes nocivos producidos por la naturaleza presente en diferentes frutos secos así como la castaña, estas micotóxicas son considerados mutagénicos, teratogénicos y hepatotóxicos para muchas especies vivas incluyendo los humanos. Las muestras de castañas previamente recolectadas por la empresa Tahuamanu, fueron analizadas en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), en donde se aislaron e identificaron por diferentes técnicas y se observaron características del hongo así como, conidias, hifas y otras propias de las especies de *A.flavus* y *A. niger*. además se confirmó las especies halladas con un análisis molecular. En cuanto a lo que se refiere la cuantificación de aflatoxinas totales este se utilizó el método fluorimétrico evaluando los extractos de las aflatoxinas obtenidos de castañas trituradas e inoculadas con esporas de *A.flavus* y *A.niger* las mismas fueron incubadas a 10°, 20° y 30° C por el tiempo de ocho días. Obteniéndose una mayor producción de micotoxinas a 30° C, sobretodo existió una mayor producción en la cepa de *A.flavus*, presentando incrementos netos de aflatoxinas totales a partir del cuarto día de incubación alcanzando niveles máximos de hasta 582,81ppb. Similar efecto ocurre con la cepas de *A. niger* a 30° C con niveles máximos al octavo día de 501,48 ppb, Para la caracterización de las aflatoxinas se utilizó una muestra aleatoria de los extractos totales de aflatoxinas para el posterior análisis con el HPLC, en donde se logró apreciar los cuatro picos de aflatoxinas B1, G1, B2 y G2 presentes en la muestra.

PALABRAS CLAVE: aflatoxinas, *A.flavus* y *A.niger*.

ABSTRACT

In this work of research was performed first on the production of mycotoxins by *Aspergillus* in samples of chestnuts from the department of Pando. Aflatoxins are harmful agents produced by nature in different fruits and chestnuts, these mycotoxins are considered mutagenic, teratogenic and hepatotoxic for many living species including humans. Chestnut samples previously collected by the company Tahuamanu were analyzed at the Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímicas (IIFB), where isolated and identified by different techniques and observed characteristics and fungal conidia, hyphae and typical of other *A.flavus* species and *A. niger*, also confirmed the species found with a molecular analysis. As regards the quantification of total aflatoxins this fluorimetric method was used to assess the aflatoxin extracts obtained from crushed nuts and inoculated with spores of *A.niger* *A.flavus* and these were incubated at 10° , 20° and 30° C for as long as eight days. Obtaining an increased production of mycotoxins at 30° C, especially there was a greater production *A.flavus* strain, showing net increases in total aflatoxins from the fourth day of incubation to reach maximum levels of 582.81 ppb. A similar effect occurs with the strains of *A. niger* at 30° C with maximum levels on the eighth day of 501.48 ppb, for the characterization of aflatoxin use a random sample of extracts from aflatoxin for further analysis with HPLC, where he managed to see the four peaks aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in the sample.

KEY WORDS: aflatoxins, *A.niger* and *A.flavus*.

TABLA DE CONTENIDO

	Pag.	
1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	6
2.1	<i>Bertholletia excelsa</i>	7
2.2	<i>Castanea sativa miller</i>	8
2.3	<i>Aspergillus y Aflatoxinas</i>	10
2.3.1	<i>Aspergillus</i>	10
2.3.1.1	Historia	10
2.3.1.2	Taxonomía e identificación	10
2.3.2	Aflatoxinas	11
2.3.2.1	Clasificación	11
2.3.2.2	Estructura de la aflatoxinas	14
2.3.2.3	Características y propiedades físicas	15
2.3.2.4	Aflatoxina B ₁	15
2.3.2.5	Aflatoxina B ₂	15
2.3.2.6	Aflatoxina G ₁	16
2.3.2.7	Aflatoxina G ₂	17
2.3.2.8	Aflatoxina B _{2a}	17
2.3.2.9	Aflatoxina G _{2a}	17
2.3.2.10	Características químicas y físicas generales	18
2.3.2.11	Producción de aflatoxinas	18
2.3.2.12	Reglamentación y límites permisibles	18
2.4	Cromatografía HPLC	20
2.5	Fluorimetría	21
2.6	Identificación molecular de los hongos	21
2.6.1	Genes ribosomales	22
3.	OBJETIVOS	26
3.1	Objetivo General	27
3.2	Objetivo Específicos	27

4.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1	Procedencia de la muestra	30
4.2	Aislamiento del patógeno	30
4.3	Identificación del hongo	30
4.4	Observación macroscópica	30
4.5	Observación microscópica	31
4.6	Técnicas moleculares	31
4.6.1	Extracción del DNA genómico	31
4.6.2	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
4.6.3	Análisis de secuencias	32
4.7	Verificación de la presencia de aflatoxinas por el método cromatográfico HPLC	33
4.7.1	Análisis de las muestras	33
4.8	Cuantificación por el método fluorimétrico	34
4.8.1	Curva de calibración de aflatoxinas en el fluorímetro	34
4.8.2	Producción de toxinas	34
4.8.3	Extracción de toxinas	35
4.8.4	Cuantificación de las muestras	35
4.9	Análisis estadístico	36
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1	Identificación macroscópica	39
5.1.1	Características macroscópicas cepa AF (<i>Aspergillus flavus</i>)	39
5.1.2	Características macroscópicas cepa RB (<i>Aspergillus niger</i>)	40
5.2	Identificación microscópica	41
5.2.1	Características microscópicas cepa AF (<i>Aspergillus flavus</i>)	41
5.2.2	Características microscópicas cepa RB (<i>Aspergillus niger</i>)	42
5.3	Identificación molecular	43
5.4	Análisis filogenético	44
5.5	Cuantificación de aflatoxinas totales por el método fluorimétrico	46
5.5.1	Cepa AF (<i>Aspergillus flavus</i>)	46
5.6	Cepa RB (<i>Aspergillus niger</i>)	48

5.7	Confirmación de aflatoxinas por HPLC	52
6	CONCLUSIONES	54
7	BIBLIOGRAFIA	56



INDICES FIGURAS

Figura 1.	Ubicación de la Región productora de castaña boliviana	7
Figura 2.	Fruto de la castaña	8
Figura 3.	Estructura química de las aflatoxinas B1, G1, B2, Y G2 además de sus derivados	14
Figura 4.	Genes ribosomales y sus espacios interunidades, espacios intergenicos y dominios de la subunidad grande.	25
Figura 5.	Muestras de castaña facilitadas por la empresa TAHUAMANU en el 2009.	38
Figura 6.	Características macroscópicas en Placas de PDA donde se observa el desarrollo de la cepa AF (<i>Aspergillus flavus</i>) y se aprecia la coloración característica del hongo	39
Figura 7.	Placa de PDA con desarrollo de la cepa RB (<i>Aspergillus niger</i>) se aprecia la coloración característica del hongo. IIFB-2009	40
Figura 8.	Características microscópicas cepa AF (<i>Aspergillus flavus</i>) tomadas a 100X.IIFB-2009	41
Figura 9.	Características microscópicas de la cepa RB (<i>Aspergillus niger</i>) tomadas a 100X.IIFB-2009	42
Figura 10.	Características microscópicas de la cepa RB (<i>Aspergillus niger</i>) tomadas a 100X. IIFB-2009	43
Figura 11.	Árbol filogenético de <i>Aspergillus sp</i> basado en la secuencia del gen rDNA 26S de <i>Aspergillus cepas AF y RB</i> aislados de muestras de castaña contaminadas del departamento de PANDO-BOLIVIA.	45
Figura 12.	Concentración de aflatoxinas en ppb vs. Días de incubación a tres diferentes temperaturas de la cepa AF.	47
Figura 13.	Concentración de aflatoxinas en ppb vs. Días de incubación a tres diferentes temperaturas de la cepa RB.	49
Figura 14.	Cromatogramas de aflatoxinas standart.	52
Figura 15.	Cromatogramas de aflatoxinas standart obtenidas a partir de extracto de castaña contaminada con AF.	53

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.	Composición química de la castaña.	9
TABLA 2.	Dosis letal 50 mg/Kg via oral de aflatoxina.	13
TABLA 3.	Límite máximo permisible en distintos países del mundo para aflatoxina B ₁ y aflatoxinas totales.	19
TABLA 4.	Límites máximos de contaminación por aflatoxinas (en mg/kg O ppb) en alimentos e ingredientes de uso animal.	19
TABLA 5.	Cuantificación de aflatoxinas totales de la cepa AF en ppb empleando el método fluorimetrico.	48
TABLA 6.	Cuantificación de aflatoxinas totales de la cepa RB en ppb empleando el método fluorimetrico.	49
TABLA 7.	Comparacion de producción en ppb de aflatoxinas totales a diferentes temperaturas	51

1. INTRODUCCIÓN



Las micotoxinas como su nombre lo indica, son metabolitos tóxicos producidos por hongos, básicamente de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Estos, cuando encuentras las condiciones ambientales propicias, se multiplican rápidamente y, como producto de su metabolismo, secretan micotoxinas estas son moléculas relativamente pequeñas y están conformadas por una gran diversidad de estructuras químicas orgánicas, hasta el momento se conocen más de 400 micotoxinas descritas hasta la fecha y solamente unas doce han sido experimentalmente documentadas como importantes para la salud humana y animal, ejerciendo sus efectos negativos por medio de tres mecanismos básicos ® (AgroBioTek 2009.)

- Disminuyen el contenido nutritivo, la absorción y el metabolismo de los alimentos
- Inducen cambios neuroendocrinos
- Causan una intensa supresión del sistema inmune, lo cual aumenta la propensión de infecciones oportunistas

Una de las primeras mas estudiadas se tiene referencias en cuanto a sus características estructurales son las aflatoxinas (Carrillo Leonor,2003), las aflatoxinas descubiertas en 1960, fueron relacionadas con la muerte de 100,000 pavos en Inglaterra por la ingesta de maní de contaminado con aflatoxinas de origen Brasileño. El término "micotoxinas" se definen como productos naturales de origen fúngico que provocan una respuesta tóxica cuando son administrados en bajas concentraciones a grandes vertebrados es así que en el humano las enfermedades y síndromes relacionados con estas son denominadas como *micotoxicosis*(Lazo Ramon,2008); además pueden desarrollar fitotoxicidad en plantas.

Las micotoxinas son sustancias extremadamente tóxicas, químicamente diversas y de poca solubilidad en agua, poseen bajo peso molecular, la mayoría tiene una estructura de anillos aromáticos y son muy resistentes a la inactivación por métodos físico, químicos y biológicos.

Las aflatoxinas son las más frecuentes y dañinas en cantidades trazas ($\mu\text{g}/\text{kg}$ o partes por billón), estas aflatoxinas no tienen sabor, color ni olor pero presentan fluorescencia con luz ultravioleta, son resistentes a altas temperaturas (de 260 a 320°C) sin embargo los procesos de eliminación así como someter a altas temperaturas, pasteurizar los alimentos, y otros no las eliminan por completo. Su composición química corresponde a bis-dihidrofuranos cumarinas que tienen bajo peso molecular.

Las aflatoxinas reciben su nombre de 'a' = *Aspergillus*, 'fla' = flavus y 'toxina' = veneno, o sea el veneno del hongo *Aspergillus flavus*, son producidas por 3 especies del hongo *Aspergillus* que son *A. flavus*, *A. niger* y *A. parasiticus*.

El *Aspergillus*, es un hongo saprófito que vive en el suelo, en plantas vivas o en rastrojo. Sus esporas son transportadas por el aire, agua o insectos vectores. En época de sequía la única fuente de agua del hongo son las plantas y ataca con más severidad que cuando los cultivos tienen riego, donde la contaminación por *A. flavus* disminuye.

Como las aflatoxinas son compuestos altamente ionizables y por ello muy reactivos, se unen al ADN, ARN y proteínas formando aductos que son biomarcadores útiles de enfermedad, y estos no se forman con otras micotoxinas como las fumonisinas. Actualmente, por el creciente mercado internacional, los productos alimenticios y sus derivados, se encuentran distribuidos alrededor de todo el mundo, por lo que los posibles efectos sobre los productos contaminados no se restringen sólo al país productor (Caballero Jesús, 2005).

La Nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa*), es originaria de la selva húmeda tropical de la amazonía que abarca los países Venezuela, Colombia, Bolivia, Perú, Guayana y Brasil. En la región norte de Bolivia, constituye uno de los productos forestales no maderables (PFNM) más importantes. *Bertholletia excelsa* es conocida con el nombre común de nuez de Brasil, es producida en la región amazónica y tiene un gran mercado en Europa y Norte América (Augstburger, 2000).

La recolección y venta de los frutos comestibles de la castaña puede ser de importancia crítica para la conservación de los bosques húmedos de la Amazonia, con todos los valores concomitantes para la biodiversidad y el calentamiento global. Estos grandes árboles emergentes brindan una razón apremiante para conservar el bosque, ya que proveen ingresos para los pobladores de la zona y empleo a los habitantes de zonas urbanas donde se procesa la castaña. Sin embargo, la castaña encara un problema serio debido a las aflatoxinas y, por consiguiente, la industria que este producto sustenta se ve amenazada por las estrictas regulaciones sobre el contenido de aflatoxinas en las nueces que se exportan a los países desarrollados.

El cierre de estos mercados, debido a las regulaciones, podría devastar la economía de las regiones productoras, en las que la castaña es responsable de un 70% de la economía total.

Se investigó el problema de aflatoxinas en la castaña y se llegó a la conclusión de que ésta puede manejarse de modo que se satisfagan los requerimientos de importación. Se establecieron lineamientos para salvar la industria y permitir su ampliación mediante una serie de acciones inmediatas, a mediano y largo plazo.

La necesidad de mejorar la calidad de exportación de la castaña hizo que se iniciara la investigación sobre los contaminantes naturales como coliformes y los aspergillus estos últimos como productores de aflatoxinas.

La explotación y exportación del producto genera un gran movimiento económico en la zona norte de Bolivia, que comprende la totalidad del departamento de Pando y las provincias Vaca Díez del Beni e Iturralde de La Paz.

Con este trabajo de investigación se pretende identificar y cuantificar con mayor sensibilidad y especificidad las aflatoxinas de la castaña (*Castanea sativa Miller*), de esta manera se dará solución a una de las inquietudes de la empresa Tahuamanu, es el tema del que trata la presente Tesis de Licenciatura.

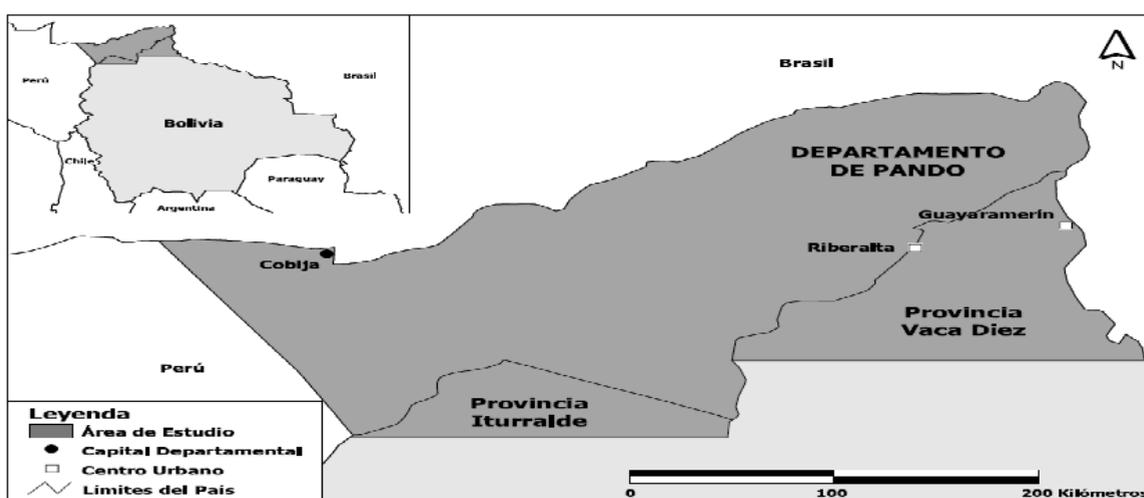
2. ANTECEDENTES



2.1 *Bertholletia excelsa*

El árbol de la castaña pertenece a la familia de las *Lecitidáceas*, alcanza hasta 40mts de altura y más de 2 mts de diámetro de tronco, en su hábitat natural se asocia generalmente con goma (*Hevea brasiliensis*) así como con una diversidad de otras especies del estrato alto, medio y bajo de los bosques amazónico. (Guevara ; 2007).

El árbol de la castaña es *Bertholletia excelsa*, es originaria de la selva húmeda tropical de la amazonia que abarca los países como Venezuela, Colombia, Bolivia, Perú, Guayana y Brasil. En nuestro país se encuentra en la región norte de Bolivia, constituye uno de los productos forestales no maderables (PFNM) más importantes, como se puede observar en la figura 1.



Fuente: ESRI Data and Maps 2002.

FIGURA 1. Ubicación de la Región productora de castaña boliviana. ESRI Data and Maps 2002

Debido a su larga fase de desarrollo (10 -15 años hasta su primer rendimiento) y a la biología de polinización (necesariamente polinización cruzada) y florescencia, la castaña amazónica muy rara vez se planta en cultivos. Su reproducción natural se efectúa con ayuda de diversos roedores que rompiendo la cáscara dura de la fruta "liberan" las semillas, dando lugar así al nacimiento de una nueva planta. Su crecimiento con éxito, sin embargo, se dará sólo si se realiza en espacios abiertos. Por esta razón prácticamente no

se encuentran castaños jóvenes en los bosques cerrados de la Amazonía (Williams, 1999).

2.2 *Castanea sativa miller*

El fruto del árbol está formado por una cáscara dura, tiene un tamaño de alrededor de unos 16cm de diámetro. La temporada de florecencia es de Octubre a Diciembre, el fruto capsular que puede pesar hasta 1,5 kg necesita de 12 – 15 meses para su maduración. La que al madurar libera de 20 a 24 semillas de forma arriñonada de 3 a 4 cm con una cáscara gruesa y leñosa llamada “coco”, como se observa en la figura 2 (AgroBioTek, 2009).



FIGURA 2. Fruto de la castaña. <http://articulos.infojardin.com>

El fruto es conocido por su contenido en proteínas (15-17% en peso en fresco) y de alrededor del 50% en peso de harina desgrasada, los frutos secos son también una buena fuente de aceite (63-70%), también posee un elevado valor nutricional en vitaminas y selenio (Tabla 1), siendo por consiguiente una fuente importante de alimento.

TABLA 1. Composición química de la castaña.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL FRUTO	
- Agua	5%
- Hidratos de carbono	9% (4% fibra)
- Lípidos	65%
- Proteínas	17%
- Calcio	160 mg/100 g
- Fósforo	620 mg/100 g
- Hierro	4 mg/100 g
- Provitamina A	5 mg/100 g
- Vitamina C	2 mg/100 g
- Vitamina B1	0,2 mg/100 g
- Vitamina B2	0,7 mg/100 g

En: <http://articulos.infojardin.com>.

Históricamente, Brasil fue el principal país productor y exportador de castaña , la producción más grande provenía de Brasil y las exportaciones se realizaban también desde este país, es de ahí, que viene el nombre nuez del Pará [del estado brasileño Pará] o nuez del Brasil y su nombre comercial internacional es "Brazil Nut" con un gran mercado en Europa y Norte America, No obstante, la situación comenzó a cambiar a partir de 1995, cuando las exportaciones de ese país llegaron a las 9.000 toneladas contra 7.500 toneladas de Bolivia. Un año después, Bolivia desplazó definitivamente a Brasil del primer puesto en la producción de castaña.

En 1999, Bolivia ya exportó 10.880 toneladas de castaña, superando a las 2.500 toneladas del Brasil, hoy en día, gran parte de la producción de castaña proviene de las regiones selváticas de la amazonia de Bolivia y Perú. (Williams, 1999).

2.3 *Aspergillus* y Aflatoxinas

2.3.1 *Aspergillus*

2.3.1.1 Historia

En 1729 el *Aspergillus* fue catalogado por primera vez por el padre biólogo italiano Pier Antonio Micheli quien usó el nombre "Aspergillum" por parecerse el hongo a los hisopos utilizados para dispersar (aspergilar) agua bendita. La descripción hecha por Micheli de este género de hongo en su obra *Nova Plantarum Genera* tiene importancia histórica, al ser reconocido como el punto inicial de la ciencia de la micología. La primera descripción de una patología provocada por *Aspergillus* la hacen Meyer y Emmert en 1815, que descubrieron la enfermedad pulmonar en el grajo. Pero no fue hasta 1850 cuando Fresenius cultiva el hongo a partir de las lesiones del tracto respiratorio en pájaros y le denomina *Aspergillus fumigatus*. En 1847 Sluyter publica la primera descripción de neumomicosis humana causada por *Aspergillus*, y es Virchow en 1856 el que realiza un amplio estudio anatomopatológico de la enfermedad así como Desde entonces, se han descrito unas 200 especies de *Aspergillus*, de las cuales alrededor de 20 han sido descritas como agentes etiológicos de infecciones en humanos o animales. (Caballero ,2005).

2.3.1.2 Taxonomía e identificación

El género *Aspergillus* está encuadrado dentro de la familia *Moliniaceae*, Subclase

Hyphomycetos, dentro de la subdivisión *Deuteromycotina*, junto con otros conocidos géneros tan diversos como *Penicillium*, *Trichoderma*, *Microsporium* o *Coccidioides* (Caballero, 2005)

La identificación de los hongos del género *Aspergillus*, como de todos los hongos

miceliares, se suele realizar basándose en criterios exclusivamente morfológicos de las conidias y de los conidióforos. El *Aspergillus* es un hongo filamentoso (compuesto de cadenas de células, llamadas hifas), el tipo de hongos opuesto a las levaduras, éstas últimas compuestas de una sola célula redondeada.

Con el fin de diferenciar distintos géneros de hongos con el género *Aspergillus*, así como para diferenciar distintas especies y cepas de *Aspergillus*, se han venido desarrollando métodos bioquímicos, basados en la detección e identificación de metabolitos secundarios, como por ejemplo micotoxinas, la identificación del sistema de ubiquinona o el examen de patrones enzimáticos. Con el mismo fin, se han desarrollado métodos moleculares, obtenidos a partir tanto de ADN genómico como mitocondrial o ribosomal. El criterio más frecuentemente utilizado son los valores de reasociación ADN-ADN, encontrándose valores superiores al 92% entre distintas cepas de *A. flavus* y *A. niger* habiendo utilizado también los análisis de intrones y la hibridación de secuencias de ADN digeridas por endonucleasas. (Rodríguez Aida.2004).

2.3.2 Aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos tóxicos secundarios que químicamente corresponden a derivados isocumarínicos, producidas por los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, principalmente. (Widstrom NW, 2002).

El nombre de aflatoxina deriva de la abreviación taxonómica de *Aspergillus* (A) y de la especie *flavus*, ya que se comprobó que el hongo *Aspergillus flavus* era el contaminante común en todas las muestras.

2.3.2 .1 Clasificación

Hasta el momento se han identificado 18 aflatoxinas diferentes. Estos metabolitos secundarios, son producidos por una ruta biosintética común con la esterigmatocistina, a partir de un precursor policetónico (Klich & Cleveland, 2000). Siendo las más importantes y estudiadas los tipos: B₁, B₂, G₁ y G₂ según su fluorescencia de color azul o verde en presencia de luz ultravioleta a 365 nm. Estos se producen de manera natural en substratos contaminados con cepas de *Aspergillus* aflatoxigénicos. La aflatoxina B₁ es metabolizada por los sistemas microsómicos a un rango de metabolitos. El metabolito activo se supone que sea el 8-9 epóxido de la aflatoxina B₁. La inactivación depende de la conjugación del glutatión y la susceptibilidad a la intoxicación aguda depende de la actividad de la enzima glutatión-S-transferasa. El

epoxido B1 se une en forma covalente a un rango de proteínas que tienen tanto actividades estructurales como enzimáticas. La fosforilación de las proteínas también se altera con la aflatoxina B1 todas las aflatoxinas son genotóxicas (www.unsa.edu.ar/matbid/micologia.htm).

La aflatoxicosis en humanos se asocia con el consumo de alimentos contaminados con el hongo *Aspergillus flavus*. Un número de aflatoxinas con un rango de potencia (B1>G1>B2>G2) son producidas por *Aspergillus* y las proporciones relativas dependen de la especie del hongo que se encuentra en la muestra. (www.bt.cdc.gov/HealthProfessional/index.asp).

Existen además, los derivados B_{2a} y G_{2a}. Las demás (M1, M2, P3, Q1, aflatoxicol, etc.) son productos metabólicos de sistemas microbianos o animales (Smith y Ross, 1991). Ver figura 3.

El rango de temperatura para la producción de aflatoxinas va de 7.5-12 a 40°-41°C según los hongos y las condiciones experimentales. La elaboración de las toxinas se produce poco después de la infección p.e. en mazorcas, a una temperatura y a dos días de incubación, puede alcanzar una concentración de 200ng/g y luego de nueve días llega a 2000ng/g a la temperatura de 34°C. (Carrillo Leonor; 2003). Estudios realizados sobre la toxicidad de este compuesto sugieren que esta difiere de acuerdo al tipo de especie, como se observa en la tabla 2.

TABLA 2. Dosis letal 50 mg/Kg via oral de *aflatoxina*

Especie Animal	DL 50 mg/Kg oral
Gallo y Gallina	20
Ratas hembras	17.9
Ratas macho	7.2
Vacuno	2
Cerdos	0.62
Paticos y Pavitos	0.335
Conejos	0.3

Escalona R, Armando, Micotoxinas, 10 de abril de 2005

2.3.2 .2 Estructuras de las aflatoxinas

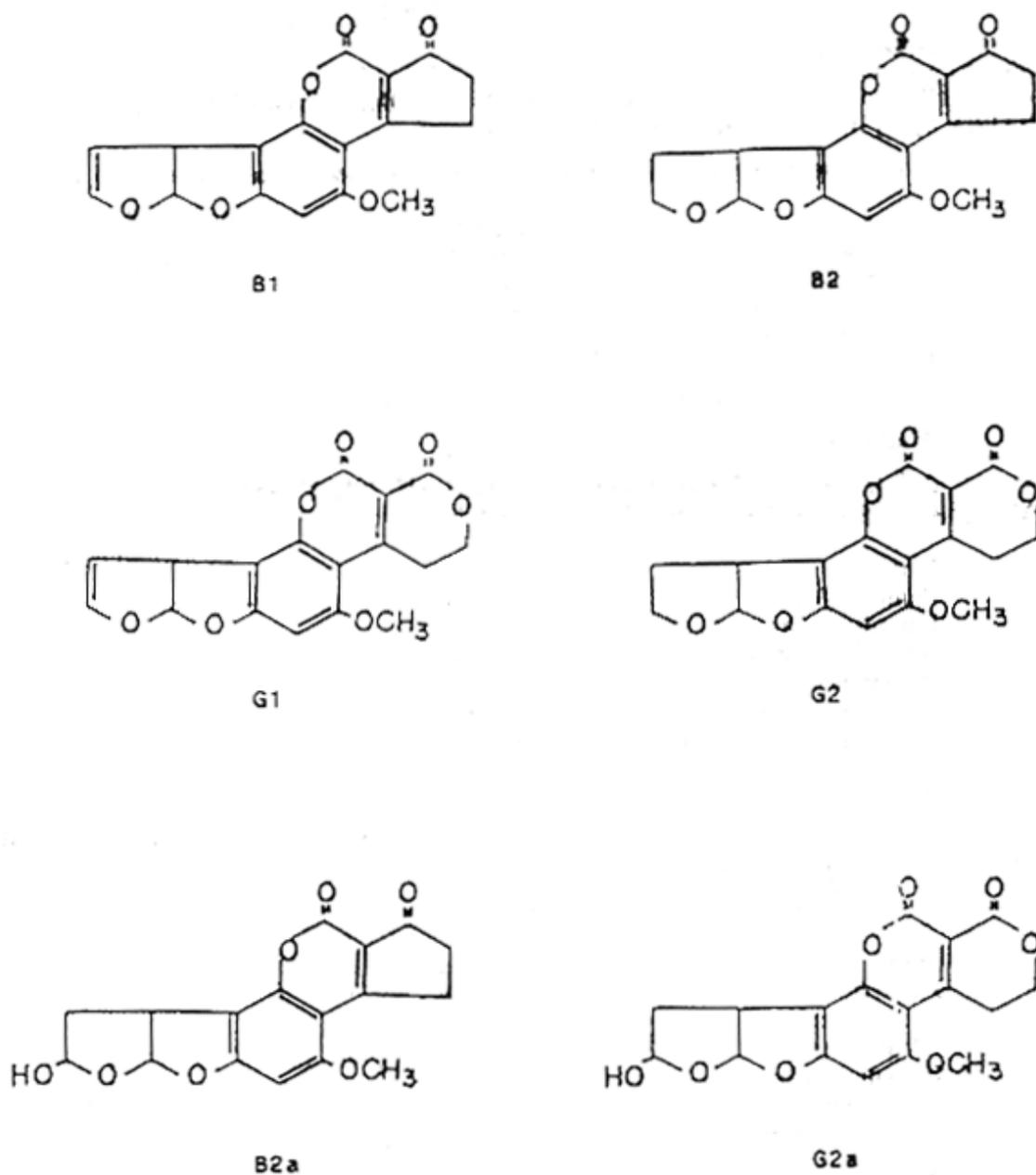


FIGURA 3 .Estructura química de las aflatoxinas B1, G1, B2, Y G2 además de sus derivados. Escalona R, Armando, Micotoxinas, 10 de abril de 2005

2.3.2 .3 Características y propiedades físicas

Estas toxinas contienen un núcleo cumarina fusionado a un bifurano y a una estructura pentanona en el caso de aflatoxinas B, que está sustituida por una lactona de seis miembros en aflatoxinas G. Estos metabolitos secundarios cuyas fórmulas se observan en la figura 3, son producidos por una ruta biosintética común con la esterigmatocistina, a partir de un precursor policetónico (Klich & Cleveland, 2000).

2.3.2 .4 Aflatoxina B₁:

2, 3, 6a , 9a -TETRAHIDRO-4-METOXICICLOPENTA [C] FURO [3', 2': 4,5] FURO [2,3-h] [1] BENZO-PIRANO-1,11-DIONA.

Forma	: cristales
Punto de fusión	: 268–269°C
Fluorescencia	: azul
UV máx. (etanol)	: 362 nm
Peso molecular	: 312.0633
Fórmula molecular	: C ₁₇ H ₁₂ O ₆

2.3.2 .5 Aflatoxina B₂:

2, 3, 6a, 8, 9, 9a -HEXADIDRO-4-METOXICICLOPENTA [C] FURO [3',2': 4,5] FURO [2,3-h] [1] BENZO-PIRANO-1,11-DIONA.

Nota: el compuesto 8,9-DIHIDRO es un derivado de B₁.

Forma	: cristales
Punto de fusión	: 286–289°C

Fluorescencia : azul
UV máx. : 363 nm.
(etanol)
Peso : 314.0790
molecular
Fórmula : $C_{17}H_{14}O_6$
molecular

2.3.2 .6 Aflatoxina G₁:

3, 4, 7a, 10a-TETRAHIDRO-5-METOXI-1H, 12H-FURO-[3',2': 4,5] FURO [2,3-h]-PIRANO [3,4c] [1]-BENZOPIRANO-1,12-DIONA.

Forma : cristales
Punto de : 244–246°C
fusión
Fluorescencia : verde
UV máx. : 362 nm
(etanol)
Peso : 328.0582
molecular
Fórmula : $C_{17} H_{12} O_6$
molecular

2.3.2 .7 Aflatoxina G₂:

3, 4, 7a, 9, 10, 10a -HEXAHIDRO-5-METOXI-1H, 12H-FURO [3',2': 4,5] FURO [2,3-h]-PIRANO-[3,4c] [1]-BENZOPIRANO-1,12-DIONA.

Nota: el compuesto 9,10-DIHIDRO es un derivado de G₁

Forma : cristales
Punto de : 237–240°C

Fusión
Fluorescencia : verde
UV máx.
(etanol) : 363 nm
Peso
molecular : 330.0739
Fórmula
molecular : $C_{17} H_{14} O_7$

2.3.2 .8 Aflatoxina B_{2a}

2-HIDROXI derivado de B₂

Peso
molecular : 330.0739
Fórmula
molecular : $C_{17} H_{14} O_7$

2.3.2 .9 Aflatoxina G_{2a}

2-HIDROXI derivado de G₂.

Peso
Molecular : 346.0688
Fórmula
molecular : $C_{17} H_{14} O_8$

2.3.2 .10 Características químicas y físicas generales

- Baja solubilidad en agua (10–30 µg/ml)
- Solubles en cloroformo, soluciones acuosas de metano, acetonitrilo, acetona, debido a que los cristales de aflatoxinas no tienen las mismas propiedades de la aflatoxinas naturales.
- Relativamente inestables al estado de sustancia pura, a la luz y al aire.
- Susceptibles a la hidrólisis alcalina.
- Son afectadas al tratarse con amoniaco o con soluciones de hipoclorito de sodio (pH>10.5)
- Son termorresistentes.

- Estables en un rango de pH entre 3 y 10.

2.3.2 .11 Producción de aflatoxinas

La capacidad de producción de aflatoxinas está condicionada por el tipo de hongo, las características del sustrato y las condiciones externas tales como humedad, temperatura y luz. (Castro *Emilio .M.Sc, 2006*)

2.3.2 .12 Reglamentación y límites permisibles

Muchos países han establecido normas para controlar la presencia de aflatoxinas. En 1966, el Protein Advisory Group (PAG), patrocinado por FAO/OMS/UNICEF estableció como nivel máximo permisible 30 ppb de aflatoxinas en general en los alimentos.

Algunos países, sin embargo, poseen límites más específicos (Tabla 3) En Chile se estableció los límites máximos de aflatoxinas para alimentos e ingredientes mucho más rigurosos. (Tabla 4)

TABLA 3. Límite máximo permisible en distintos países del mundo para aflatoxina B₁ y aflatoxinas totales

PAÍS	LÍMITE MÁXIMO PERMISIBLE
Dinamarca, Gran Bretaña, Finlandia, Polonia, Suecia.	5 ppb de B ₁
Francia	30 ppb en general
Alemania Federal	10 ppb como totales 5 ppb de B ₁
Canadá	20 ppb como totales 5 ppb de B ₁
E.E.U.U.	20 ppb como totales (suma de B ₁ + B ₂ + G ₁ + G ₂)

TABLA 4. Límites máximos de contaminación por aflatoxinas (en mg/kg O ppb) en alimentos e ingredientes de uso animal

Producto	B₁	B₁ + B₂ + G₁ + G₂
Alimentos	5 ppb	20 ppb
Ingredientes	20 ppb	50 ppb

Resolución exenta de SAG, N^o707 de 14 de mayo de 1991.

2.4 Cromatografía (HPLC)

La cromatografía es un método de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia y la física. Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes.

La Cromatografía líquida, también conocida como Cromatografía de líquidos, es una técnica de separación y no debe confundirse con una técnica cuantitativa o cualitativa de análisis. Es una de las técnicas analíticas ampliamente utilizada, la cual permite separar físicamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla. En toda cromatografía existe un contacto entre dos fases, una fija que suele llamarse fase estacionaria, y una móvil (fase móvil) que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido o mezcla de varios líquidos. La fase estacionaria por su parte puede ser alúmina, sílice o resinas de intercambio iónico que se encuentran disponibles en el mercado.

Dentro de la cromatografía líquida destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*), que es la técnica cromatográfica más empleada en la actualidad, normalmente en su modalidad de fase reversa, en la que la fase estacionaria tiene carácter no polar, y la fase móvil carácter polar (generalmente agua o mezclas con elevada proporción de la misma, o de otros disolvente polares, como por ejemplo metanol). El nombre de "reversa" viene dado porque tradicionalmente la fase

estacionaria estaba compuesta de sílice o alúmina, de carácter polar, y por tanto la fase móvil eran disolventes orgánicos poco polares.

2.5 Fluorimetría

La fluorescencia es la propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a radiaciones del tipo ultravioleta, rayos catódicos o rayos X. Las radiaciones absorbidas (invisibles al ojo humano), son transformadas en luz visible, o sea, de una longitud de onda mayor a la incidente.

En el proceso, una molécula absorbe un fotón de alta energía, el cual es emitido como un fotón de baja energía (mayor longitud de onda). La diferencia de energía entre la absorción y la emisión, es disipada como calor (vibraciones moleculares). Todo el proceso es muy corto (millonésimas de segundo) y este tiempo es la principal diferencia con otro conocido fenómeno luminoso, la fosforescencia.

Las sustancias que producen este tipo de radiación se denominan fluoritas, mientras que el fenómeno en sí mismo, se debe a la presencia de materia orgánica o de iones de tierras raras.

Sin embargo, en una muestra de minerales que poseen propiedades fluorescentes, no todos ellos, incluso los que se han extraído de un mismo lugar, presentan la característica luminiscencia. Por otro lado existe una amplia variedad de colores, dependiendo de la longitud de onda emitida.

La absorción al ultravioleta tiene el inconveniente que requiere extractos muy purificados. Permite valorar simultáneamente mezclas de alcaloides de forma independiente. para ello es preciso que cada uno cumpla la ley de Lambert-Beer: absorciones máximas diferentes, absorciones aditivas.

2.6 Identificación molecular de los hongos.

El empleo de técnicas convencionales como las pruebas microbiológicas de asimilación de carbono, de compuestos nitrogenados y requerimientos vitamínicos, son comúnmente usadas para la identificación de hongos, pero

éstas no siempre son precisas ni reproducibles, y suelen llevar a datos inespecíficos debido a que las características morfológicas y fisiológicas están fuertemente influenciadas por las condiciones de cultivo.

En los últimos años el desarrollo de las herramientas moleculares ha permitido conocer la estructura, dinámica y variabilidad genética de la población fungica. La más útil para el estudio de las comunidades ha sido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) que permite identificar los microorganismos (Gardes *et al.*, 1991; Bruns y Gardes, 1993; Henrion *et al.* (1992). Los procedimientos basados en PCR, ya sean reacciones simples o complejas (anidadas), abarcan un vasto número de protocolos; entre los más empleados están:

- a) Las regiones hipervariables del rDNA (IGS o espacio intergenico, e ITS o espacio transcrito interno);
- b) Los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs de los productos de la PCR);
- c) La amplificación de las secuencias cortas repetidas (microsatélites); y
- d) La obtención al azar del DNA polimórfico entre otros (Orberán, 2004), son la combinación de exactitud, rapidez y factibilidad que hacen de ellas herramientas ideales en la identificación de microorganismos.

2.6.1 Genes ribosomales.

La PCR más estudiada ha sido la de los genes ribosomales y sus espacios intergenicos. Estas regiones tienen muchas ventajas:

1. Tienen una organización conservada en el genoma de todos los eucariontes y su presencia está en unidades repetidas una junta a la otra (Debaud *et al.*, 1999).
2. Tienen un gran número de copias, lo que facilita su amplificación (van Tuinen *et al.* 1999).
3. Contienen regiones muy conservadas (18S, 5.8S y 28S), lo que ha permitido un fácil diseño de iniciadores (Gardes y Bruns, 1993).

4. Estas regiones conservadas están separadas por secuencias divergentes, muy variables, polimórficas en longitud y en secuencias, debido a deleciones e inserciones; son muy informativas y representan una huella genómica para cada hongo (Gardes et al., 1991; Martin et al., 1998; Bruns y Gardes, 1993; Henrion et al., 1994).

Las regiones más divergentes de los genes ribosomales son los espacios intergenicos ITS y el IGS son utilizados frecuentemente en los estudios de ecología microbiana, sobre todo en las comunidades de ectomicorrizas.

La variabilidad en la secuenciación observada de las 2 regiones ITS de los genes ribosomales que separan la subunidad ribosomal pequeña 5.8 de la subunidad ribosomal grande 25S, ha sido determinante para distinguir un hongo de otro. La mayoría de los estudios de Ecología Molecular en los hongos se ha hecho con fragmentos de restricción de estas regiones.

Los RFLPs de los hongos en asociación con su planta hospedera han sido analizados con un par de iniciadores (ITS1F e ITS4) descritos por Bruns y Gardes (1993); estos iniciadores fueron diseñados para amplificar el gen 5.8S y las regiones ITS de los basidiomicetos. La variabilidad interespecie del ITS1 y del ITS2, ha sido especialmente estudiada para establecer marcadores para las especies de los hongos de gran valor culinario como las trufas. (Henrion 1992).

En este reporte se emplea en la identificación y análisis filogenético de un aislado de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* 1MA9, de 600 nucleótidos de la región variable (D1/D2) del extremo 5' del gen de la subunidad mayor del rDNA (LSU). En la mayoría de los estudios de sistemática molecular se utiliza solamente las primeras 600—900 bases del gen LSU, que incluye los tres dominios divergentes (D1, D2, D3 ver figura 10) que están entre las regiones más variables del gen completo. El LSU es parte del complejo de genes del rDNA y está constituido por secuencias repetidas en tándem, organizándose en grupos los genes ribosomales en el genoma nuclear. Los genes ribosomales son altamente conservados, actualmente se sabe que están compuestos de

una mezcla de regiones conservadas y divergentes, éstas últimas son llamadas “regiones divergentes -D” y tienen una orientación que va de 5' a 3' del rRNA maduro (Sonnenberg, 2007). Esta región ha sido secuenciada en la mayoría de ascomicetos y es común a todas las especies de levaduras, permitiendo un reconocimiento intraespecífico entre ellas, por ser una región altamente variable ayuda a una mejor identificación de las especies. En el caso de especies fuertemente relacionadas además es recomendable el secuenciamiento de la región del espacio intergénico (ITS) (Hall et al., 2003).

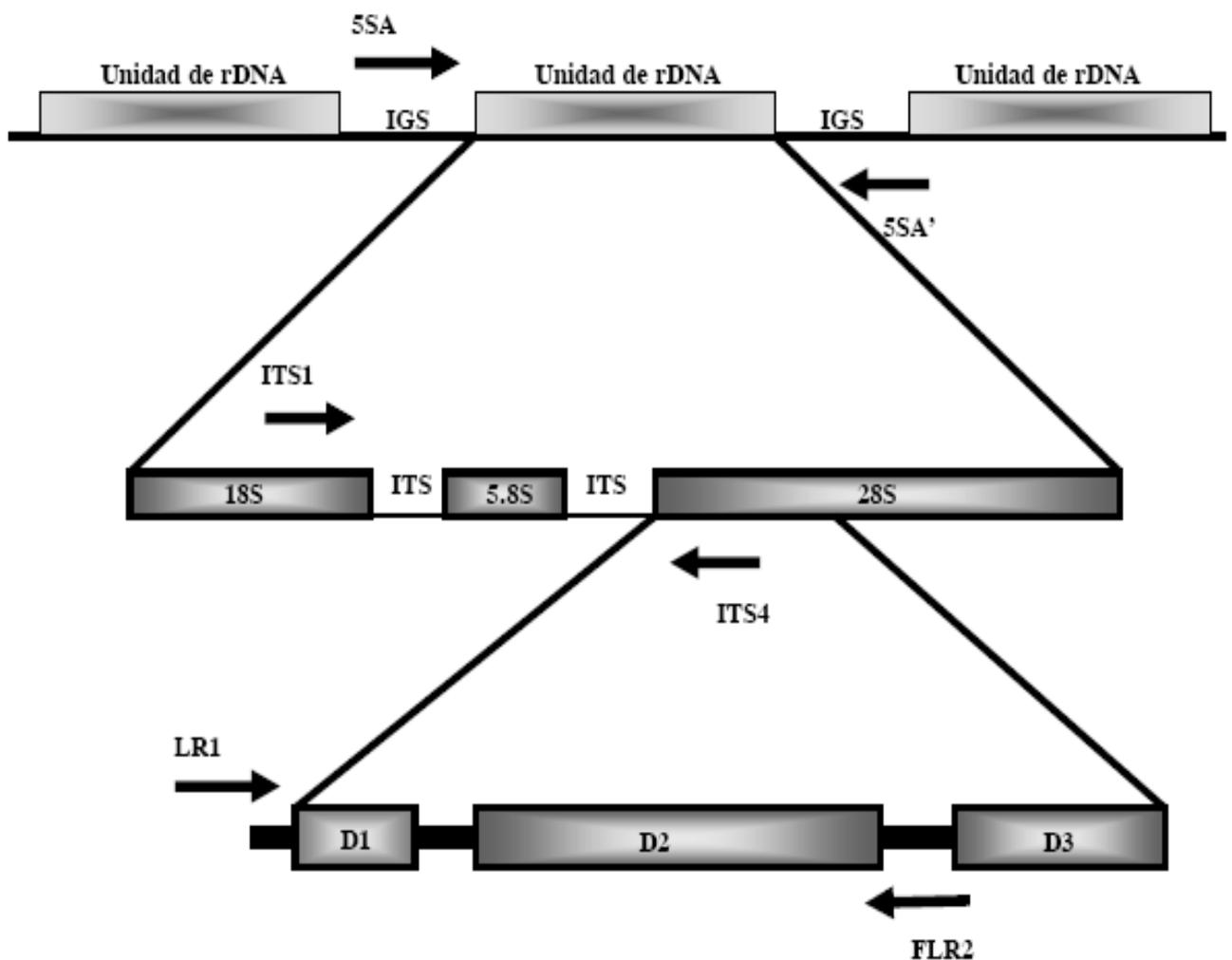


FIGURA 4: Genes ribosomales y sus espacios interunidades, espacios intergénicos y dominios de la subunidad grande. Los iniciadores para amplificar los espacios intergénicos y los dominios también están indicados (Gardes y Bruns, 1993; Jaquiot *et.al.*2000)

3. OBJETIVOS



3.1 Objetivo General

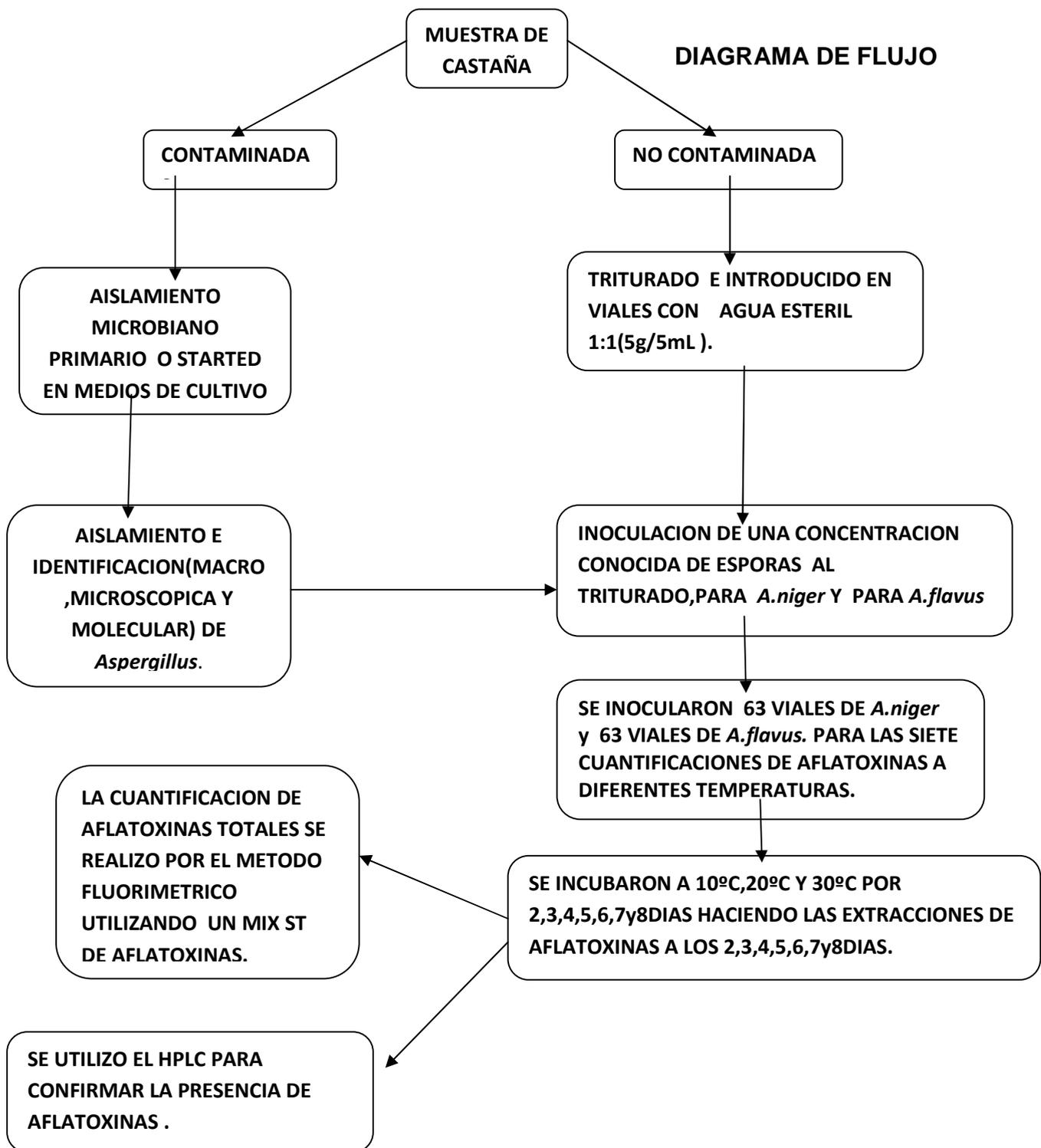
Analizar la producción de aflatoxinas de las cepas de *Aspergillus sp.* relacionado al efecto de la temperatura sobre los frutos de castaña (*Castanea sativa Miller*). Pando-Bolivia, 2009.

3.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar las cepas de *Aspergillus* que producen aflatoxinas en el fruto de la castaña (*Castanea sativa Miller*).
- Determinar el efecto de la temperatura en la producción de las aflatoxinas.
- Determinar la concentración total de aflatoxinas aisladas del fruto de la castaña (*Castanea sativa Miller*) utilizando el método fluorimétrico.
- Identificar la presencia de aflatoxinas (B1, B2, G1, G2) de las extracciones realizadas empleando el método de HPLC.

4. MATERIALES Y MÉTODOS





4.1 Procedencia de la muestra

Las muestras de castaña, fueron proporcionadas por la empresa **Tahuamanu** del departamento de Pando. Estas se transportaron en conservadores (de plastoform que fue descontaminado con hipoclorito al 1.5 %, dejando con lavandina por una noche). El material que se utilizo para recolectar la muestra así como la metodología fueron realizadas con técnicas asepticas utilizando: guantes, frascos, cajas petri, bolsas nylon, tijera, bisturí y pinzas, todo este material se esterilizó en un autoclave Sall American Modelo 25x MANITOWOC WI 54220 a 1,5 atmosferas y 121 °C por 20 minutos.

4.2 Aislamiento del patógeno

Las muestras de castaña colectadas fueron tratadas en un medio estéril, se procedió a eliminar la flora microbiana normal con etanol al 70% dejando en reposo por un minuto, luego hipoclorito de sodio a diferentes a concentraciones (3-5%) se sumergieron a diferentes tiempos 0,1 y 5 minutos y enjugadas con abundante agua destilada estéril, se colocó trozos de almendra en cajas petri con papel absorbente para su secado y posteriormente se dejaron los trozos lavados en medios de cultivos (PDA y Sabouraud,), se incubaron de 3 a 4 días a 24° C, para luego realizar la identificación de los hongos que lograron desarrollar.

4.3 Identificación del hongo

Para el desarrollo de la identificación se desarrollaron diferentes técnicas que nos permitieron obtener la identificación de los hongos a estudiar.

4.4 Observación macroscópica.

Se determinaron las características de desarrollo morfológicas y de pigmentación en el medio de cultivo para la discriminación de *Aspergillus* de los otros hongos que no fueron tomados en cuenta en el presente estudio. (Levaduras, *penicillum* p.e.).

Se tomo los micelios de las cajas petri donde presentaron desarrollo con la ayuda de una lupa, se considero las siguientes características:

- **Anverso de la caja**

Aspecto del frente hifal: vellosos, seco, algodonoso, etc.

Formación de macro estructuras sexuales

Color: de la especie fúngica

- **Reverso de la caja**

Aspecto del frente hifal: rugoso, liso

Pigmento: Presencia/ ausencia

4.5 Observación microscópica:

Se utilizó la técnica de la cinta adhesiva en portaobjetos para luego observar en un microscopio e identificar las características del hongo (conidias, hifas y otras propias de las especies de *A.flavus* y *A.niger*).

4.6 Técnicas moleculares

4.6.1 Extracción de DNA genómico.

Para la extracción de DNA genómico se utilizó el protocolo que fue modificado por Cárdenas para esporas de hongos, se cultivó el hongo en medio líquido PDA y se realizó la lisis con 1 ml cultivo crecido que fue centrifugado a 6000 rpm por 5 minutos, el precipitado fue resuspendido con 500 uL de una solución de lisis (0.1 M NaCl, 0.5 M pH 8 TrisHCl, 5% SDS), se dejó incubar por 1 hora a 65° C, se centrifugó a altas revoluciones por 10 minutos y se recupero el sobrenadante, se adicono 50 uL de una solución de Tris 2M (pH 7) y 150 uL NaCl (5M), mezclando vigorosamente, centrifugar por 10 minutos a 12000rpm, y recuperar el sobrenadante que contiene el DNA se añadió 800 µL de etanol y se centrifugó a 12000rpm por 15 min. Al pellet se añadió 200 µL de etanol al 70% y se centrifugó a 13000rpm por 2 min y se recuperó el DNA secando el tubo por 15 min a 55° C. Finalmente se almacenó el DNA a 4 °C.

4.6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las secuencias de los iniciadores para amplificar la región D1/D2 LSU ribosomal de las cepas de *Aspergillus* fueron: F63 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y LR3 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Para amplificar la secuencia D1/D2 LSU se utilizo los siguientes pasos de PCR: 3 min a 95°C; 30 s a 95 °C; 30 s a 57° C; 2 min a 72° C, seguido de 30 ciclos, 5 min a 72° C y finalmente tiempo indefinido

a 4° C. El tamaño del amplificado esperado fue de 600 pb. Para visualizar los productos de PCR utilizamos geles de agarosa al 1% con amortiguador TBE 0,5X. Las muestras de DNA se mezclaron con solución de carga (0,25% azul de bromofenol, 40% sacarosa). La tinción se realizó durante 10 min en una solución de TBE 0,5X con bromuro de etidio a una concentración 0,5 µg/mL. Las bandas se visualizaron por la fluorescencia emitida al irradiar con luz ultravioleta de 320 nm.

4.6.3 Análisis de secuencias:

La secuenciación se llevó a cabo por el Instituto de Genética de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA .La secuencia obtenida se comparó con las existentes en las bases de datos mediante el programa BioEdit y el programa Mega4, se utilizo además el BLASTN, obtenido de la NCBI.

El análisis filogenético molecular fue llevado a cabo usando el programa MEGA 4. Previamente se hizo una búsqueda de las secuencias depositadas en Ribosomal Data Project y GenBank usando el programa NCBI BLASTN, se realizó un alineamiento múltiple usando el programa CLUSTAL W. La distancia evolutiva fue calculada mediante el modelo Kimura de dos-parámetros, los árboles filogenéticos fueron reconstruidos por el método neighbour-joining y la topología y consistencia de los árboles fue evaluada por bootstrapping con 1000 réplicas utilizando el programa MEGA 4. Las posiciones de alineamiento con gaps y bases no identificadas fueron excluidas de los cálculos.

4.7 Verificación de la presencia de *aflatoxinas* por el método cromatográfico HPLC.

La identificación de las toxinas se realizo por HPLC. Se empleo un HPLC Waters equipado de dos bombas (modelo 1525) y de una columna fase reversa Nova-pak C8 (3.9 x 150 milímetros, 4 m) y un software Empower PDA, usando una fase móvil de 60 % metanol p.a. , 20 % de acetonitrilo,20% de agua desionizada 60:20:20(v/v), el flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min y se utilizo un detector de fluorescencia Waters 2475, las longitudes de onda de

excitación y de emisión usadas fueron 350 y 460 nm respectivamente. Las aflatoxinas fueron identificadas por su tiempo de retención, comparadas con los de la solución estándar bajo condiciones idénticas. El estándar del mix de aflatoxinas fue obtenido de Supelco Co. Ltd.

4.7.1 Análisis de las muestras.

Las muestras analizadas por HPLC fueron las aflatoxinas producidas por los hongos *Aspergillus* en las mismas condiciones de temperatura de incubación (30° C de dos días de incubación) y la misma cantidad de muestra (5gr.) extraídas por el mismo método químico y resuspendidas en cloroformo p.a., luego fueron filtradas con filtros de 0.20um. de poro para evitar el taponamiento de la columna. El protocolo de extracción que se siguió fue el mismo que el utilizado para el método fluorimétrico ya que solo se quería verificar la existencia de aflatoxinas en las muestras analizadas por el método fluorimétrico. La fase móvil que se utilizó fue agua desionizada: acetonitrilo: metanol (60:20:20). Las longitudes de onda que se utilizaron para la excitación y emisión fueron 365nm y 465nm respectivamente.

4.8 Cuantificación por el método fluorimétrico.

Las aflatoxinas totales fueron determinadas en cuatro pasos que van desde la curva de calibración, producción de aflatoxinas, extracción y la cuantificación.

4.8.1 Curva de calibración de aflatoxinas en el fluorímetro

Para realizar la cuantificación se hizo primero la curva de calibración utilizando un estándar mix de aflatoxinas totales(B1,B2,G1,G2)en una concentración total de 10 uL/mL se hicieron diluciones del estándar 1/8 disuelta en metanol p.a. y a partir de esta se hicieron otras diluciones seriadas 1/2 también disueltas en metanol p.a. Se utilizaron cubetas de cuarzo para realizar la lectura, el blanco fue constituido por metanol p.a., y se hicieron las lecturas con las siguientes longitudes de onda para la excitación se usaron 360nm y para la emisión 465nm.

4.8.2 Producción de toxinas.

Se trituraron muestras de castaña, sanas libres de toxinas (lo que se verifico con una extracción de las castañas tomadas al azar), se pesaron 5 gramos y se pusieron en viales, se dio un ambiente húmedo al añadir agua destilada estéril (5mL).

Después se inoculo *A.flavus* en una concentración de $6,67 \times 10^7$ esporas y para el caso del *A.niger* se inocularon $5,2 \times 10^8$ esporas por ml con el método de recuento en placa utilizando la cámara de New Bauer. Luego se incubaron a tres diferentes temperaturas 10° , 20° y 30° C durante ocho días, de donde se recogieron por triplicado las muestras incubadas cada día, para la extracción de aflatoxinas.

4.8.3 Extracción de toxinas.

La muestra recogida de la incubación se trato con acetona y agua destilada estéril en una relación 1:1, a continuación fue sometido a agitación por 30 minutos. Posteriormente se deshidrato con una solución saturada de sulfato de sodio y se eluyó por una columna de arena finalmente fue filtrado con ayuda de un filtro de poro grueso.

El volumen obtenido se trato con cloruro de sodio (5%) y hexano p.a. en una columna de separación donde se mantuvo en agitación por 5 minutos luego de ello se tomo la fase acuosa de acetona luego esta se trato con cloruro de sodio al 5% y cloroformo donde luego de agitar por 3 minutos se descarto la fase acuosa de acetona y se tomo la fase clorofórmica ,a esta ultima se añadió cloruro de sodio al 5% después de esto se agito por tres minutos y se rescato la capa de cloroformo a la que se deshidrato totalmente al hacerla pasar por una columna de sulfato de sodio anhidra y se concentro unos 2mL .Luego del concentrado se preparo una columna acidica con alúmina, silicagel y sulfato de sodio por donde se hizo pasar el concentrado clorofórmico y se lavo con benceno y acido acético(9:1),éter y hexano(3:1),finalmente se eluyo con cloroformo y metanol (97:3).Después de este proceso se evaporo con nitrógeno gaseoso.

4.8.4 Cuantificación de las muestras.

Se analizaron las muestras de *A.flavus* cultivadas a diferentes temperaturas 10°, 20° y 30° C, luego de su extracción química, previo a su lectura se disolvieron en 2mL de cloroformo p.a. luego se filtraron (filtro millipore 0.20uL) para que no existan residuos que interfieran en la fluorescencia y se procedió a realizar la lectura y cuantificación de las aflatoxinas extraídas de los 5 gramos de muestra contaminadas. Las muestras que se analizaron se hicieron por triplicado por cada temperatura de incubación y por cada día de incubación hasta el octavo día.

Para el caso del *A.niger* se procedió de la misma manera que el *A.flavus* ya que el tratamiento de la muestra fue el mismo tanto en las condiciones de estrés de temperatura, días de incubación, método de extracción, solvente utilizado para realizar la cuantificación con el equipo de fluorescencia y repeticiones por triplicado de cada condición de estrés.

4.9 Análisis estadístico.

Los resultados de los niveles de concentraciones de aflatoxinas detectadas en las muestras de castaña fueron estudiados por análisis de varianza ANOVA de doble vía los cuales se mostraron en tablas. Se compararon los niveles de concentraciones de aflatoxinas obtenidas con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Para la obtención de los hongos productores de aflatoxinas se realizó un aislamiento primario de microorganismos a partir de muestras de castaña (figura 4), las cuales fueron tratadas con soluciones de lavado.

Los microorganismos que lograron desarrollar tras la incubación fueron de cuatro tipos distinguibles macroscópicamente, estos fueron identificadas como *levaduras*, *penicillium* y *aspergillus*; se discrimino las cajas donde se desarrollaron aparentemente los hongos de *aspergilos* que posteriormente fueron aislados e identificarlos en forma más minuciosa.



FIGURA 5: Muestras de castaña facilitadas por la empresa TAHUAMANU en el 2009, de donde se logró el aislamiento de los microorganismos en el presente estudio. IIFB – 2009.

5.1 Identificación macroscópica

5.1.1 Características macroscópicas cepa AF (*Aspergillus flavus*).

Los hongos que crecieron presentaban un color oliváceo y ocasionalmente verde oscuro (figura 5); los micelios eran blancos, apenas visible; esclerocios y a veces presentaban un color marrón a negro, el tamaño y su forma era variables; en el reverso de la placa generalmente era incoloro y a veces amarillo pálido. Inicialmente el hongo presentaba un aspecto algodonoso (hasta el tercer día de incubación), sin embargo en algunas placas se observó la variación de un aspecto granuloso por la esporulación (a partir del quinto día de incubación), similar observación fue publicado por M^a Lourdes Abarca. (2000)

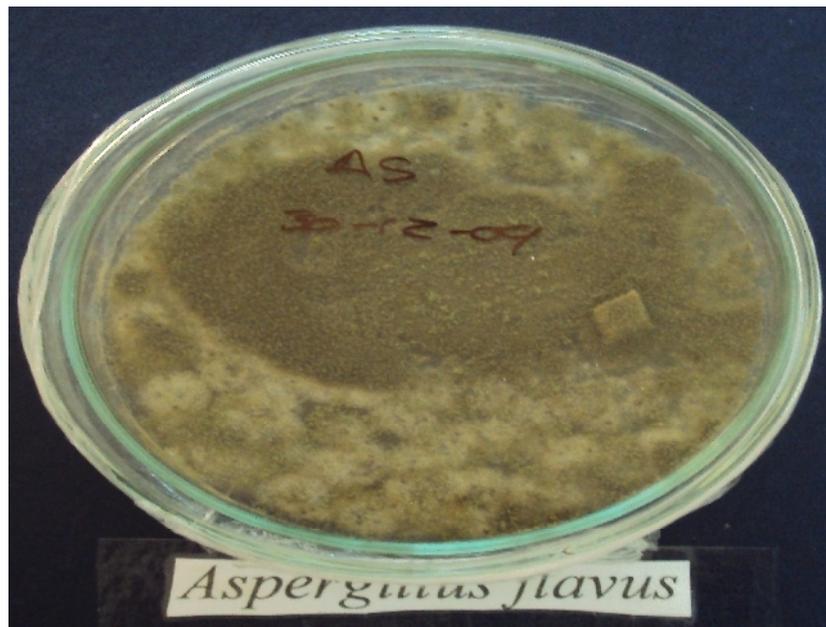


FIGURA 6: Características macroscópicas en Placas de PDA donde se observa el desarrollo de la cepa AF (*Aspergillus flavus*) y se aprecia la coloración característica del hongo. IIFB – 2009.

5.1.2 Características macroscópicas cepa RB (*Aspergillus niger*).

El desarrollo del hongo presento un color marrón oscuro, como se observa en la figura 6; en el reverso de la placa se observo un aspecto amarillento; la morfología era densa, granular a flocosa, presentaban micelios blanco apenas visible en el área de incubación coincide con la descripción de M^a Lourdes Abarca. (2000)

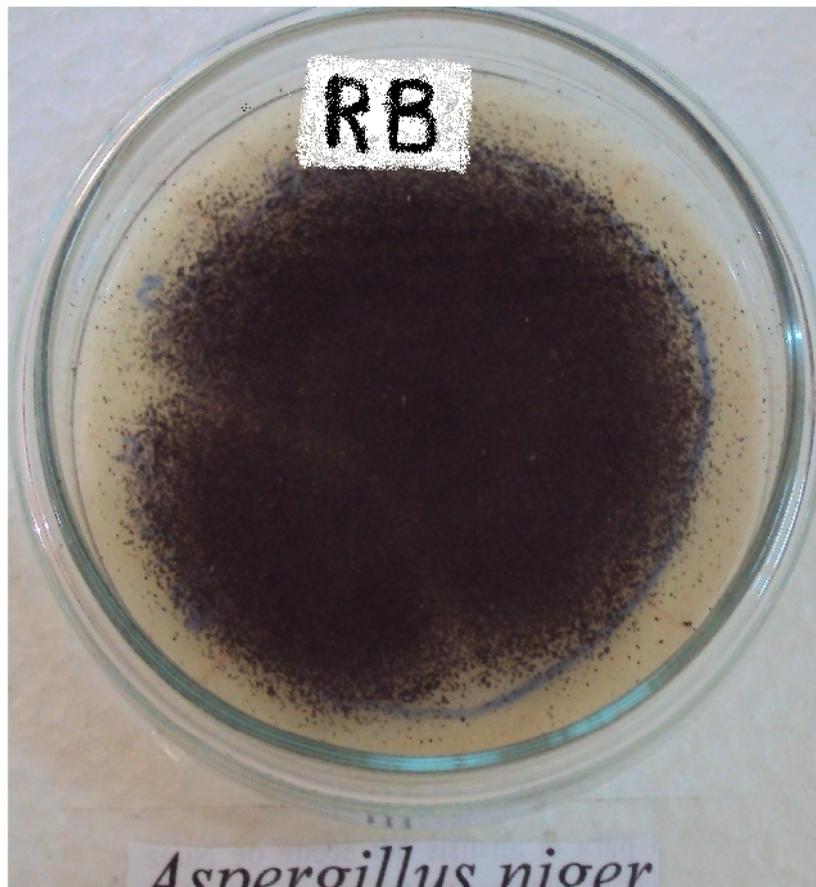


FIGURA 7: Placa de PDA con desarrollo de la cepa RB (*Aspergillus niger*) se aprecia la coloración característica del hongo. IIFB-2009.

5.2 Identificación microscópica

5.2.1 Características microscópicas cepa AF (*Aspergillus flavus*).

Las características microscópicas de los *aspergillus* son cabezas conidiales uniseriadas y biseriadas, principalmente radiales,; estipes normalmente rugosos, hialinos o de color marrón pálido. Vesícula esférica; métulas ocupando prácticamente toda la superficie de la vesícula. Como se observa en La figura 7, los Conidios globosos o elipsoidales, lisos o ligeramente rugosos. La descripción morfológica encaja con lo expuesto por Bucio Carlos *et.al.* (2001)

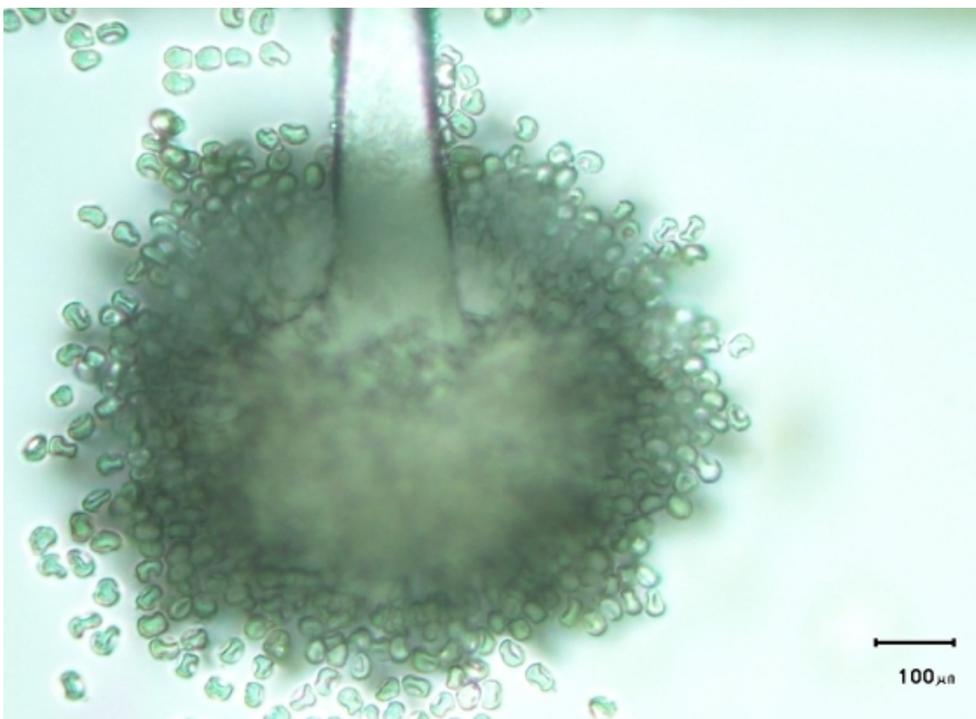


FIGURA 8: Características microscópicas cepa AF(*Aspergillus flavus*) tomadas a 100X.IIFB-2009.

5.2.2 Características microscópicas cepa RB (*Aspergillus niger*).

Cabezas conidiales biseriadas y radiales; estipes de paredes gruesas, lisos, hialinos, de color marrón pálido, en especial cerca de la vesícula, ver figura 8. Vesícula casi esférica; métulas ocupando toda la superficie de la vesícula. Conidios globosos de color marrón, normalmente muy rugosos con crestas irregulares y protuberancias. Ver figura 9. La descripción encaja con lo descrito por Bucio Carlos *et.al.* (2001)

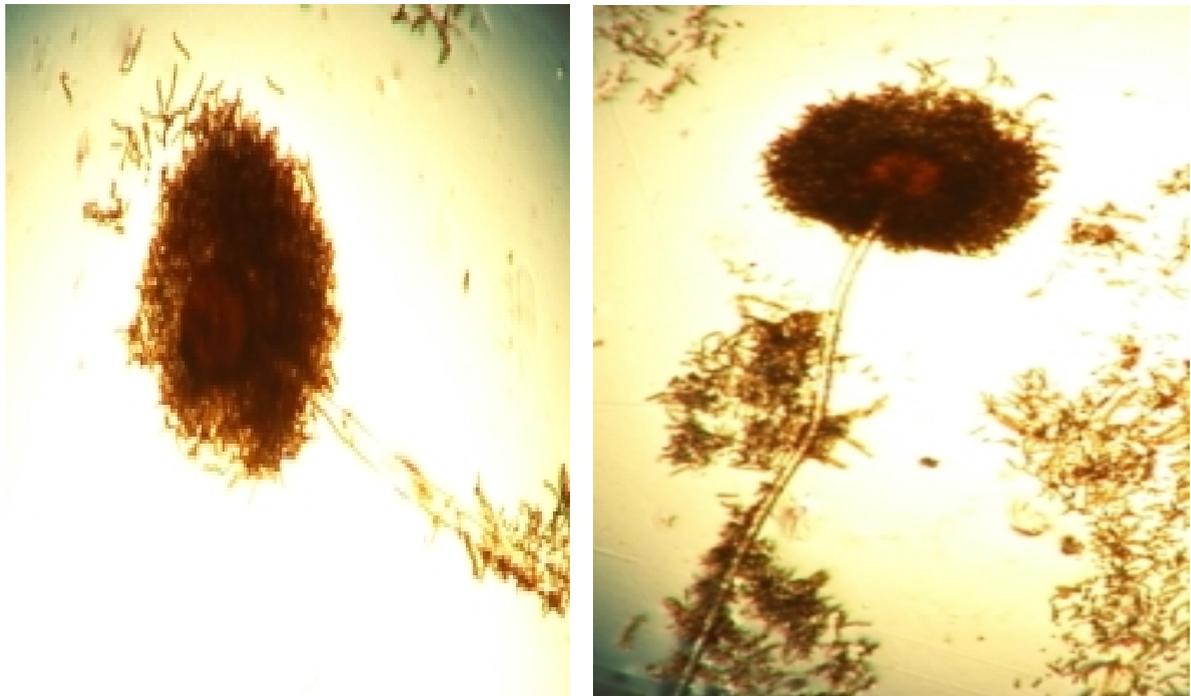


FIGURA 9: Características microscópicas de la cepa RB (*Aspergillus niger*) tomadas a 100X. IIFB-2009.

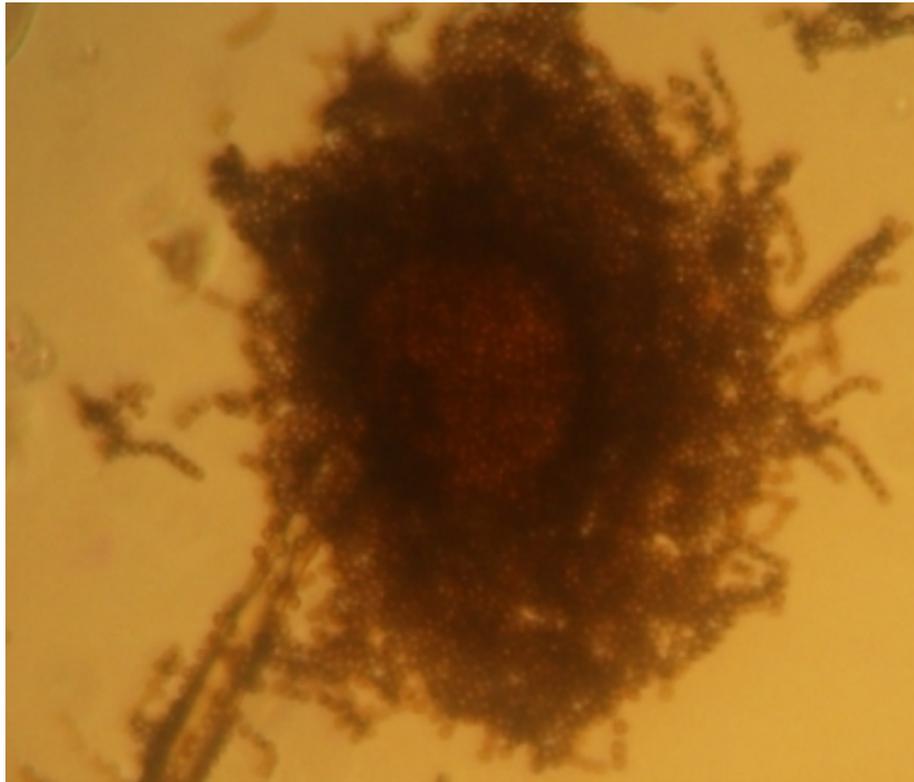


FIGURA 10: Características microscópicas de la cepa RB (*Aspergillus niger*) tomadas a 100X. IIFB-2009.

5.3 Identificación molecular

Los aislados de las cepas de *Aspergillus AF (A.flavus)* y *RB (A.niger)*, fueron sometidos a la identificación con técnicas molecular, la región variable (D1/D2) del segmento LSU, han sido utilizados en la identificación de la mayoría de ascomicetos (Rodriguez Aida *et.al.*2004). Al realizar la comparación de esta secuencia AF con otras secuencias existentes en la bases de datos se observó que existe un 98% de máxima identidad con las secuencias correspondiente *A.flavus* (número de acceso EF661566.1). Con respecto a la cepa RB se observó que existe un 100% de máxima identidad con la secuencia correspondiente a *A.niger* (número de acceso GQ382274.1), con este análisis se correlaciona a la identificación realizada por microscopia.

5.4 Análisis filogenético

Según el análisis filogenético del gen LSU D1/D2 rRNA los ascomicetos se encuentran distribuidos en clados discretos según la clase a la cual pertenecen, la ubicación donde correspondiente de las cepas AF y RB aisladas se observa

el árbol filogenético (figura 11), donde se puede apreciar que la cepas en estudio están estrechamente relacionada con el clado *A.flavus*, en el caso de la cepa *AF*, y con clado *A.niger* en lo que respecta a la cepa *RB*.

El análisis filogenético molecular es una herramienta útil para la tipificación de aquellos organismos cuya identidad es dudable o pueden ser confusas al determinarse por métodos fenotípicos Orbegozo Jeanette (2008)

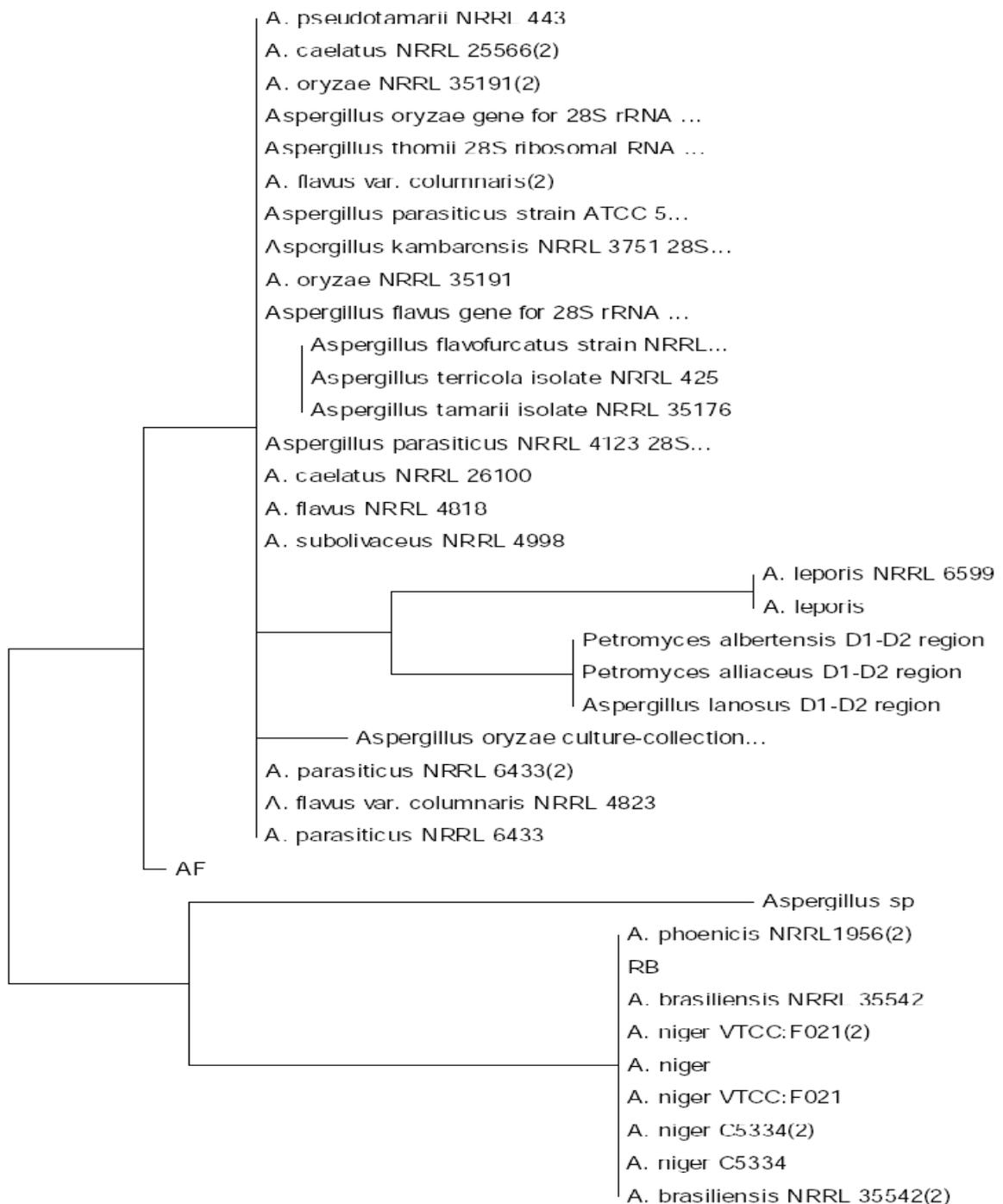


FIGURA 11: Árbol filogenético de *Aspergillus sp* basado en la secuencia del gen rDNA 26S de *Aspergillus cepas AF y RB* aislados de muestras de castaña contaminadas del departamento de PANDO-BOLIVIA. Se observa las especies de *Aspergillus* con las que tiene relación filogenética. Los valores de BOOTSTRAP en los nodos internos fueron inferidos de 1000 réplicas, sólo se muestran valores de BOOTSTRAP mayores al 98% y 100%. la barra de escala indica 2,00 sustituciones de nucleótidos inferidos por sitio IIFB – 2009..

La taxonomía en la agrupación *flavi* basado únicamente en los criterios morfológicos pone de manifiesto la dificultad en la identificación de muchos hongos aislados por la similitud en sus características fenotípicas. Los estudios realizados con parámetros morfológicos, bioquímicos realizados hasta el momento evidencian que la diferencia entre las especies más frecuentes son pequeñas. (Kurtzman *et al* 1986). Al-Musallam (2008) indicó que las especies nombradas antiguamente como *A. phoenicis* (1840) y *A. ficuum* (1867), son denominadas actualmente como unos sinónimos de *A. niger*, esta conservación del nombre *A. niger* fue preservada por Kozakiewicz *et al* (2005) y posteriormente aceptada.

5.5 Cuantificación de aflatoxinas totales por el metodo fluorimétrico.

5.5.1 Cepa AF (*Aspergillus flavus*).

La concentración tiene un incremento neto según aumenta la temperatura de incubación como se aprecia en la figura 11. La producción de aflatoxinas a diferentes temperaturas muestra una tendencia a incrementarse según los días incubados como se ve en la tabla 5, presentándose un aumento entre el cuarto y sexto día en las cepas incubadas a las temperaturas de 10 y 20 grados. A la temperatura de 30 grados celsius la producción se eleva inicialmente en el tercer día de incubación hasta el quinto luego disminuye hasta 324.47 ppb. (en el sexto día) y en el octavo día comienza nuevamente a incrementarse a 582.81ppb .

TABLA 5. Cuantificación de aflatoxinas totales de la cepa AF en ppb. empleando el metodo fluorimetrico.

Días de cultivo	Temperatura					
	10° C		20° C		30° C	
	Intensidad	[c] ppb *	Intensidad	[c] ppb *	Intensidad	[c] ppb *
2	214,03	11,67	223,60	17,32	245,10	74,42
3	220,70	15,70	235,50	44,46	313,15	338,17
4	215,30	12,69	226,50	18,94	314,70	344,91
5	220,40	15,30	227,20	19,33	337,60	444,51
6	225,50	18,38	309,40	321,86	328,80	406,24
7	253,20	99,96	277,60	183,56	310,00	324,47
8	233,30	37,96	248,80	85,96	369,40	582,81

*Concentración en partes por billón

IIFB-2009.

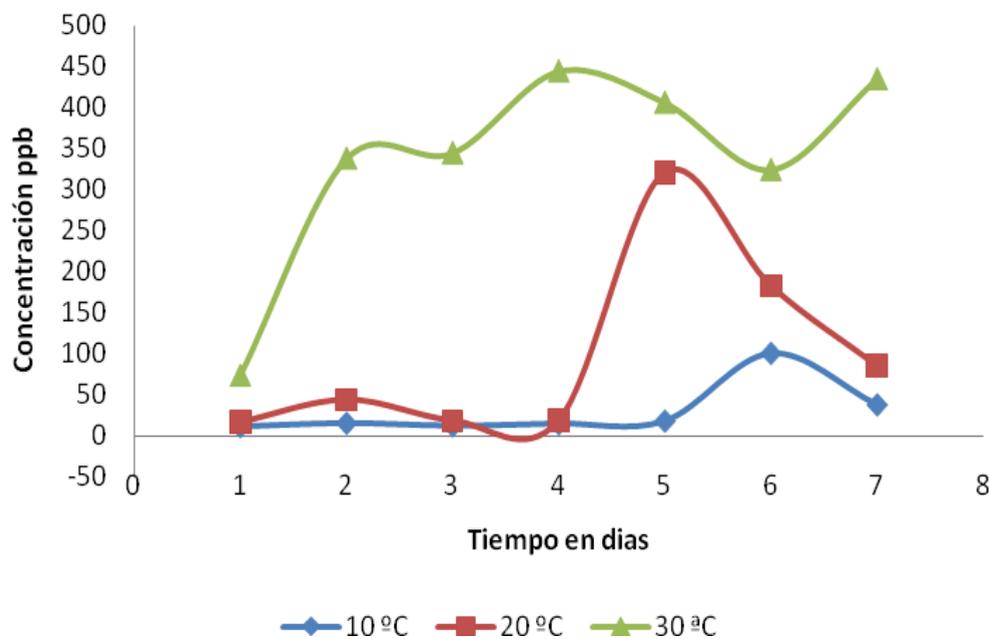


FIGURA 12: Concentración de aflatoxinas en ppb. Vrs. días de incubación a 3 diferentes temperaturas de la cepa AF.IIFB-2009.

La producción de aflatoxinas a diferentes temperaturas muestra una tendencia a incrementarse, como se ve en la figura 11, según los días incubados presentándose un aumento entre el cuarto y sexto día en las cepas incubadas a las temperaturas de 10° C y 20° C, Algo similar pero particularmente diferente ocurre a la temperatura de 30° C como indica Widstrom NW. (2002) la producción se eleva porque esta cerca de su temperatura óptima de desarrollo.

5.6 Cepa RB (*Aspergillus niger*)

La producción de aflatoxinas a diferentes temperaturas muestra una tendencia a incrementarse según los días incubados como se ve en la tabla 5, presentándose un aumento entre el quinto y sexto día en las cepas incubadas a las temperaturas de 10° y 20°C sin embargo como se aprecia en la figura 12 el incremento está muy por debajo del producido por la cepa de *A.flavus* de la figura 11. A la temperatura de 30°C la producción se eleva inicialmente en el tercer día de incubación hasta el cuarto luego disminuye hasta 308.81 ppb. (en el sexto día) y en el séptimo día comienza nuevamente a incrementarse a 501.48ppb en el octavo día.

TABLA 6. Cuantificación de aflatoxinas totales de la cepa RB en ppb. empleando el método fluorimétrico.

Días de cultivo	Temperatura					
	10° C		20° C		30° C	
Intensidad	[c] ppb *	Intensidad	[c] ppb *	Intensidad	[c] ppb *	
2	181,00	4,32	194,00	4,63	205,30	7,10
3	190,00	4,53	192,30	4,59	226,40	18,89
4	189,60	4,52	206,70	7,88	273,80	167,30
5	210,80	10,17	218,90	14,70	332,10	420,59
6	215,00	12,52	215,20	12,63	321,50	374,49
7	203,20	5,93	210,90	10,23	306,40	308,81
8	194,00	4,63	211,10	10,34	350,70	501,48

*Concentración en partes por billón

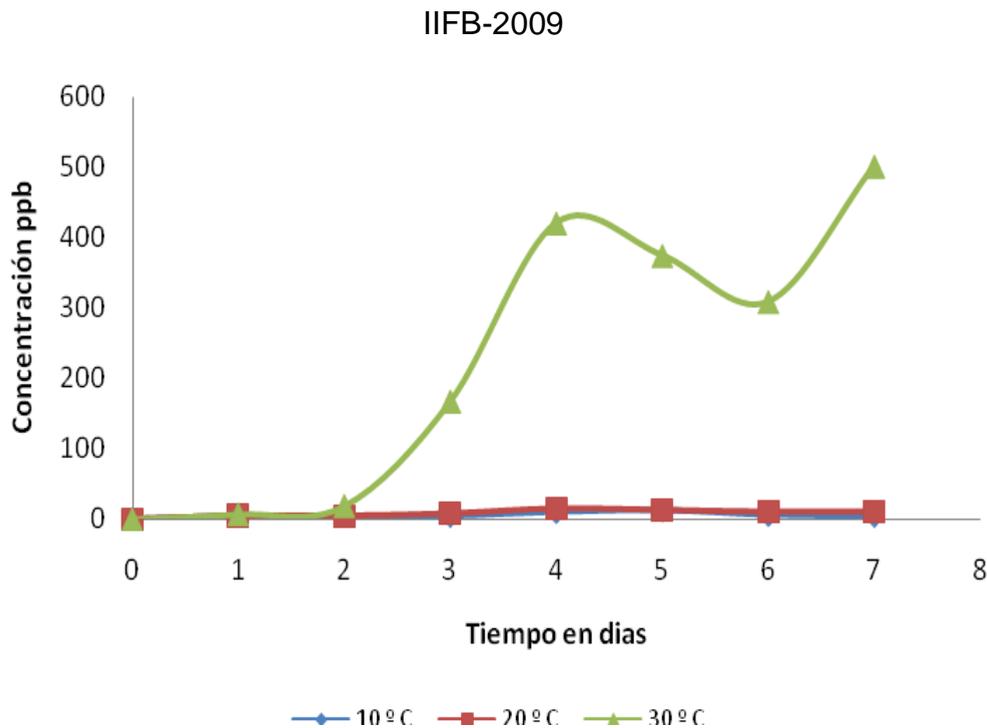


FIGURA 13: Concentración de aflatoxinas en ppb vrs. días de incubación a diferentes temperaturas de la cepa RB. IIFB - 2009

La contaminación y variación de la concentración de las aflatoxinas en este tipo de alimentos como la castaña puede estar influenciada por diversos factores, entre los que se cuentan condiciones medio ambientales durante el procesamiento, tales como una a_w entre 0,8-0,9 y humedad los cuales favorecen el desarrollo de los hongos aflatoxigénicos.(Caballero Jesús. 2005). La ubicuidad de los *Aspergillus* es debida a su capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre substratos con diverso contenido de humedad. La colonización de los granos durante el almacenamiento, por *Aspergillus* y otros mohos, se produce de forma explosiva cuando la humedad relativa ambiente intergranular se eleva por sobre el 70%.

La producción de las aflatoxinas de la cepa AF (*Aspergillus flavus*) es mayor en relación con la producción de la cepa RB(*Aspergillus niger*) esto se debe a que el *A.flavus* es el microorganismo que mas micotoxina produce en condiciones de un 0.95-0,99 de actividad de agua y una humedad mayor al 70%. (Ramón, Lazo *et.al.*2008) El rango de temperatura para el crecimiento óptimo está entre 30-33°C es por esta razón la producción de aflatoxinas es mucho mayor que a las otras temperaturas, aunque la producción de aflatoxinas es favorecida por la temperatura este no es un factor determinante ya que las micotoxinas pueden desarrollarse a temperaturas iguales o mayores a 10 grados centígrados siempre y cuando la humedad relativa sea su igual o superior al 70% (Guevara Miriam,2007) para la mayoría de las especies.

TABLA 7: Comparación de producción en ppb. de aflatoxinas totales a diferentes temperaturas.

Día	Variación de Temperatura					
	CEPA AF(ppb)			CEPA RB(ppb)		
	10° C	20° C	30° C	10° C	20° C	30° C
2	11,67	17,32	74,42	4,32	4,63	7,1
3	15,7	44,46	313,15	4,53	4,59	18,89
4	12,69	18,94	344,91	4,52	7,88	167,3
5	15,3	19,33	444,51	10,17	14,7	420,59
6	18,38	321,86	406,24	12,52	12,63	374,49
7	99,96	183,56	324,47	5,93	10,23	308,81
8	37,96	85,96	582,81	4,63	10,34	501,48

IIFB-2009.

La producción de las aflatoxinas de la cepa AF es mayor por el aumento de los metabolitos secundarios, esta es una respuesta al "stress" al que la cepa AF está sometido como la falta de sustrato. (En: www.agro.unlpam.edu.ar/catedras-pdf/Micotoxinas.pdf). Al parecer la concentración del inoculo ($6,67 \times 10^7$ esporas de *cepa AF* y $5,2 \times 10^8$ esporas de *la cepa RB*) añadidas con agua estéril a la muestra triturada además de la incubación a 30° C favorecieron al desarrollo de las micotoxinas, esto concuerda con Bucio Carlos *et.al.* (2001) y con Diener y Davis (1969) quienes afirman que a mayor daño de la muestra, en este caso el triturado, se produce mayor desarrollo de los hongos en el sustrato con producción de micotoxinas sobretodo a temperaturas mayores iguales a 30° C. Otro efecto importante es la actividad del agua y la humedad de de la muestra a la que estuvieron expuestas las cepas de *Aspergillus* inoculadas en la castaña ya que esta muestra se mantuvo hidratada hasta el último día de incubación esto podría explicar la producción excesiva de la aflatoxinas en los últimos días de incubación como hace referencia Galatti, S; Giannuzzi L. y Giner, S. (2006).

5.7 Confirmación de *aflatoxinas* por HPLC.

De todas las muestras leídas en el fluorímetro se tomó una al azar para realizar la confirmación de que las muestras cuantificadas efectivamente se trataban de *aflatoxinas* y se procedió a la lectura en el HPLC primero se hizo correr la solución estándar y se obtuvieron los picos que empezaron en los tiempos de retención de seis minutos a once minutos. (Figura 13).

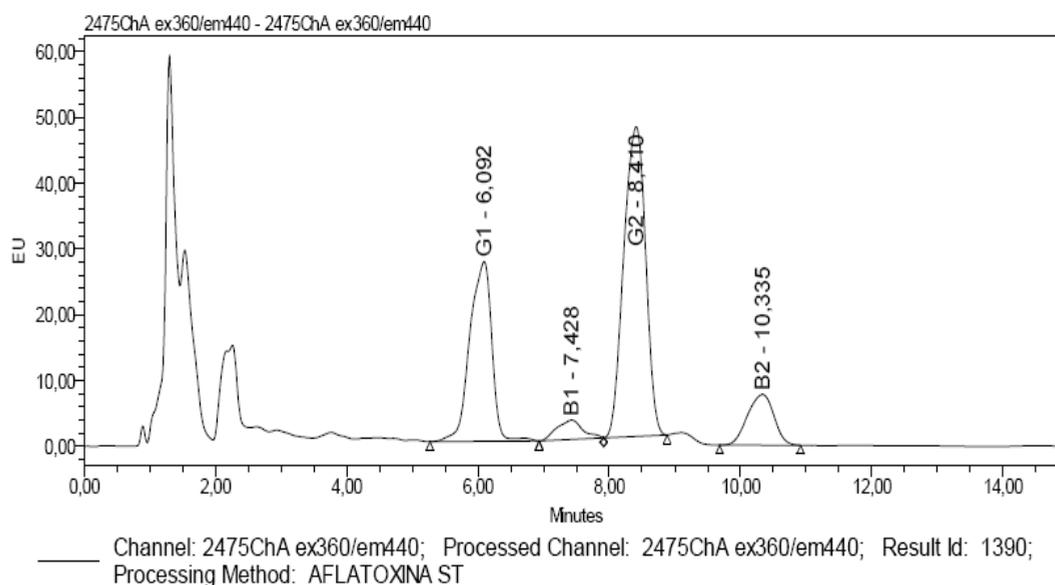


FIGURA 14: Cromatograma de *aflatoxinas* estándar se aprecia los cuatro picos característicos de la *aflatoxinas* G1, B1, G2yB2.IIFB-2009.

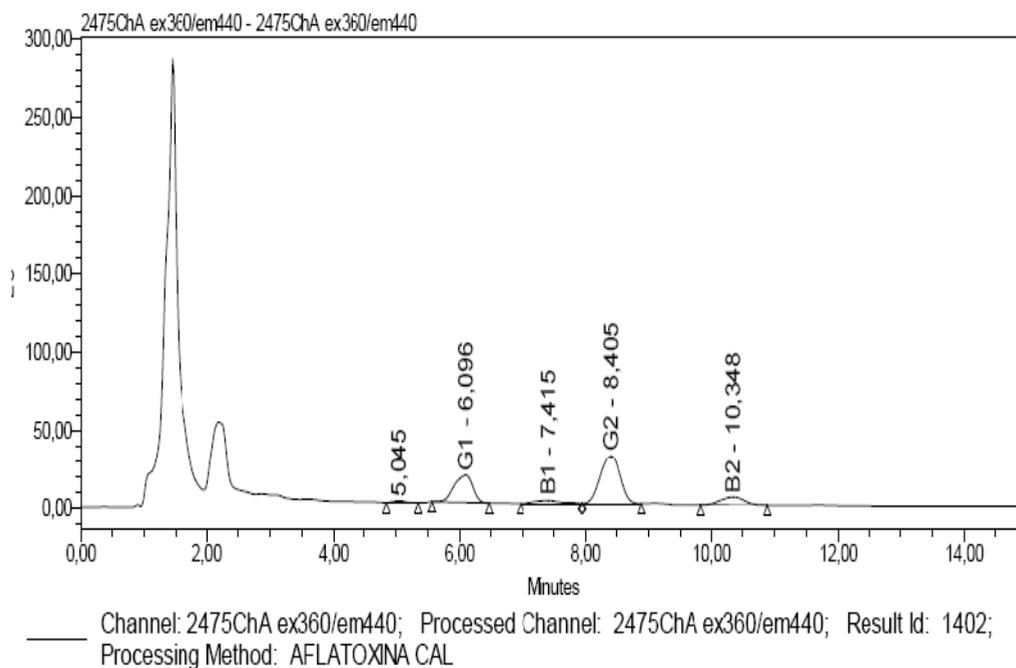


FIGURA 15: Cromatograma de *aflatoxinas* obtenidas a partir de extracto de castaña contaminada con *A.flavus* se aprecia los cuatro picos característicos de la aflatoxinas G1, B1, G2y B2.IIFB-2009

Luego se hizo correr la muestra (el extracto de la cepa AF) en las mismas condiciones de la solución estándar. Los resultados analíticos obtenidos fueron los picos en los mismos tiempos de retención, ver figura 14, con esto se confirmo que las muestras leídas en el fluorímetro si se trataban de *aflatoxinas*. Los resultados demuestran la presencia de *aflatoxinas* en la cepa AF y la presencia de *aflatoxina* B1.

6. CONCLUSIONES



- Se identificó las cepas de *Aspergillus* productoras de aflatoxinas en los frutos de castaña (*Castanea sativa Miller*), utilizando las técnicas de identificación en placa (macroscópicas), microscopía y técnicas moleculares determinando las especies de *A.flavus* y *A.niger*.
- Se evaluó el efecto de la temperatura en la producción de aflatoxinas donde se encontró que existe mayor concentración de aflatoxinas a elevadas temperaturas (30° C), sobre todo se observó en el caso de *A.flavus*.
- Empleando el método fluorimétrico se logró cuantificar la concentración mínima de producción de aflatoxinas (4.32 ppb) que corresponde a *A. niger*. Al segundo día de incubación a 10° C la cepa de *A. flavus* se encontró 11.67ppb.
- Se confirmó por HPLC la presencia de las aflatoxinas: B1, B2, G1 y G2 de las cepas aisladas.

7. BIBLIOGRAFÍA



- **AgroBioTek 2009.** En: <http://www.agrobiotek.com/agrobiotek/>
- **Al Musallam A. 2008.** Revision of the black *Aspergillus* species. Tesis doctoral.
- **Augstburger F. Berger J. 1ra ed. Alemania: Asociación Naturland; 2000.** Betina, V. 1999, Mycotoxins: Chemical, Biological and Environmental Aspects. Elsevier, Amsterdam
- **Bucio Carlos; Peña Juan; Guzman Doralinda, 2001.** Produccion de aflatoxinas en maíz *in vitro*, Revista Mexicana de Fitopatologia, A.C. pp. 218-222.
- **Caballero Jesús, 2005** ; desarrollo de un nuevo modelo de aspergiliosis pulmonar en rata: consideraciones previas, estudio comparativo y aplicaciones al diagnóstico de la enfermedad; Universidad Complutense de Madrid-ISBN: 84-669-2848-0
- **Carrillo Leonor, 2003,** los hongos de los alimentos y forrajes; Universidad Nacional de Jujuy-Universidad Nacional de Salta-ISBN :987-9381-19-X.
- **Castro Emilio .M.Sc, 2006.** Micotoxinas – Rol e Importancia en Nutrición Acuicola *Francisco Ahumada Fundación Chile*
- **Cotty, P.J.; cardwell, K.F. 2006.** Divergence of West African and North American communities of *Aspergillus* section *Flavi*. *Applied and Environmental Microbiology* 65:2264-2266
- **Debaud J C, R Marmeisse, F Gay (1999)** Intraspecific genetic variation in ectomycorrhizal fungi. *Molecular Biology and Biotechnology*. A Varma, B Hock (Eds). Springer Verlag, Berlin, Germany. pp:79-113
- **Detroy RW et al. 2001.** Aflatoxin and related compounds. pp. 4-178 en: *Microbial Toxins* vol. 6. Ciegler A et al., editores. Academic Press, New York.
- **Diener, U.L. and Davis, N.D. 1969.** Aflatoxin formation by *A.flavus*. In: Goldblatt(ed.). *Aflatoxin: scientific background, control, and implications*. Academic Press. New York, USA. pp. 13-54
- **Dietmar S. [monografía en Internet]*2000** [acceso 15 de julio de 2009]. Disponible en: www.redmunicipalverde.org/cosechando Published by Elsevier Science B.V. *Environmental Microbiology* 63: 1048-1053

- **Galatti,S;Giannuzzi L. y Giner,S.2006.**Efecto de la actividad de agua y la temperatura sobre el crecimiento y la producción de aflatoxinas por dos cepas de *Aspergillus* sobre granos de maíz Flint (colorado duro) irradiados. Tercer Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos.2006.
- **Gardes M,T D Brunsr (1993)** ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts.Molec. Ecol. 2:113-118
- **Gardes M,T J White,J A Fortin, T D Bruns, J W Taylor (1991)**
- **Gqaleni N et al. 1997.** Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of
- **Guevara Miriam,2007;**manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas Lima: Instituto Nacional de Salud; 2007. Serie de Normas Técnicas N.º 44.
- **Hall L., S. Wohlfel & G.D. Roberts. 2003.** Experience with the MicroSeq D2 large-subunit ribosomal DNA sequencing kit for identification of commonly encountered, clinically important yeast species. J. Clin. Microbiol. 41: 5099-5102.
- **Henrion B, F Le Tacon,F Martin ,1992** Rapid identification of genetic variation of ectomycorrhizal fungi by amplification of ribosomal RNA genes.New Phytol.122:289-298 Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA.Can. J. Bot. 69:180-190.
- **[http: www.agro.unlpam.edu.ar/catedras-pdf/Micotoxinas.pdf](http://www.agro.unlpam.edu.ar/catedras-pdf/Micotoxinas.pdf),2009**
- **Ito Y et al. ,2001.** *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *Flavi*. Mycological Research 105: 233-239.
- **Jeanette Orbegozo, Michel Abanto, Ruth García y Pablo Ramírez,2008.** Identificación molecular de *Pichia guillermondii* aislada de aguas ácidas de minas en el Perú y su resistencia a metales pesados Molecular identification of *Pichia guillermondii* isolated from mine water acidic of Peru and its resistance to heavy metals .Rev. peru. biol. 15(1): 91-96 (Julio 2008)© Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM

- **Jonathan Williams;David Wilson.1999;**
- **Klich, M.A. and T.E. Cleveland, 2000.** Aspergillus systematics and the molecular genetics of Mycotoxinbiosynthesis. In: Integration of Modern Taxonomic Methods for Penicillium and Aspergillus Classification. (Ed(s): R.A.Samson and J.I.Pitt). Harwood Academic Publishers. Singapore. pp:425-434
- **Kozakiewicz Z, JC Frisvad, DL Hawksworth, Pitt JI, Samson RA, Stolk AC.** Proposals for nomina specifica conservanda and rejicienda in Aspergillus and Penicillium (Fungi). Taxon 1992; 41: 109-113.
- **Kozakiewicz Z. 1989.** *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.
- **Kozakiewicz, Z, 2005.** *Aspergillus* species on stored products. CMI Mycol. Pap.161: 1–188.
- **Kurtzman CP, Smiley MJ, Robnett CJ,Wicklouw DT.** DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. Mycologia 1986; 78:955-959.
- **Lacey,I., 2003.** Prevention of mould growth and mycotoxin production through control of environmental factors. pp 161-169. fn: Nattori, S., Hashimoto, K. and Ueno, Y. (Eds.). Mycotoxins and Phycotoxins'88E. IsevierA. msterdam
- **Martin F,G Costa,C Delaruelle,J Diez,2008** Genomic fingerprinting of ectomycorrhizal fungi by microsatellite-primed PCR. In: A Varma B Hock (ed.). Mycorrhiza Manual. Springer-Verlag, Berlin,Germany.pp:463-474.
- **Moss MO., 2001.** The environmental factors controlling mycotoxin formation. pp. 37-56 en: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE, Henderson RS, editores. CRC Press, Boca Ratón, Florida
- **NOVAS, M. V. & D. CABRAL, 2002.** Association of sclerotia and mycotoxin production with compatibility groups in *Aspergillusflavus* isolated from peanuts seeds. *Plant Disease* 86: 215-219.
- **Orberán T. ,2004.** Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. Rev. Iberoam. Micol. 21:15-19.
- **Peterson SW, 1995** Phylogenetic analysis of *Aspergillus* sections *Cremeri* and *Wentii*, based on ribosomal DNA sequences. Mycol Res

99:1349-1355. 2000 Phylogenetic relationships in *Aspergillus* based on rDNA sequence analysis. In: Samson RA, Pitt JI, eds. Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification. Reading, United Kingdom: Harwood Academic Publishers. p 323–355

- **Ramón F. Lazo y Gonzalo Sierra, 2008**; Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano, Rev Iberoam Micol 2008.
- **Rodriguez Aida; Xoconostle Beatriz; Valdes Maria, 2004**; Ecología molecular de los hongos Ectomicorrizicos; Revista Fitotecnia Mexicana, Julio-septiembre, año/vol27, numero 003, pp. 267-278
- **Smith, f.E.y Ross, K. ,1991**. The toxigenic *Aspergillus*. pp. 101-118. In: Smith, J.E. and Henderson, R.S. (Eds.). Mycotoxins and Animal Foods. CRC Press Boca Ratón. U.S.A
- **Sonnenberg R., A.W. Nolte & D. Tautz., 2007**. An evaluation of LSU rDNA D1-D2 sequences for their use species identification. Front. Zool. 4:6. Universidad de Utrech, Utrech.
- **van Tuinen D, B Zhao, V Gianinazzi-Pearson, 1999**. PCR in studies of arbuscular mycorrhizal fungi: from primers to application. A Varma (ed). Springer, Berlin. pp:387-399.
- **Widstrom NW. ,2002**. Aflatoxin in developing maize: interactions among involved biota and pertinent economic factors. pp. 23-58 en: Mycotoxins in Ecological Systems. Bhatnagar D, Lillehoj EB, Arora DK, editores. Marcel Dekker, New York.