



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“ESTUDIO DE LA MICROFLORA Y CONTENIDO DE AFLATOXINAS DE
CEBADA CULTIVADA EN TLANALAPA, HIDALGO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ISRAEL OSWALDO OCAMPO SALINAS

ASESORES:

**Dra. JUDITH JAIMEZ ORDAZ
Dra. ELIZABETH CONTRERAS LÓPEZ**



PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

MAYO 2006



El presente trabajo se realizó en el **Laboratorio de Alimentos II**, del **Centro de Investigaciones Químicas**, de la **Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo** gracias a recursos otorgados por **PROMEP**, periodo 2003-2004,

formando parte del proyecto “Estudio sobre la incidencia de hongos aflatoxigénicos y contenido de aflatoxinas en cebada recién cosechada y almacenada proveniente del Estado de Hidalgo”.



Parte de este trabajo fue presentado en el **VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos** (modalidad cartel), llevado a cabo en Guanajuato, Gto. del 1 al 3 de Junio del 2005.

VII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y III FORO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ESTUDIO DE LA MICOFLORA Y CONTENIDO DE AFLATOXINAS PRESENTES EN CEBADA CULTIVADA Y ALMACENADA EN EL ESTADO DE HIDALGO

Israel O. Ocampo S.¹, Judith Jaimez O.¹, Elizabeth Contreras L.¹, Mariana I. Jiménez O.¹, Jorge Carrazana G.²

¹Laboratorio de Alimentos II, Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carr. Pachuca-Tulancingo, Km. 4.5, CP 42076, Pachuca, Hidalgo, México. jjimenez@uaduh.mx

²Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias, Universidad de Compostela, Campus Lugo, España.

Antecedentes

La mayoría de los hongos micotóxicos son contaminantes habituales en alimentos y productos agrícolas (Bellevé, 1984). Dentro de estos últimos, son los cereales (maíz, trigo, cebada y maíz) los más susceptibles a la contaminación por hongos productores de micotoxinas.

La presencia de hongos en un alimento no indica necesariamente una contaminación con micotoxinas pero sí es un factor de riesgo importante para que éstas se produzcan. Así mismo, la ausencia de crecimiento fúngico aparente no garantiza la ausencia de estas toxinas (Northolt y Van Egmond, 1982).

La contaminación de la cebada por hongos filamentosos causa pérdida de la calidad del producto y un riesgo sanitario para los consumidores del mismo, debido al potencial de algunas especies fúngicas para producir micotoxinas como las aflatoxinas.

Las aflatoxinas son consideradas por la *Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer* como un *carcinógeno humano* involucrado en el cáncer hepático primario (IARC, 1987).

Las aflatoxinas B₁ y B₂ consumidas por animales, se metabolizan a aflatoxinas hidroxiladas con efectos hepatoxicos, dichas aflatoxinas (H₁, P₁), pueden aparecer en la leche proveniente de estos animales y productos derivados como el queso.

Por estas razones y debido a que la producción de cebada en el estado de Hidalgo es una práctica extensa, se consideró pertinente efectuar un estudio de la micoflora contaminante y del contenido de aflatoxinas de granos de cebada en tres períodos.

Metodología

En el presente trabajo se realizó el estudio de la micoflora contaminante de granos de cebada recolectados en la comunidad de Tlanalapa (Tepeapulco Hidalgo), los cuales se utilizaron como forraje para ganado y en la elaboración de malta cervicera.

Se analizaron diez muestras de los granos, obtenidas de productores locales diferentes, recolectadas en tres etapas distintas: antes de la cosecha (PC), durante la cosecha (RELL) y después de tres meses de almacenamiento (ALM).

Recuento de mohos y levaduras: FDA (Incubación a 25°C, 5 a 7 días)

Alimenticios: MEA y Ompék (Incubación a 25°C, 2 a 7 días)

Identificación: A través de características microscópicas y microscópicas (técnica de la cinta adhesiva (Rodríguez-Tudela y Aviles, 1981)), utilizando el manual de Roger y Fennell (1985) y los métodos de Van Anz (1981) como método básico y Bensch y Müller (1972) y Samson *et al.* 2000.

Semi-Quantificación de Aflatoxinas (H₁-HepHem, BODASCREEN FAST Aflatoxinas totales)

Fig. 1. Ubicación del municipio de Tlanalapa en el estado de Hidalgo.

MUESTRAS PRECOSECHA

El 70% de las muestras analizadas presentaron contaminación fúngica aparente.

MUESTRAS DURANTE LA COSECHA

El 100% de las muestras analizadas presentaron contaminación fúngica aparente.

MUESTRAS DE ALMACENAMIENTO

El 100% de las muestras analizadas presentaron contaminación fúngica aparente.

Resultados y Discusión

Se analizaron diez graneros fúngicos en la cebada analizada (muestras de mohos log 3-5.9 UFC/g), de los cuales cuatro son considerados *totalmente* como: *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Alternaria* spp.

Las géneros potencialmente micotóxicos a aflatoxinas en las muestras de cebada analizadas fueron: *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. y *Alternaria* spp. en las muestras PC; *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp. y *Aspergillus* spp. para las muestras RELL y *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. y *Alternaria* spp. para las muestras ALM. El género *Fusarium* spp. fue el que mostró un aumento más pronunciado en cuanto a su frecuencia en las muestras.

El perfil de micotoxinas que surge de estas géneros es amplio y algunas de ellas debieron ser tenidas en cuenta a la hora de realizar cualquier análisis. Si bien el tipo de contaminación y micotoxinas presentes dependen de muchos factores, micotoxinas tales como el ácido benzotriazolínico, deoxivalerona, T-2, zearalenona, aflatoxinas y zearalenona, podrían llegar a ser importantes en los granos de cebada con el consiguiente riesgo sanitario que esto representa para la salud humana y animal.

Todas las muestras presentaron concentraciones de aflatoxinas totales entre 1.5 y 1.7 ppb. Las concentraciones más bajas correspondieron a las muestras PC, mientras que las concentraciones más elevadas correspondieron a las muestras ALM.

Bibliografía

Bellevé, K. (1984). *Micotoxinas: Problemas actuales, perspectivas y soluciones*. Departamento de Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. www.uaduh.mx

Bensch, G. y Müller, H. (1972). *Handbuch der Mikroskopie in der Lebensmitteluntersuchung*. Springer-Verlag, Berlin.

Fennell, R. y Roger, J. (1985). *Microbiología de los Alimentos*. McGraw-Hill, México.

IARC (1987). *Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals*. Volume 26. Aflatoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Northolt, M. G. y Van Egmond, H. P. (1982). *Microbiología de los Alimentos*. McGraw-Hill, México.

Samson, A. J., Ekin, S. y Bakharev, L. (2000). *Microbiología de los Alimentos*. McGraw-Hill, México.

Van Anz, J. (1981). *Microbiología de los Alimentos*. McGraw-Hill, México.

Rodríguez-Tudela, J. L. y Aviles, J. (1981). *Microbiología de los Alimentos*. McGraw-Hill, México.



ESTA TESIS ESTÁ DEDICADA A:

Mis hermanos, Pepe y Daniel.

Por que tarde o temprano cada uno de nosotros tendrá que seguir su camino, pero aunque lleguen a ser más fuertes y más altos que yo, ustedes siempre serán los hermanitos a los que debo cuidar. Espero, siendo el hermano mayor, servirles como ejemplo tanto en las fallas, y vaya que han sido muchas, como en los aciertos.

Mi mamá y mi papá: Giselda y Antonio

Mamá, por tu gran sacrificio, por tu apoyo, por tus palabras de aliento, por que tú siempre has procurado darme todo sin pedir nada a cambio, por enseñarme que con un poco de trabajo y mucha fe se puede salir adelante.

Papá, también por tu gran apoyo, por que es ahora que entiendo tu insistencia de que no dejara la escuela y por que me has enseñado que la vida muchas veces no se puede tomar tan enserio.



AGRADECIMIENTOS

GRACIAS A DIOS POR TODO

A mi mamá, por criarme como lo hiciste, por enseñarme lo bueno y lo malo, por soportar mis berrinches, por que sin tu apoyo no hubiera logrado salir adelante en los muchos descabros que he tenido y por que sin tu ayuda nunca hubiera podido terminar la carrera, gracias papá por darme la libertad que me has dado y a la vez por saber guiarme a través del camino correcto, muy a tu manera claro, mira hoy los resultados. Este paso aunque es pequeño lo damos juntos. Gracias mamá y papá por quererme tanto....

A mi Tía Gloria, Tía Francisca, Tía Bárbara, Tía Concha y Tío Lino, y también a mis hermanos y a mis primos, por hacerme saber que nunca estaré solo, pase lo que pase se que estarán ahí cuando los llegue a necesitar.

A la Dra. Judith por toda la confianza que me depositó, incluso cuando yo ni siquiera confiaba en mí, por todo el tiempo que dedicó para que esta tesis se terminara.

A la Dra. Liz, por su ayuda, tiempo y consejos, por esas palabras que en muchas ocasiones me tranquilizaron y otras tantas me ayudaron a ver las cosas desde otra perspectiva.

Ambas cuentan con toda mi admiración, les quiero agradecer por compartir sus conocimientos y por la paciencia y comprensión que demostraron en las tantas medidas de pata que llegué a tener, espero haber sido un buen tesista.

A mis sinodales por el tiempo dedicado a la corrección de esta tesis.

Al Dr. Roberto Ávila Pozos por su gran colaboración en la parte estadística.

Al M. en C. Juan Hernández Ávila por su ayuda con el microscopio electrónico de barrido.

A Tina por su invaluable ayuda en el laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio de Alimentos II, Mari, Vane, Julia y Abraham, por su amistad, particularmente a Tania y a Mariana, por su compañía y ayuda.

A mis compañeras de Biotecnología por soportarme y hacer que el paso por el laboratorio fuera bastante ameno, Yadi, Mary, Itzma, Aidé y Lili, por las risas, por sus muchas ocurrencias y por los tantos momentos de alegría, Angi, por tantas charlas, confidencias y palabras de apoyo, y también a Mari carmen y Maribel ya en mis últimos días en el laboratorio.

A las personas que compartieron junto a mí tantas aventuras y momentos maravillosos a lo largo de la carrera, y que siempre me acompañaron en las buenas y en las malas, Conchita, Vivis, Quinquín, Víctor, Enrique, Beto y Andrés, a ustedes son a los que más voy a extrañar.

A mis amigos Iván, Daniel y especialmente a Emmanuel y José Antonio, ya que con ustedes comencé mi vida como universitario, por su ayuda, por las muchas travesuras, anécdotas, y vivencias.



*BLACKBIRD SINGING IN THE DEAD OF NIGHT
TAKE THESE BROKEN WINGS AND LEARN TO FLY
ALL YOUR LIFE*

YOU WERE ONLY WAITING FOR THIS MOMENT TO ARISE

*BLACKBIRD SINGING IN THE DEAD OF NIGHT
TAKE THESE SUNKEN EYES AND LEARN TO SEE
ALL YOUR LIFE*

YOU WERE ONLY WAITING FOR THIS MOMENT TO BE FREE

*BLACKBIRD FLY BLACKBIRD FLY
INTO THE LIGH OF THE DARK BLACK NIGHT*

*BLACKBIRD FLY BLACKBIRD FLY
INTO THE LIGH OF THE DARK BLACK NIGHT*

*BLACKBIRD SINGING IN THE DEAD OF NIGHT
TAKE THESE BROKEN WINGS AND LEARN TO FLY
ALL YOUR LIFE*

*YOU WERE ONLY WAITING FOR THIS MOMENT TO ARISE
YOU WERE ONLY WAITING FOR THIS MOMENT TO ARISE
YOU WERE ONLY WAITING FOR THIS MOMENT TO ARISE.*

*BLACKBIRD
-THE BEATLES 1968-*

EN MEMORIA DE SÓSTENES SALINAS PAREDES
(PAPÁ SÓSTENES)



Por que siempre nos harás mucha falta



ÍNDICE

	Pág.
Índice de cuadros.....	v
Índice de figuras	vi
Índice de fotos.....	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Micología general.....	2
2.1.1. Definición de hongo.....	2
2.1.2. Características morfológicas.....	2
2.1.2.1. Estructuras somáticas.....	3
2.1.2.2. Órganos o estructuras reproductoras.....	3
Esporas asexuales.....	4
Esporas sexuales.....	4
2.1.3. Características fisiológicas.....	5
2.1.3.1. Necesidades nutritivas.....	5
2.1.3.2. pH.....	6
2.1.3.3. Temperatura.....	6
2.1.3.4. Oxígeno.....	6
2.1.3.5. Dióxido de carbono.....	7
2.1.3.6. Actividad de agua (a_w).....	7
2.2. Micotoxinas.....	8
2.2.1. Riesgo sanitario.....	9
2.2.2. Efectos biológicos en humanos y animales (micotoxicosis).....	10
2.2.3. Pérdidas económicas.....	12
2.2.4. Prevención de la contaminación con micotoxinas.....	13

2.3. Hongos toxigénicos	14
2.3.1. Significado de la contaminación fúngica de los alimentos.....	14
2.3.2. Principales géneros toxigénicos.....	15
2.3.2.1. <i>Alternaria</i> spp.....	15
Morfología e identificación.....	16
Ambiente.....	16
Micotoxinas.....	17
2.3.2.2. <i>Aspergillus</i> spp.....	17
Morfología e identificación.....	17
Ambiente.....	19
Micotoxinas.....	19
2.3.2.3. <i>Fusarium</i> spp.....	20
Morfología e identificación.....	20
Ambiente.....	21
Micotoxinas.....	22
2.3.2.4. <i>Penicillium</i> spp.....	22
Morfología e identificación.....	22
Ambiente.....	23
Micotoxinas.....	24
2.3.3. Hongos de campo y hongos de almacenamiento.....	24
2.3.4. Presencia de hongos toxigénicos en cereales.....	25
2.3.4.1. Presencia de hongos toxigénicos en cebada.....	27
2.3.5. Principales micotoxinas en cereales.....	29
2.3.5.1. Aflatoxinas.....	29
Estructura.....	29
Efectos tóxicos.....	30
Aflatoxicosis.....	30
Medidas sanitarias.....	31
2.3.5.2. Fumonisinias.....	31
2.3.5.3. Ocratoxina A.....	32
2.3.5.4. Tricotecenos.....	33
2.3.5.5. Zearalenona.....	34

3. OBJETIVOS	35
---------------------	----

4. MATERIAL Y MÉTODOS	36
------------------------------	----

4.1. Zona de estudio	36
4.1.1. Localización.....	36
4.1.2. Límites.....	36
4.1.3. Clima.....	37
4.2. Muestras analizadas	37
4.3. Métodos	38
4.3.1. Recuento de mohos y levaduras.....	39
4.3.2. Identificación de colonias fúngicas.....	40
4.3.2.1. Criterios de identificación.....	40
4.3.3. Aislamiento de colonias fúngicas potencialmente micotoxigénicas.....	41
4.3.4. Congelación de las cepas.....	41
4.3.5. Determinación de la capacidad aflatoxigénica en medio de cultivo.....	42
4.3.6. Extracción y determinación de aflatoxinas totales.....	42
4.3.6.1. Fundamento de la técnica.....	42
4.3.6.2. Preparación de las muestras.....	43
4.4. Análisis estadístico	43
4.4.1. Análisis de varianza.....	43

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
------------------------------------	----

5.1. Recuento total de mohos y levaduras	44
5.1.1. Muestras recolectadas un mes previo a la cosecha (PC).....	44
5.1.2. Muestras recolectadas en la etapa de cosecha (CO).....	47
5.1.3. Muestras almacenadas.....	50

5.1.3.1. Muestras almacenadas durante 3 meses (ALM3).....	50
5.1.3.2. Muestras almacenadas durante 5 meses (ALM5).....	51
5.1.4. Comparación de resultados en las diferentes etapas.....	55
5.2. Géneros fúngicos aislados.....	59
5.2.1. Muestras recolectadas un mes previo a la cosecha (PC).....	59
5.2.2. Muestras recolectadas en la etapa de cosecha (CO).....	60
5.2.3. Muestras almacenadas.....	62
5.2.3.1. Muestras almacenadas durante 3 meses (ALM3).....	62
5.2.3.2. Muestras almacenadas durante 5 meses (ALM5).....	62
5.2.4. Comparación de resultados en las diferentes etapas.....	63
5.3. Géneros potencialmente toxigénicos.....	67
5.3.1. Muestras recolectadas un mes previo a la cosecha (PC).....	67
5.3.2. Muestras recolectadas en la etapa de cosecha (CO).....	68
5.3.3. Muestras almacenadas.....	69
5.3.3.1. Muestras almacenadas durante 3 meses (ALM3).....	69
5.3.3.2. Muestras almacenadas durante 5 meses (ALM5).....	70
5.3.4. Comparación de resultados en las diferentes etapas.....	72
5.4. Contenido de aflatoxinas totales.....	77
5.5. Capacidad aflatoxigénica en medio de cultivo.....	79
6. CONCLUSIONES	81
<hr/>	
7. PERSPECTIVAS	82
<hr/>	
8. BIBLIOGRAFÍA	83
<hr/>	
9. ANEXOS	88
<hr/>	



ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Esporas sexuales y asexuales de los hongos filamentosos.....	5
Figura 2.	Estructuras morfológicas del género <i>Alternaria</i> spp.....	16
Figura 3.	Estructuras morfológicas del género <i>Aspergillus</i> spp.....	18
Figura 4.	Estructuras morfológicas del género <i>Fusarium</i> spp.....	21
Figura 5.	Estructuras morfológicas del género <i>Penicillium</i> spp.....	23
Figura 6.	Localización del Municipio de Tlanalapa.....	36
Figura 7.	Diagrama de la metodología utilizada para el estudio de las muestras de cebada.....	38
Figura 8.	Depósito del inóculo de esporas sobre la superficie del medio.....	41
Figura 9.	Recuento de mohos y levaduras en las muestras PC.....	44
Figura 10.	Recuento de mohos de las muestras PC.....	45
Figura 11.	Recuento de levaduras de las muestras PC.....	45
Figura 12.	Recuento de mohos y levaduras de las muestras CO.....	47
Figura 13.	Recuento de mohos de las muestras CO.....	48
Figura 14.	Recuento de levaduras de las muestras CO.....	48
Figura 15.	Recuento de mohos y levaduras de las muestras ALM3.....	50
Figura 16.	Recuento de mohos de las muestras ALM3.....	51
Figura 17.	Recuento de levaduras de las muestras ALM3.....	51
Figura 18.	Recuento de mohos y levaduras de las muestras ALM5.....	52
Figura 19.	Recuento de mohos de las muestras ALM5.....	52
Figura 20.	Recuento de levaduras de las muestras ALM5.....	53
Figura 21.	Medias de los recuentos de mohos y levaduras en las etapas de muestreo.....	58
Figura 22.	Medias de los recuentos de mohos en las etapas de muestreo.....	58
Figura 23.	Medias de los recuentos de levaduras en las etapas de muestreo.....	58
Figura 24.	Géneros potencialmente toxigénicos aislados en las muestras PC.....	67
Figura 25.	Géneros potencialmente toxigénicos aislados en muestras CO.....	68
Figura 26.	Géneros potencialmente toxigénicos aislados en las muestras ALM3.....	70
Figura 27.	Géneros potencialmente toxigénicos aislados en las muestras ALM5.....	70

Figura 28.	Promedio de los recuento de <i>Alternaria</i> en cada etapa.....	76
Figura 29.	Promedio de los recuentos de <i>Aspergillus</i> en cada etapa.....	76
Figura 30.	Promedio de los recuentos de <i>Fusarium</i> en cada etapa.....	76
Figura 31.	Promedio de los recuentos de <i>Penicillium</i> en cada etapa.....	76



ÍNDICE DE FOTOS

		Pág.
Foto 1.	Colonias de <i>Alternaria</i> spp. después de 5 días de incubación en agar EM, a 25°C, aisladas en la etapa ALM5.....	73
Foto 2.	Microfotografía de conidios de una cepa de <i>Alternaria</i> spp. aislada en la etapa ALM5. 1800 magnificaciones.....	73
Foto 3.	Colonias de <i>Aspergillus</i> spp. después de 7 días de incubación en agar EM a 25°C, aisladas en la etapa CO.....	73
Foto 4.	Microfotografía de un conidióforo de una cepa de <i>Aspergillus</i> spp. aislada en la etapa CO. 500 magnificaciones.....	73
Foto 5.	Colonias de <i>Fusarium</i> spp. después de 5 días de incubación en agar EM, a 25°C, aisladas en la etapa ALM3.....	74
Foto 6.	Microfotografía de conidios de una cepa de <i>Fusarium</i> spp. aislada en la etapa ALM3. 5000 magnificaciones.....	74
Foto 7.	Colonias de <i>Penicillium</i> spp. después de 5 días de incubación en agar EM a 25°C, aisladas en la etapa PC.....	74
Foto 8.	Microfotografía de un conidióforo de una cepa de <i>Penicillium</i> spp. aislada en la etapa PC. 600 magnificaciones.....	74



ÍNDICE DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1.	Micotoxinas más importantes, géneros que las pueden producir, efectos tóxicos y productos susceptibles de contaminación.....	11
Cuadro 2.	Especies toxigénicas del género <i>Aspergillus</i> más importantes y las micotoxinas que pueden llegar a producir.....	19
Cuadro 3.	Especies toxigénicas del género <i>Fusarium</i> más importantes y las micotoxinas que pueden llegar a producir.....	22
Cuadro 4.	Especies toxigénicas del género <i>Penicillium</i> más importantes y las micotoxinas que pueden llegar a producir.....	24
Cuadro 5.	Mohos toxigénicos y micotoxinas encontrados en granos de cereales.....	26
Cuadro 6.	Porcentaje de frecuencia de los géneros fúngicos aislados en las muestras PC y CO.....	61
Cuadro 7.	Porcentaje de frecuencia de los géneros fúngicos aislados en las muestras ALM3 y ALM5.....	63
Cuadro 8.	Comparación con otros autores de los géneros aislados en las diferentes etapas de nuestro estudio.....	65
Cuadro 9.	Concentración de aflatoxinas en las muestras CO.....	77
Cuadro 10.	Cepas aisladas de <i>Aspergillus</i> , etapa en la que se obtuvieron y productor al que pertenecen.....	79

A close-up photograph of golden wheat stalks at sunset. The sun is low on the horizon, creating a warm, golden glow and lens flare effects. The wheat stalks are in sharp focus, showing their intricate structure and the fine hairs on the awns. The background is a soft, out-of-focus field of wheat under a clear sky.

Introducción



1. INTRODUCCIÓN

Los hongos filamentosos o mohos, son organismos ubicuos, resistentes y la mayoría de ellos no son muy exigentes en cuanto a sus necesidades nutritivas. Estos organismos, debido a sus características fisiológicas se desarrollan fácilmente sobre diversos productos alimenticios, provocando una disminución en la calidad de los mismos y un elevado riesgo sanitario debido a la capacidad que tienen ciertos géneros para producir determinados metabolitos secundarios tóxicos, conocidos como micotoxinas.

Los géneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp. se consideran como los géneros toxigénicos más importantes a nivel mundial, productores de aflatoxinas, fumonisinas, alternariol, altenueno, ocratoxinas, tricotecenos y zearalenona, sustancias que son capaces de desencadenar diversos cuadros patológicos en el hombre y los animales, que van desde el desarrollo de actividades carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas, hasta la producción de desórdenes de tipo hormonal o inmunosupresor, dependiendo de la micotoxina considerada. Estos géneros son contaminantes habituales de los cereales, entre estos la cebada, utilizada principalmente en la elaboración de cerveza y como forraje. En nuestro país, la principal área productora de cebada maltera de temporal está ubicada en la zona del Altiplano Central, la cual abarca varios Municipios del Estado de Hidalgo, incluyendo a Tlanalapa, nuestra zona de estudio.

Debido a que la producción de cebada en el estado de Hidalgo es una práctica extensa, se consideró pertinente efectuar un estudio de la micoflora contaminante y del contenido de aflatoxinas presentes en dichos granos.



Antecedentes



2. ANTECEDENTES

2.1. MICOLOGÍA GENERAL

2.1.1. DEFINICIÓN DE HONGO

Los hongos son organismos eucaróticos, característicamente micelares, heterótrofos, con nutrición por absorción, aclorofílicos, típicamente filamentosos, normalmente rodeados por paredes celulares quitinizadas. Los de tipo microscópico se pueden presentar como células aisladas, las cuales reciben el nombre de levaduras o como filamentos multicelulares microscópicos dotados de un micelio verdadero, en cuyo caso se denominan hongos filamentosos o mohos (Guzmán, 1981; Ulloa, 1991; Herrera y Ulloa, 1998).

El papel de los hongos es muy importante, ya que son responsables en gran medida de la descomposición de los restos vegetales y de la sustancia orgánica gracias a su ubicuidad y a su número extremadamente alto; sin embargo, debido a su capacidad de utilizar la celulosa, también contribuyen a la destrucción de la madera para construcción, e incluso pueden causar enmohecimiento de la ropa (Guzmán, 1981; Bold *et al.*, 1988). Estos organismos, si las condiciones lo permiten, pueden crecer sobre la superficie de los alimentos con su típico aspecto aterciopelado o algodonoso, y a veces pigmentado, causando su alteración y posterior deterioro (Frazier y Westhoff, 2000).

2.1.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

La morfología de los mohos se utiliza para identificarlos, mediante observaciones macroscópicas y microscópicas. En el laboratorio se puede observar correctamente la morfología de estos organismos, los cuales tienden a crecer más o menos igualmente en todas direcciones a partir de un punto central, por lo que al inocularlos en medios sólidos las colonias desarrollan una forma circular (Constantine, 1979).

2.1.2.1. Estructuras somáticas

Los hongos poseen un talo bien definido y diferenciado, que no es otra cosa que la colonia entera que puede llegar a formar el hongo, y está formado por filamentos tubulares con aspecto de hilo, a estos filamentos se les conoce con el nombre de hifas y al conjunto de éstas micelio (Bold *et al.*, 1988; Isaac, 1992). Las hifas se denominan sumergidas cuando crecen dentro del alimento o aéreas cuando crecen en la atmósfera existente por encima del alimento. También se pueden clasificar en somáticas (encargadas principalmente de la nutrición del moho) y fértiles (encargadas de dar origen a los órganos reproductores) [Frazier y Westhoff, 2000].

El crecimiento de las hifas ocurre por extensión del extremo apical, aunque una sola hifa puede proliferar por distancias considerables, cada hifa puede exhibir un crecimiento más o menos ramificado (Isaac, 1992).

Los mohos se dividen en dos grupos: septados y no septados o cenocíticos. Los mohos septados constituyen el grupo más complejo (Isaac, 1992); es decir, están provistos de tabiques transversales que dividen a las hifas en celdas o células que pueden llegar a tener más de un núcleo (Bold *et al.*, 1988), los hongos no septados poseen hifas claramente formadas por cilindros desprovistos de tabiques trasversales, en este tipo de hifas los núcleos están incluidos en el citoplasma y distribuidos más o menos de manera uniforme en todo el micelio (Constantine, 1979; Frazier y Westhoff, 2000).

2.1.2.2. Órganos o estructuras reproductoras

Los mohos son capaces de crecer a partir de un trozo de micelio transplantado (reproducción somática). La mayoría de los mohos se reproducen principalmente por medio de esporas asexuales. Los mohos que se reproducen por medio de esporas sexuales se denominan perfectos, los cuales se dividen en *Zygomycetes* si no son septados, o bien en *Ascomycetes* o *Basidiomycetes* si son septados. Los mohos que sólo se reproducen por medio de esporas asexuales se denominan imperfectos; *Fungi imperfecti* (Frazier y Westhoff, 2000). En este

grupo (anteriormente denominado *Deuteromycetes*) se encuentran ubicados los hongos productores de micotoxinas (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Las estructuras reproductoras están diferenciadas de las estructuras somáticas y exhiben una variedad de formas que se utilizan para su clasificación. Pocos hongos pueden ser identificados si no se dispone de sus estadios reproductores, puesto que sus estructuras somáticas son muy parecidas entre sí (Constantine, 1979).

Esporas asexuales

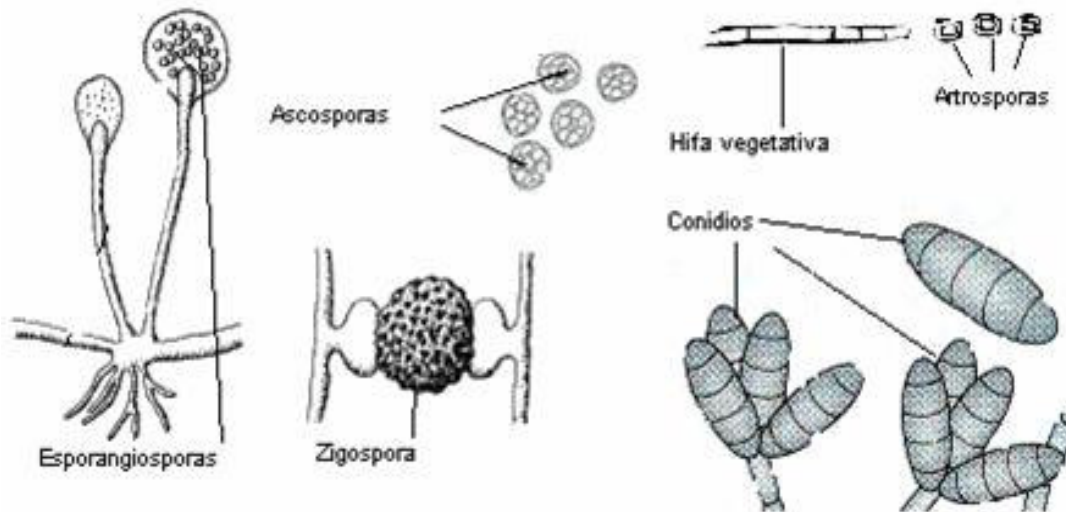
Son de tamaño pequeño, ligeras y resistentes a la desecación. Se diseminan fácilmente por la atmósfera para sedimentar y originar el talo de un nuevo moho en aquellos lugares en los que se encuentren condiciones favorables. Los tres tipos principales de esporas asexuales son: conidios, artrosporas u oidios y esporangiosporas (fig. 1).

Los conidios se separan, o crecen, en determinadas hifas fértiles denominadas conidióforos y generalmente son libres, es decir, no se encuentran dentro de ningún receptáculo. Las artrosporas se forman por fragmentación de una hifa, de forma que las células de la hifa se transforman en esporas. Las esporangiosporas se encuentran dentro de un receptáculo o esporangio, situado en el extremo de una fértil (esporangióforo). Algunas especies de mohos producen un cuarto tipo de espora asexual, la clamidospora, cuando determinadas células distribuidas en el micelio almacenan alimentos de reserva, aumentando de tamaño y produciendo una pared de mayor grosor. Esta clamidospora o célula latente es capaz de soportar condiciones desfavorables del medio (Frazier y Westhoff, 2000).

El término fructificación o cuerpo fructífero (esporoma) se utiliza para designar cualquier estructura que contenga esporas (Constantine, 1979).

Esporas sexuales

Los *Zygomycetes* forman zigosporas (fig. 1) mediante la fusión de los extremos de dos hifas, que pueden pertenecer al mismo micelio o a diferentes micelios. Los mohos de tipo septado *Ascomycetes*, forman esporas a las que se les conoce con la denominación de ascosporas (Fig. 1), estas esporas se encuentran en el interior de un asca o saco (Frazier y Westhoff, 2000).

Figura 1. Esporas sexuales y asexuales de los hongos filamentosos

Adaptado de: www.unex.es y www.cat.cc.md.us.

2.1.3. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS

2.1.3.1. Necesidades nutritivas

Los hongos obtienen su alimento como parásitos, infectando organismos vivos o como saprobios creciendo sobre sustancia orgánica muerta. Los hongos que viviendo sobre la sustancia muerta son incapaces de infectar a los organismos vivos, se llaman saprobios obligados; aquellos que según las circunstancias pueden causar enfermedad o vivir sobre sustancia orgánica muerta, se llaman parásitos facultativos y los que sólo pueden vivir sobre protoplasma vivo, parásitos obligados (Constantine, 1979). Los hongos que crecen en las plantas como parásitos, comúnmente penetran directamente a través de una superficie intacta del huésped, pero en ocasiones utilizan las entradas naturales tales como los estomas (Deacon, 1997). Obtienen su alimento mediante la secreción externa de varias enzimas que digieren el sustrato en el que viven, de manera que las sustancias nutritivas en disolución puedan pasar a través de las paredes celulares y de las membranas citoplasmáticas al interior de las células. Los hongos necesitan moléculas de glúcidos ya elaboradas, así como también de vitaminas y elementos minerales como el nitrógeno, el fósforo, potasio, azufre, hierro, magnesio, manganeso y boro. Dichos elementos los obtienen a partir del sustrato en forma de sales en solución; por ejemplo, pueden utilizar sales amónicas como fuente de nitrógeno, sin embargo,

algunos son incapaces de utilizar este tipo de sales y en cambio prefieren otras fuentes de nitrógeno como aminoácidos sencillos, ácido glutámico y la asparagina, y quizás nitratos (Bold *et al.*, 1988; Deacon, 1997).

2.1.3.2. pH

La mayoría de los hongos crecen bien en un rango de pH que va de 4 a 7 en condiciones favorables, aunque también existen varios tipos de hongos que son ácido tolerantes, que pueden sobrevivir hasta pH 2. Los hongos tienden a acidificar el ambiente durante su crecimiento, por la secreción de ácidos orgánicos, por ejemplo, ácido cítrico, ácido fumárico y oxalacetato (derivado del ácido oxálico); lo que en algunos casos, les provee una ventaja ecológica (Deacon, 1997), debido a que pueden ser más tolerantes a valores de pH bajos que muchos otros microorganismos (Isaac, 1992).

2.1.3.3. Temperatura

Para la mayoría de los mohos, la temperatura óptima de crecimiento se encuentra alrededor de los 25 a 30°C, aunque algunos pocos pueden llegar a crecer bien a temperaturas comprendidas entre los 35 y los 37°C. Algunos mohos son psicrótrofos y algunos son capaces de crecer lentamente a temperaturas inferiores a la de congelación, otras especies son más termotolerantes y pueden crecer a una temperatura cercana a los 50°C (Isaac, 1992; Deacon, 1997; Frazier y Westhoff, 2000).

2.1.3.4. Oxígeno

La mayoría de los hongos son aerobios obligados, al menos los que crecen en la superficie de los alimentos, en el sentido de que requieren del oxígeno al menos en alguna etapa de su ciclo vital y su crecimiento se ve marcadamente reducido si la presión parcial del oxígeno es mucho más baja que la que existe en el aire (Griffin, 1994; Deacon, 1997; Frazier y Westhoff, 2000).

2.1.3.5. Dióxido de carbono

Diversos trabajos de investigación han demostrado que todos los hongos requieren CO₂, en pequeñas cantidades para su crecimiento. Las principales vías de incorporación de CO₂ es mediante las reacciones de carboxilación, que generan ácidos grasos, oxalacetatos, ácido málico, etc. Los hongos que crecen en condiciones anaeróbicas comúnmente tienen altos requerimientos de CO₂, mientras que la mayoría de los hongos aeróbicos se ven inhibidos en concentraciones altas de este gas (Griffin, 1994; Deacon, 1997).

2.1.3.6. Actividad de agua (a_w)

Los hongos, como todos los microorganismos, requieren agua, que actúa como medio en el cual todos los componentes celulares se encuentran inmersos, también es indispensable para la difusión de nutrientes dentro de las células y para mantener íntegro su citoplasma. Los substratos y enzimas están en solución acuosa o en suspensión coloidal y ninguna actividad enzimática puede ocurrir en ausencia de agua. El movimiento de agua dentro y fuera de la hifa, ocurre por ósmosis (Griffin, 1994), gracias a este fenómeno se puede generar cierto estrés, que puede ser causado por un aumento en el nivel de solutos dispersos en el medio. La mayoría de los hongos tolera mejor los potenciales osmóticos impuestos por soluciones azucaradas, que los causados por soluciones salinas, una comparación entre los hongos tolerantes a este tipo de estrés y los que no son tolerantes, es que ambos tipos de hongos, generan productos compatibles en respuesta a este tipo de presión osmótica, pero difieren en su capacidad de retener estos compuestos dentro de sus células (Deacon, 1997).

De acuerdo a la necesidad de humedad, Ramírez (1984) clasifica a los hongos de la siguiente manera:

- ◆ Hidrófilos: cuando el mínimo de humedad relativa que requieren para un desarrollo óptimo es de 90%
- ◆ Mesófilos: cuando al mínimo de humedad relativa requerido está entre 80 y 90%
- ◆ Xerófilos: cuando el mínimo de humedad relativa requerido es menor de 80%

Se podría decir en general, con algunas excepciones, que las levaduras ejemplifican a las formas hidrófilas; algunas especies de *Penicillium* a las mesófilas y miembros del género *Aspergillus* a las xerófilas (Ramírez, 1984). Las levaduras que se desarrollan también a una baja a_w condicionada por la presencia de azúcares se califican como organismos osmófilos y, en el caso de los hongos se habla de xerófilos, aunque con frecuencia se utiliza esta última designación para hablar de unos y otros (Fernández, 2000).

Los hongos que son tolerantes al estrés osmótico o xerófilos, son importantes en un sentido económico pues deterioran los granos de cereal y otros productos almacenados. Ninguno de estos hongos puede crecer si el grano ha sido secado hasta alcanzar un nivel de humedad de 14% (Deacon, 1997).

2.2. MICOTOXINAS

Las micotoxinas (“mico” significa hongo, y “toxina” significa veneno) son metabolitos secundarios tóxicos, producidos por algunos géneros de mohos, las cuales pueden estar presentes en los alimentos, tanto si son destinados para consumo humano o animal, o en las materias primas utilizadas para su manufactura (Adams & Moss, 2000). Mientras que los metabolitos primarios de los hongos así como de los otros organismos son aquellos que son esenciales para el crecimiento, los metabolitos secundarios, en cambio, se forman durante el final de la fase de crecimiento exponencial y carecen de importancia aparente para el organismo que lo produce, con respecto a su crecimiento o a su metabolismo (Jay, 2002). En contraste con las toxinas de origen bacteriano, las cuales son principalmente proteínas con propiedades antigénicas (Chu, 2002), las micotoxinas son sustancias que tienen estructuras químicas muy diversas con un peso molecular relativamente bajo. Esta es la causa principal de su elevada resistencia al calor (Mossel y Moreno, 2003).

De acuerdo a Carrillo (2003), la presencia de las micotoxinas, en los vegetales puede deberse a:

- ◆ Infección de la planta en el campo por el hongo patógeno o a la colonización por los saprobios

- ◆ Crecimiento de los mohos saprobios o patógenos post-cosecha sobre los frutos y granos almacenados
- ◆ Desarrollo fúngico saprobio durante el almacenamiento de los materiales ya procesados

2.2.1. RIESGO SANITARIO

La contaminación por micotoxinas en los alimentos se puede dar de forma directa o indirecta. La contaminación directa se presenta por la invasión de un moho y la consecuente producción de micotoxinas sobre un alimento, mientras que la contaminación indirecta se debe a la presencia de una materia prima previamente contaminada con un moho toxigénico que ya ha desaparecido y cuya micotoxina persiste. La contaminación de los productos hortícolas y animales con micotoxinas no es importante, mientras que la de los granos es variable (Carrillo, 2003). Entre los granos, las micotoxinas prevalecen como la primera causa de riesgo para la salud ya que el consumo de granos contaminados, así como sus productos derivados, puede ser fatal si las micotoxinas están en altas cantidades, además que la exposición a largo plazo puede causar trastornos severos.

Si bien los riesgos a los que se enfrenta la salud humana, provienen de la contaminación de granos por sustancias o elementos tóxicos, las micotoxinas son las únicas de todas estas sustancias, que se producen de forma natural en el grano y su presencia, al menos inicialmente, se ve asociada con factores incontrolables tales como las condiciones climáticas (Dohlman, 2003).

La presencia de una micotoxina, y el peligro asociado, solamente puede ser determinado después de la extracción e identificación de la misma debido a que:

- ◆ La presencia del hongo no asegura que exista una micotoxina
- ◆ La micotoxina continúa en el alimento aunque el moho haya desaparecido
- ◆ Un hongo dado puede producir más de una micotoxina
- ◆ Una determinada toxina puede ser formada por más de una especie de mohos (Swanson, 1987)

Las micotoxinas son muy resistentes al calor por lo que el cocinado y el procesado de los productos alimenticios no necesariamente las eliminan. Sin embargo, es posible reducir el nivel de contaminación mediante distintos procedimientos: a través de la limpieza y separación de aquellas fracciones que aparezcan contaminadas, por medio de la adsorción con materiales como carbones activos y ciertos aluminosilicatos, aunque el material contaminado debe estar en solución acuosa y si bien este mecanismo puede reducir la contaminación de ciertas micotoxinas, no sucede lo mismo con otras. La degradación química es un proceso viable, sin embargo, para que sea eficaz debe realizarse a altas temperaturas y presión elevada, lo que generalmente provoca modificaciones a la calidad sensorial del producto (Antón y Lisazo, 2001).

Es por eso que para proteger la salud de los consumidores se han establecido límites (para las micotoxinas), encargados de evitar o minimizar los riesgos que pudieran existir (Dohlman, 2003).

2.2.2. EFECTOS BIOLÓGICOS EN HUMANOS Y ANIMALES (MICOTOXICOSIS)

Las micotoxinas son capaces de desencadenar diversas alteraciones y cuadros patológicos en el hombre y los animales, que van desde el desarrollo de actividades carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas, hasta la producción de desórdenes de tipo hormonal o inmunosupresor, dependiendo de la micotoxina considerada (Robledo *et al.*, 2001). Dichos efectos sobre la salud animal y humana se conocen como micotoxicosis, cuya gravedad depende de la toxicidad de la micotoxina, del grado de exposición, de la edad y de los posibles efectos sinérgicos de otros agentes químicos a los que esté expuesto, también hay diferencias significativas entre especies e incluso entre organismos de la misma especie (incluido el hombre), el sexo es otro factor, y la toxicidad de las aflatoxinas también varía de acuerdo con muchos factores nutricionales (Pier *et al.*, 1985; Peraica *et al.*, 1999). Una micotoxicosis primaria se produce al consumir productos de origen vegetal contaminados, y secundaria al ingerir carne o leche de animales que comieron forrajes con micotoxinas (Carrillo, 2003).

Desde el punto de vista histórico, el primer caso documentado de micotoxicosis atribuido a un alimento que contenía hongos fue el del cornezuelo del centeno, el moho responsable de esto, *Claviceps purpurea*, parásito del centeno y otros granos de cereales, elabora varios derivados del ácido lisérgico que son los causantes del síndrome, el consumo de centeno cuyos granos estén parasitados por la citada especie fúngica puede producir el ergotismo gangrenoso. Los brotes de ergotismo fueron corrientes durante la edad media (Frazier y Westhoff, 2000). En la actualidad, el ergotismo en humanos es sumamente infrecuente, debido a que los alcaloides causantes del ergotismo son relativamente lábiles y por lo general se destruyen durante el horneado y el cocinado (Peraica *et al.*, 1999). El cuadro 1 muestra las micotoxinas más importantes, los géneros que las pueden producir, sus efectos tóxicos y los productos susceptibles a ser afectados por estas sustancias contaminantes.

Cuadro 1. Micotoxinas más importantes, géneros que las pueden producir, efectos tóxicos y productos susceptibles de contaminación

Micotoxina	Género	Principales efectos tóxicos	Producto susceptible de contaminación
Aflatoxinas	<i>Aspergillus</i> spp.	Carcinogénesis, con afinidad especial por el hígado; inmunosupresión	Cacahuates, maíz, semillas de algodón, cereales, nueces, sorgo, higos, frutas secas, especias, aceites vegetales crudos, semillas de cacao, leche y sus derivados
Alternariol	<i>Alternaria</i> spp.	Efectos hemorrágicos	Granos de cereal, tomates, piensos
Ocratoxinas	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.	Hepatotoxicidad; nefrotoxicidad	Cebada, frijoles, café, piensos, maíz, arroz, avena, centeno
Patulina	<i>Penicillium</i> spp.	Toxicidad general y posiblemente carcinogénesis	Manzanas, jugo de manzana, frijoles, avena
Tricotecenos: nivalenol, desoxi-nivanelenol, Toxina T-2	<i>Fusarium</i> spp.	Aleukia tóxica alimentaría; neurotoxicidad; efectos teratógenos; inflamaciones	Maíz, piensos, paja
Zearalenona	<i>Fusarium</i> spp.	Interferencia con los sistemas de hormonas esteroides	Cereales, maíz, piensos, arroz

Adaptado de: Wilson *et al.*, 1994; Antón y Lisazo, 2001; Chu, 2002 y Mossel y Moreno, 2003

Características de una micotoxicosis:

- ◆ No es una enfermedad transmisible
- ◆ El tratamiento con drogas o antibióticos tiene poco o ningún efecto
- ◆ En los brotes observados en el campo, el problema es estacional debido a que las condiciones climáticas afectan al desarrollo del hongo
- ◆ El examen del alimento o forraje sospechoso revela signos de actividad fúngica
- ◆ El brote está comúnmente asociado a un alimento o forraje específico (Carrillo, 2003)

2.2.3. PÉRDIDAS ECONÓMICAS

Los géneros fúngicos que se encuentran como parásitos de organismos vivos, causan la mayor parte de las enfermedades a las plantas (Guzmán, 1981). Cerca del 70% de las enfermedades de cultivos son causadas por hongos, con un costo económico de billones de dólares al año (Deacon, 1997).

Cuando un alimento (cereales, carne, etc.) se encuentra contaminado con niveles de micotoxinas por encima de las normas establecidas por lo general debe desecharse, lo que provoca grandes pérdidas económicas. Bajos niveles de las mismas en los piensos y el forraje afectan a la salud del animal haciéndolos más susceptibles a las enfermedades infecciosas, esto trae como resultado un decremento en la tasa reproductiva, en la producción de leche y huevo y pérdidas de calidad en productos de origen animal (Chu, 2002; Dohlman, 2003).

Del 25 al 50 por ciento de los cultivos destinados a la alimentación son afectados a nivel mundial por las micotoxinas. Los numerosos reportes, que se centran en las diferentes regiones o países, productos, toxinas y costos tales como de regulación, pruebas, pérdidas de producción y pérdidas de comercio, ofrecen cierto panorama del costo económico que representan las micotoxinas.

Dohlman (2003) reporta un estudio realizado por la administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) en 2002, donde se estimó que en los Estados

Unidos, las pérdidas de cultivos debido a la contaminación por micotoxinas ascendía a 932 millones de dólares anualmente, pérdidas adicionales de 466 millones de dólares se calcularon para fortalecer la prevención o reducir la contaminación (medidas regulatorias, exámenes y otras medidas de control de calidad). En el mismo estudio, las pérdidas de ganado se promediaron en 6 millones anualmente también se han estimado pérdidas de producción en la industria de aves de corral y cerdo que sobrepasan los 100 millones de dólares.

En el caso de países en vías de desarrollo, la pérdida de oportunidades de exportación hacia los países desarrollados (los cuales comúnmente tienen límites más estrictos) es más significativa. El rompimiento potencial de exportaciones de alimentos, que resulta de acciones regulatorias en mercados de altos ingresos es agigantado por el hecho de que cerca del 70 por ciento del total de los alimentos que se exportan son destinados a países desarrollados.

En algunos casos los países en vías de desarrollo han experimentado pérdidas de mercados debido al persistente problema de las micotoxinas o a la imposición de nuevas y más estrictas medidas regulatorias de países importadores (Dohlman, 2003).

2.2.4. PREVENCIÓN DE LA CONTAMINACIÓN CON MICOTOXINAS

La forma más eficaz de combatir estos contaminantes consiste en prevenir, o al menos, reducir la contaminación fúngica por hongos de los alimentos vegetales y animales. Un método común para minimizar los riesgos a la salud por el consumo de alimentos es la adopción de buenas prácticas de agricultura (BPA) en estadios como precosecha y cosecha, y buenas prácticas de manufactura (BPM) en las etapas de procesado y distribución. (Ferris *et al.*, 2001; Dohlman, 2003). Estas estrategias (implementadas independientemente por grupos privados o requeridas por agencias públicas) pueden ser usadas para el control y para minimizar riesgos, desde el principio hasta el fin de la producción, manejo y procesamiento. Esto puede complementar las normas de los productos, y reducir totalmente las potenciales pérdidas económicas.

Un reporte de la 34ª sesión del Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (CCFAC, por sus siglas en inglés), llevada a cabo en el año

2002, recomendaba (si se tiene en cuenta, después de todo, que la prevención de la contaminación por micotoxinas es más práctica que la descontaminación) que las BPA y las BPM, pueden ser usadas para establecer formalmente el análisis de riesgos y puntos críticos de control en los sistemas de seguridad alimentaria, para identificar, monitorear y controlar el riesgo por micotoxinas a todo lo largo de la cadena de producción (Dohlman, 2003).

2.3. HONGOS TOXIGÉNICOS

Ciertos géneros fúngicos son capaces de producir micotoxinas, aunque la producción de estas sustancias, así como el desarrollo de los hongos se ven condicionados altamente por la especie fúngica y por ciertos factores ambientales (Harbison *et al.*, 2004). Dentro de una especie considerada potencialmente toxigénica, el porcentaje de cepas productoras puede ser muy distinto según la micotoxina, por lo que la producción de un determinado metabolito secundario también dependerá del genotipo de la cepa (Abarca *et al.*, 2000).

Las cepas toxigénicas presentes en los alimentos, no pueden ser diferenciadas de las no toxigénicas sólo por sus características morfológicas. Es necesario dejar crecer los mohos bajo condiciones óptimas y controladas y también hay que examinar el material que se sospecha contaminado, para corroborar la presencia o ausencia de micotoxinas (Ray, 2001).

2.3.1. SIGNIFICADO DE LA CONTAMINACIÓN FÚNGICA DE LOS ALIMENTOS

El significado de la contaminación fúngica de los alimentos deriva no sólo del potencial de los hongos para deteriorarlos, sino también del potencial de muchos de ellos para producir micotoxinas a las que el hombre presenta susceptibilidad. Además, la mayoría de los hongos son capaces de provocar infecciones y reacciones alérgicas en personas hipersensibles a los antígenos fúngicos.

Hoy en día, la presencia/ausencia de hongos en los alimentos se considera como un índice de condiciones higiénicas de la materia prima y de las condiciones de manipulación durante la elaboración de productos alimenticios.

La contaminación fúngica de los alimentos puede considerarse desde un doble aspecto (Berenguer, 2000):

1. Efectos sobre los alimentos:

- ◆ Modificación del valor nutricional
- ◆ Modificación de las características organolépticas
- ◆ Dificultades de conservación

2. Efectos sobre el hombre y los animales:

- ◆ Patógenos (micosis). Se ha comprobado que ciertos mohos pueden ser tanto agentes causales de micosis como de intoxicaciones (por ejemplo *Aspergillus fumigatus* y *A. versicolor*)
- ◆ Alergénica (alergias)
- ◆ Tóxica (micotoxicosis)

2.3.2. PRINCIPALES GÉNEROS TOXIGÉNICOS

Los hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* son los que producen las micotoxinas de mayor interés en las micotoxicosis humana y animal; menos considerable se muestra el género *Alternaria* (Fernández, 2000). El desarrollo visible de estos hongos en los alimentos, conlleva al riesgo de la producción de micotoxinas; sin embargo, no constituye una evidencia clara de la presencia de las mismas, de igual forma que la ausencia de hongos toxigénicos viables, incluso demostrado mediante análisis de laboratorio, no es un excluyente de que las toxinas se encuentren en el alimento (Fernández, 2000).

2.3.2.1. *Alternaria* spp.

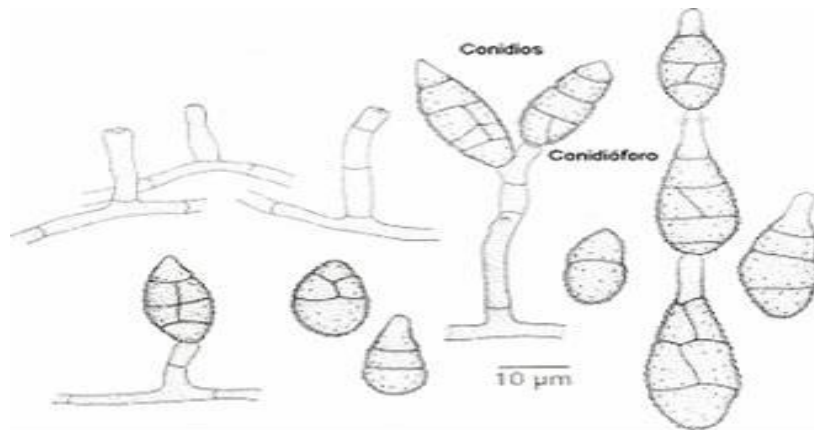
El género *Alternaria* comprende especies cosmopolitas, que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos. Como saprobias pueden deteriorar alimentos y forrajes, como

patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o pueden afectar a los vegetales ya almacenados.

Morfología e identificación

Los conidios de *Alternaria* tienen septos transversales y longitudinales, son de color pardo y con un extremo más angosto, lo que les da la apariencia de tener pico. Nacen por la brotación apical de una célula conidiógena o de la espora anterior, dando lugar en este último caso a una cadena que suele ramificarse si una espora produce más de un brote. Produce conidios fácilmente reconocibles, formados por muchos septos, algunos de ellos verticales (fig. 2). Algunas especies forman los conidios individuales, mientras que otros los producen en cadenas (*Bold et al.*, 1988).

Figura 2. Estructuras morfológicas del género *Alternaria* spp.



Fuente: Samson *et al.*, 2000

En los alimentos, la especie *Alternaria alternata* es la que presenta mayor importancia en cuanto a la producción de micotoxinas, ésta produce cadenas de 10 ó más conidios muy ramificados a partir de conidióforos cortos. La ramificación de los conidios surge de conidióforos secundarios desde células conidiales basales o apicales en relación 1:1 dando un aspecto abierto. Las cadenas aparecen en los cultivos como manojos densos y aislados.

Ambiente

A pesar de ser hongos de campo, este tipo de hongo puede mantenerse sobre frutas y hortalizas causando lesiones que alteren su aspecto. También persisten en granos de cereales

almacenados, si están suficientemente secos para impedir el crecimiento de *Aspergillus* y *Penicillium*. *Alternaria* puede crecer sobre trigo almacenado si los granos tienen una humedad de 22-23%. Después de las especies de *Cladosporium*, es el moho cuyas esporas se encuentran suspendidas en el aire con mayor frecuencia. En los cultivos de cereales, las hojas y los granos son colonizados por esta especie y puede haber una penetración subepidérmica. El género *Alternaria* compite especialmente con los otros hongos sobre la superficie vegetal y es antagonista de *Cladosporium* y *Fusarium*.

La esporulación de *Alternaria* es óptima a 27°C pero es inhibida por debajo de 15°C o por sobre 33°C, aunque el rango de crecimiento está entre 0 y 35°C. La actividad de agua mínima para el desarrollo es 0.8 y la óptima casi 1.00. El crecimiento se reduce a la mitad en una atmósfera con más de 15% de CO₂ o con 2.8% de O₂ (Carrillo, 2003).

Micotoxinas

En cuanto a la producción de micotoxinas, *A. alternata* es la especie más importante del género, *Alternaria* puede llegar a producir ácido tenuazónico, alternariol y alternariol monometileter (Samson *et al.*, 2000).

2.3.2.2. *Aspergillus* spp.

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios y los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos (en especial los producidos por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*), tanto para el hombre como para los animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, apelmazado, amohosado y podredumbre de las semillas. Algunas especies, por ejemplo *A. niger* o *A. oryzae*, son importantes en el ámbito industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones.

Morfología e identificación

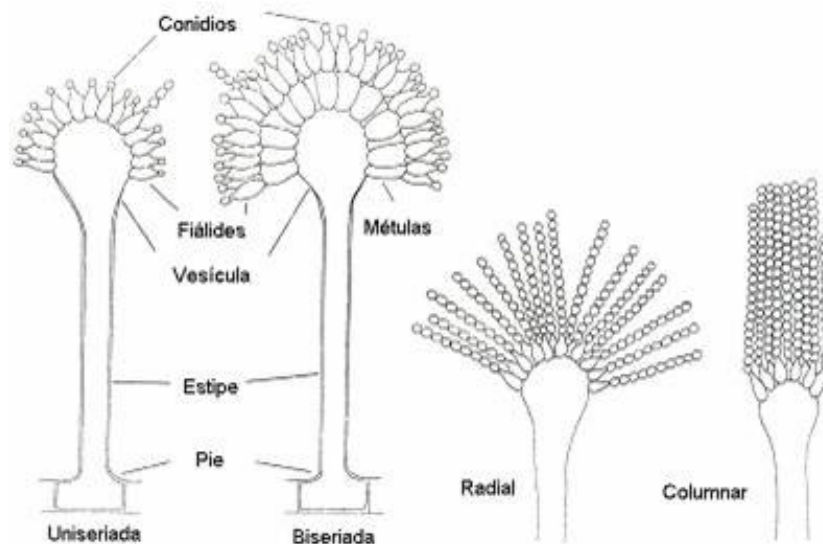
El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de *Aspergillus*. Poseen distintos tipos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas

conidiales (conidióforos), presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme (Carrillo, 2003). Sobre éstas se encuentran las células conidiógenas que originan las esporas asexuales o conidios.

El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque es una estructura unicelular, posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estipe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final a veces separada por un septo, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las cabezas conidiales que sólo presentan fiálides se denominan uniseriadas, y las que presentan fiálides y métulas biseriadas (Abarca, 2000; Samson *et al.*, 2000).

Los conidióforos de *Aspergillus* se originan en unas células micelares denominadas células basales, éstos se mantienen erectos sobre las hifas somáticas y forman unos abultamientos globosos llamados vesículas, en la figura 3 se pueden observar las estructuras, que componen los llamados cuerpos fructíferos de *Aspergillus* (Bold *et al.*, 1988).

Figura 3. Estructuras morfológicas del género *Aspergillus* spp.



Fuente: Samson *et al.*, 2000

Ambiente

La ubicuidad del género *Aspergillus* se debe a su capacidad para crecer en diferentes temperaturas sobre sustratos con diversos contenidos de humedad. La colonización de los granos durante el almacenamiento, se produce de forma explosiva cuando la humedad relativa del ambiente intragranular se eleva por sobre el 70%, sin que se desencadene el fenómeno de brotación.

El rango de temperatura para la mayoría de las especies es de 30-33°C. Si unos granos con un contenido de humedad con el 15% no fueron afectados por *Aspergillus* durante un año es por que la temperatura de almacenamiento estuvo por debajo de 10°C (Carrillo, 2003).

Aunque este género se ha clasificado como de almacenamiento, la humedad del suelo por debajo de lo normal (lo que se llama estrés de sequía) durante la polinización, ha sido relacionada con el incremento en el aire, del número de esporas de *Aspergillus*. Por consiguiente, cuando se presenta el estrés de sequía durante esta etapa, se incrementa la carga de inóculo (esporas en el aire) aumentando la oportunidad de que ocurra una infección, ya que al mantenerse las condiciones de sequía en el campo, *Aspergillus* podría desarrollarse a lo largo de toda la permanencia del cultivo en el campo (Cassel *et al.*, 2001).

Micotoxinas

Al género *Aspergillus* pertenecen varias especies de importancia micotoxigénica (cuadro 2) [Samson *et al.*, 2000].

Cuadro 2. Especies toxigénicas del género *Aspergillus* más importantes y las micotoxinas que pueden llegar a producir

Especie	Micotoxina	Especie	Micotoxina
<i>A. clavatus</i>	Patulina	<i>A. oryzae</i>	Aflatoxinas, ácido kógico, ácido ciclopiazónico
<i>A. flavus</i>	Aflatoxina B ₁ y B ₂ , ácido kógico, ácido ciclopiazónico	<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxina B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂ , ácido kógico
<i>A. fumigatus</i>	Gliotoxina, fumotoxinas	<i>A. tamarii</i>	Ácido ciclopiazónico
<i>A. niger</i>	Nafto-γ-pironas	<i>A. terreus</i>	Patucitrinina, citreoviridina
<i>A. ochraceus</i>	Ácido penicílico, ocratoxina A	<i>A. versicolor</i>	Esterigmatocistina

Fuente: Samson *et al.*, 2000

2.3.2.3. *Fusarium* spp.

Las especies del género *Fusarium* se encuentran en los vegetales antes de la cosecha, pero si la actividad de agua lo permite logran crecer en los productos almacenados, causando alteraciones e incluso produciendo toxinas. La mayoría de las especies de este género no pueden competir con las especies de géneros como *Aspergillus* y *Penicillium* (Carrillo, 2003).

Morfología e identificación

Este género comúnmente desarrolla colonias de crecimiento moderado y profuso, las colonias poseen diversos colores, blanco, rosado, pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo, especialmente en el reverso de la colonia, excepto cuando es pardo oscuro y negro. El micelio es ralo, denso y algodonoso, aunque en algunos casos es limoso. Suelen difundir pigmentos en el agar los cuales pueden variar de color y de tono.

Las características microscópicas que ayudan a su identificación es que poseen conidióforos simples o ramificados, los cuales soportan a las células conidióforas o conidiógenas, las cuales son fiálides simples o ramificadas, a menudo finas o afiladas o con forma de botella, las esporas pueden salir de un solo orificio (monofiálides) o de varios (polifiálides) (fig. 4) (Samson *et al.*, 2000; Carrillo, 2003).

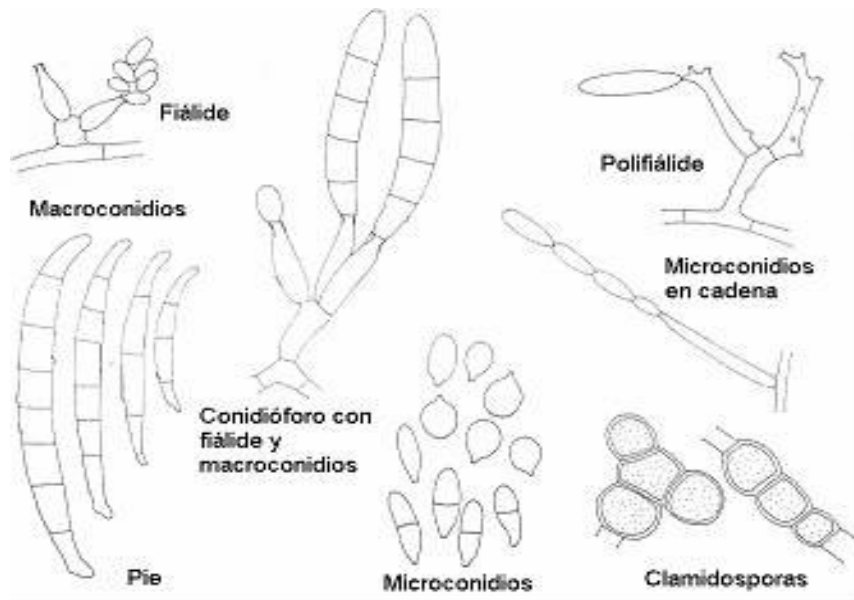
Los tipos de conidios que producen pueden ser macroconidios (fig. 4), que tienen forma de canoa, hialinas y septadas. La célula apical es alargada y la basal tiene forma de pie. Se reproducen en sucesión basipeta a partir de las monofiálides. También pueden ser producidas en esporodoquias, que pueden tener monofiálides o polifiálides. En ocasiones recuerdan un racimo de plátanos.

Los microconidios (fig. 4) son pequeños, generalmente unicelulares y con forma variable (ovoides, elipsoidales, subglobosos, piriformes, etc.). Ocasionalmente tienen un tabique y la base puede ser redondeada, apiculada o truncada. Se producen en el micelio aéreo a partir de monofiálides o polifiálides. Se pueden ver aisladas, en masa o en cadena.

Las clamidosporas se originan por modificación de un segmento de la hifa. Tienen pared gruesa, lisa o rugosa. Se observan aisladas, en parejas, en grupos o en cadenas (Samson *et al.*, 2000; Carrillo, 2003).

La forma y tamaño de las esporas que forma el género *Fusarium* es la característica principal para el reconocimiento del mismo, pero si las colonias pertenecientes al género *Fusarium* no producen macroconidios pueden llegar a ser confundidos con otros géneros puesto que los macroconidios son considerados típicos del género *Fusarium* (Carrillo, 2003).

Figura 4. Estructuras morfológicas del género *Fusarium* spp.



Fuente: Samson *et al.*, 2000

Ambiente

Son patógenos de los cereales y pueden formar micotoxinas en los granos aún antes de la cosecha. Ciertas especies llegan a desarrollarse a temperaturas de refrigeración y contribuir a la podredumbre de frutas y hortalizas almacenadas. La persistencia de este género en el suelo durante uno o varios años se debe, principalmente a la presencia de las clamidosporas (Carrillo, 2003).

Micotoxinas

Muchas especies de *Fusarium* son nocivas para los cultivos de cereales, pues son patógenas de las plantas, pueden causar daños vasculares y foliares, incluso llegan a afectar a los granos. Las micotoxinas generadas por esta especie son muchas (cuadro 3) y algunas son poco conocidas, aunque ya existen normas para unas cuantas, en ciertos países (Samson *et al.*, 2000).

Cuadro 3. Especies toxigénicas del género *Fusarium* más importantes y las micotoxinas que pueden llegar a producir

Especie	Micotoxinas	Especie	Micotoxinas
<i>F. acuminatum</i>	Tricotecenos	<i>F. poae</i>	Tricotecenos
<i>F. crookwellense</i>	Tricotecenos, zearalenona	<i>F. proliferatum</i>	Fumonisinias, ácido fusárico
<i>F. culmorum</i>	Tricotecenos, zearalenona	<i>F. sambucinum</i>	Tricotecenos
<i>F. equiseti</i>	Tricotecenos, zearalenona	<i>F. semitectum</i>	Zearalenona
<i>F. graminearum</i>	Tricotecenos, zearalenona	<i>F. sporotrichioides</i>	Tricotecenos
<i>F. oxysporum</i>	Ácido fusárico	<i>F. verticillioides</i>	Fumonisinias

Fuente: Samson *et al.*, 2000

2.3.2.4. *Penicillium* spp.

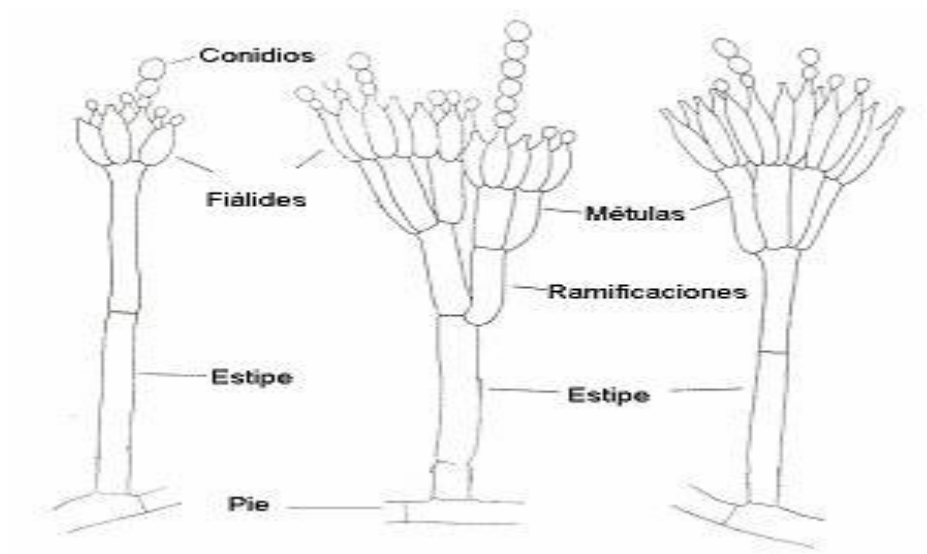
La presencia continua de especies de *Penicillium* en alimentos es un problema particular ya que algunas especies producen toxinas que pueden hacer incomedibles los alimentos, por lo que es común descartar el alimento que muestra desarrollo de cualquier moho. Por otro lado, algunas especies de *Penicillium* son benéficas para los humanos. Quesos como el roquefort, camembert, etc., son madurados con especies de *Penicillium* siendo seguro su consumo, además de que la penicilina es producida por un hongo de esta especie, tal como indica su nombre (Carrillo, 2003).

Morfología e identificación

Las colonias de *Penicillium* usualmente se desarrollan rápidamente, con tintes verdes y usualmente blancos, la mayoría consiste en una densa capa de conidiosporas. Microscópicamente, puede formar cadenas únicas de conidios (ameroconidio) y son producidas en sucesión basípeta por un conidióforo especializado llamado fiálide. En esta especie las fialides pueden ser sencillas, en grupos o de una métula ramificada, dando una

aparición de pincel (fig. 5). Todas las células entre las métulas y la cima del conidióforo son referidas como ramificaciones. Las ramificaciones origen pueden también ser llamadas simples (no ramificadas o monoverticilios), con una ramificación (biverticiliadas-simétricas), con dos ramificaciones (biverticiliadas-asimétricas) y de tres a más ramificaciones. Los conidióforos pueden ser hialinos y con pared rugosa o lisa. Las fiálides son usualmente en forma de frasco con una parte basal cilíndrica. Los conidios son globosos, elipsoidales y cilíndricos (Samson *et al.*, 2000). Existen más de 100 especies-forma, algunos de ellos de gran importancia económica (Bold *et al.*, 1988).

Figura 5. Estructuras morfológicas del género *Penicillium* spp.



Fuente: Samson *et al.*, 2000

Ambiente

Estos hongos llegan a crecer sobre alimentos ya preparados o sobre sus materias primas, ya sean de origen animal o vegetal. Una baja temperatura de almacenamiento puede disminuir la velocidad de deterioro causada por ciertas especies de *Penicillium*, pero no la detiene. Ciertas especies de este moho se pueden encontrar en los cereales antes de la cosecha, especialmente en las épocas húmedas, pero la mayor contaminación ocurre en los almacenes, con las esporas de una cosecha anterior. La esporulación a una baja actividad de agua permite a los hongos completar su ciclo de vida sobreviviendo a las condiciones adversas, para ser luego diseminadas por insectos y ácaros. El género *Penicillium*, al igual que el género *Aspergillus* no se ve afectado por la luz y ambos esporulan fácilmente en la oscuridad (Carrillo, 2003).

Micotoxinas

Muchas especies del género *Penicillium* pueden encontrarse contaminando diversos alimentos, y pueden ser potenciales productoras de micotoxinas (cuadro 4), es por eso que una correcta identificación es importante cuando se estudia la posible contaminación de los alimentos con *Penicillium* (Samson *et al.*, 2000).

Cuadro 4. Especies toxigénicas del género *Penicillium* más importantes y las micotoxinas que pueden llegar a producir

Especie	Micotoxina	Especie	Micotoxina
<i>P. aurantiogriseum</i>	Ácido penicílico	<i>P. griseofulvum</i>	Roquefortina, patulina, ácido ciclopiazónico
<i>P. chrysogenum</i>	Penicillina, roquefortina	<i>P. paneum</i>	Patulina
<i>P. citrinum</i>	Citrinina	<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina A, citrinina
<i>P. expansum</i>	Roquefortina, patulina, citrinina	<i>P. nordicum</i>	Ocratoxina A

Fuente: Samson *et al.*, 2000

2.3.3. HONGOS DE CAMPO Y HONGOS DE ALMACENAMIENTO

Los mohos que producen micotoxinas pueden surgir en el campo (suelo, vegetación muerta y granos ya contaminados) o durante el transporte después de la cosecha o el almacenaje (Dohlman, 2003).

Los hongos de campo invaden los granos antes de la cosecha o tras la siega (siempre previo a la trilladora). Son típicos los géneros *Alternaria* y *Fusarium*; este tipo de hongos requieren de altos niveles de humedad (20-22 %). Los hongos de almacenaje invaden los granos a contenidos inferiores de humedad, los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son ejemplos clásicos de este tipo de mohos (Antón y Lisazo, 2001).

Los hongos de campo que logran sobrevivir a la desecación no logran desarrollarse, no obstante pueden mantenerse viables en el transcurso del almacenamiento durante meses. En contraste, los hongos de almacenaje contaminan los granos muy rápido, inmediatamente después de la cosecha. Estos hongos son principalmente saprobios y el grado de alteración de los granos depende de las condiciones en las cuales se encuentren almacenados los cereales

(ICMSF [Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos], 2001).

En el campo, las condiciones que afectan significativamente la producción de micotoxinas son: el clima, el estrés de las plantas, vectores invertebrados, especie y carga de esporas de hongos infectivos, variación de planta y especie fúngica y competencia microbiana. Mientras que durante el almacenamiento estas condiciones son: la a_w , la temperatura, el daño del cultivo, el tiempo de almacenamiento y un gran número de factores químicos tales como la aireación (niveles de O_2 y CO_2), el tipo de grano, el pH y la presencia o ausencia de nutrientes específicos e inhibidores (Chu, 2002).

2.3.4. PRESENCIA DE HONGOS TOXIGÉNICOS EN CEREALES

Los cereales, constituyen sustratos muy favorables para el desarrollo de los hongos en general y de organismos fúngicos con capacidad micotoxigénica que pueden atacar a los granos en sus diferentes etapas de desarrollo; lo que puede acarrear severas consecuencias tanto en la productividad como en el aspecto sanitario (Jayas, 1995; Akar *et al.*, 2003). Asimismo, los almidones, harinas y maltas derivados de granos infectados por hongos, son de calidad muy inferior en la industria y llegan a ser desechables frecuentemente en el mercado (Ramírez, 1984; Fernández, 2000; ICMSF, 2001).

Los daños a las semillas de cereales debidos a los hongos de campo incluyen manchas, escoriaciones, decoloración, pérdidas de la capacidad de germinación y producción de micotoxinas; además de los daños ya mencionados, los hongos de almacenamiento pueden producir olores anormales, calentamiento, apelmazamiento, pérdida de materia seca, crecimiento visible y cambios químicos y nutritivos (ICMSF, 2001).

Las especies de hongos que atacan a los granos de cereales, dependen principalmente de la clase de grano y de las condiciones ambientales, y pueden hallarse tanto en el interior como en el exterior de la semilla. Los hongos que se encuentran en el interior del grano se localizan especialmente en regiones húmedas y calientes. La mayor parte de estos hongos inician su ataque cuando el grano está en proceso de desarrollo o de maduración. Muchas de estas especies son formas parásitas que en el campo pueden atacar otras partes de las plantas,

además de la semilla. Entre los géneros más comunes que se encuentran en el interior del grano se tiene a *Helminthosporium* spp., *Giberella* spp., *Diplodia* spp. y *Colletotrichum* spp.

La distribución de los hongos que se desarrollan superficialmente en la semilla, es general para todas las regiones. Esto se debe a que las pequeñas esporas son fácilmente llevadas por el viento de un lugar a otro. Además, constituyen un grupo de organismos adaptados a vivir en una gran diversidad de condiciones, tanto climáticas como alimenticias. Entre las especies más comunes, pertenecientes a este grupo de hongos, están varios miembros de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium* y *Alternaria* (Ramírez, 1984).

En el cuadro 5 se indican algunas de las especies de mohos toxigénicas y micotoxinas que han sido encontradas en cereales.

Cuadro 5. Mohos toxigénicos y micotoxinas encontrados en granos de cereales

Grano	Mohos toxigénicos	Toxinas
Arroz	<i>P. citrinum</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. verticilloides</i> , <i>F. fujikuroi</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. chlamydosporum</i> , <i>F. oxysporum</i> .	Fumonisinias Aflatoxinas B ₁ , G ₁ , B ₂ y G ₂
Avena	<i>F. graminearum</i> , <i>A. alternata</i> , <i>P. aurantiogriseum</i> , <i>P. crustosum</i>	Alternariol, desoxinivalenol, zearalenona, toxina T-2, HT-2, ocratoxina A, citrinina, aflatoxina B ₁
Cebada	<i>P. verrucosum</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. alternata</i> , <i>P. aurantiogriseum</i> , <i>F. graminearum</i>	Alternariol, ocratoxina A, citrinina, esterigmatocistina, desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, aflatoxina B ₁
Centeno	<i>F. proliferatum</i>	Desoxinivalenol, nivalenol, zearalenona
Maíz	<i>A. flavus</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. níger</i> , <i>A. clavatus</i> , <i>F. subglutinis</i> , <i>A. alternata</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>Penicillium</i> spp.	Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , desoxinivalenol, toxina T-2 ácido ciclopiazónico, zearalenona, fumonisinias B ₁ , B ₂ , B ₃ , y C, alternariol
Sorgo	<i>A. flavus</i> , <i>A. alternata</i> , <i>F. miniliforme</i> , <i>P. funiculosum</i> , <i>F. chamydosporum</i> , <i>F. semitectum</i> , <i>F. subglutinis</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>A. niger</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. verticilloides</i>	Aflatoxinas, desoxinivalenol, zearalenona, fumonisinias, T-2
Trigo	<i>F. acuminatum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. oxisporum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>A. alternata</i> .	Alternariol, zearalenona, desoxinivalenol, T-2,

Fuente: Carrillo, 2003

2.3.4.1. Presencia de hongos toxigénicos en cebada

La cebada corresponde a la especie *Hordeum vulgare* L., que a su vez consta de dos subespecies, que no son silvestres, a saber: *H. vulgare* y *H. distichum*. Todas son plantas herbáceas, anuales y hermafroditas de fecundación autógama, es un cultivo de clima templado, y crece mejor en climas frescos y moderadamente secos, tolera las altas y bajas temperaturas en clima seco o la elevada humedad en clima fresco (Molina, 1989).

La cebada ocupa el cuarto lugar en importancia entre los cereales, después del trigo, maíz y el arroz. En las últimas décadas, el área cultivada de cebada en el mundo se ha incrementado más rápidamente que la del trigo y el arroz (López, 1991). En nuestro país el cultivo de la cebada maltera se extiende en las zonas templadas de los Estados de Guanajuato, Sonora, Chihuahua, Querétaro, Michoacán y Nuevo León, sin embargo, la principal área productora de cebada maltera de temporal está ubicada en el altiplano central, el cual abarca varias regiones conocidas como Valles Altos (2000 a 2850 metros sobre el nivel del mar), entre los Estados de Hidalgo, México, Puebla y Tlaxcala. En el Estado de Hidalgo esta región comprende las llanuras de Apan y los valles y laderas de Tepeyahualco, limitándose al norte de las planicies y laderas de Tizayuca y Pachuca, hasta Tulancingo (Olmos, 1998).

La participación del Estado de Hidalgo a nivel nacional como productor de cebada de grano de temporal, es de un 43%, ocupando el primer lugar en producción (566 359 toneladas), seguido por los Estados de Tlaxcala y de México, beneficiándose un total de 22 922 productores de la entidad (CEIEGDRUS, 2004; SAGARPA, 2004).

La espiga de la cebada es cilíndrica, terminal. Mide de 7.5 a 19 centímetros de longitud, con o sin barbas. Está conformada por granos ubicados en forma alterna, los cuales están adheridos al eje de la espiga llamado raquis. En México se cultivan variedades de cebada maltera de seis y dos hileras, en la variedad de seis hileras se observan tres hileras de grano en cada lado del raquis. Vista desde arriba parecen seis hileras alrededor del raquis y por eso se conoce como cebada de seis hileras. En las variedades de dos hileras solamente la flor central es fértil, sólo ahí se forma el grano. La estructura del grano de cebada es similar a la de los otros granos de

cereal en términos generales, sin embargo destaca por su menor contenido de grasa, alto nivel de fibra e intermedio de almidón (Molina, 1989; Olmos, 1998).

Este cereal es empleado, a nivel mundial, principalmente como materia prima en la elaboración de cerveza y también como componente de raciones para animales domésticos. El análisis del aspecto visual de los granos de cebada es importante, ya que se considera que los daños visibles tienen una asociación estrecha con la micoflora, razón por la cual, los granos que están visiblemente contaminados por hongos son menos preferidos por las casas malteras, pues existe la posibilidad de que contengan grandes cantidades de microorganismos (Young & Loughman, 2001). La contaminación de los granos de cebada maltera con hongos filamentosos, causa modificaciones importantes en la calidad de la malta resultante, además de que las micotoxinas que pudieran llegar a formar, pueden resistir el proceso completo de fabricación de cerveza alterando las características fisicoquímicas y organolépticas del producto final (Chu *et al.*, 1975). Por ejemplo, a la contaminación de los granos de cebada y de malta con algunas especies de géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, y *Nigrospora* se le ha relacionado con el fenómeno de gushing en la cerveza, el cual, es definido como un espontáneo, rápido e incontrolado vaciamiento de la cerveza, en un chorro espumoso y continuo, inmediatamente después de haber abierto la botella o lata (Ghelfa, 1996; Lowe & Arendt, 2004). Por otra parte, los granos de cebada que no se utilizan para elaborar malta, por lo regular son sometidos a las peores condiciones de almacenamiento y se destinan al consumo animal, así, los niveles de micotoxinas son más altos en las distintas especies animales de abasto (Martínez, 2003).

En los últimos años, en el Estado de Hidalgo se han realizado investigaciones acerca de la contaminación fúngica de los granos de cebada, en regiones pertenecientes a los Valles Altos (De la Cruz, 2002; Marchand, 2003; Romero, 2004), sin embargo, estos estudios han estado dirigidos principalmente al reporte de la incidencia y propagación de enfermedades foliares de las plantas de la cebada. Las regiones analizadas en estos estudios, muestran características climáticas propias de los Valles Altos, no obstante, el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP, 1997) reporta que llegan a diferir en la cantidad de lluvia y distribución en el año, textura y profundidad del suelo, razón por la cual pueden encontrarse diferentes ambientes de producción.

2.3.5. PRINCIPALES MICOTOXINAS EN CEREALES

2.3.5.1. Aflatoxinas

En la década de los años 60, tuvo lugar en Inglaterra el brote de la enfermedad X de los pavos, que causó la muerte a unos 100 000 pavos y a otros animales de granja. La causa de esta enfermedad se atribuyó a un componente del pienso, la harina de cacahuete que estaba muy contaminada por *Aspergillus flavus*. El análisis posterior del pienso contaminado demostró que un grupo de sustancias fluorescentes reconocidas como micotoxinas y denominadas posteriormente aflatoxinas eran las responsables de esta enfermedad (Jaimez, 2001).

Ahora sabemos que las aflatoxinas son producidas por dos especies de mohos del género *Aspergillus*, con dos variedades, *A. flavus* y *A. parasiticus*, los cuales son especialmente comunes en los trópicos y subtrópicos. En estudios recientes se ha reportado que especies como, *A. nomius*, *A. tamarii* y *A. oryzae* pueden ser aflatoxigénicas, aunque en últimas investigaciones los reportes de la producción de aflatoxinas por otras especies, pueden ser el resultado de errores o confusiones (Abarca *et al.*, 2000; Adams & Moss, 2000).

Las aflatoxinas son un grupo de compuestos con una relación cercana y con pequeñas diferencias en cuanto a su composición química. La aflatoxina B₁ es la forma que más prevalece en la naturaleza (Cullen & Newberne, 1993). Las aflatoxinas fueron nombradas en base a su fluorescencia azul (blue) o verde (green) bajo luz ultravioleta, de ahí que se distinguen principalmente dos tipos de aflatoxinas, B y G, y el número se otorga en base a su relativa movilidad en cromatografía de capa fina (TLC). Los metabolitos de las aflatoxinas B₁ y B₂ (aflatoxinas M₁ y M₂) pueden ser encontrados en leche o productos derivados. Esta presencia puede originarse de la contaminación del ganado debida al consumo de productos conteniendo micotoxinas (Prado *et al.*, 2002; Muro-Cacho *et al.*, 2004).

Estructura

Estos compuestos estrechamente relacionados son cumarinas altamente substituidas, y la presencia de la configuración furocumarina las coloca entre un gran grupo de compuestos

naturales con muchas actividades farmacológicas (fig. 6). Poseen también una estructura bifurano, la cual se ha visto que también se encuentra presente en la esterigmatocistina, metabolito de *Aspergillus versicolor*. La importancia de estas configuraciones estructurales es determinante en la actividad biológica mostrada por las aflatoxinas (Wogan, 1966).

Efectos tóxicos

El principal órgano diana de los efectos de las aflatoxinas es el hígado. Una evaluación realizada por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) determinó que existen suficientes pruebas del efecto carcinogénico de mezclas naturales de aflatoxinas en el ser humano, las cuales las clasifican como carcinógenos del Grupo 1. También se les considera inmunosupresoras, mutagénicas y teratogénicas (IARC, 1987; IARC, 1993; Henry *et al.*, 1999).

Aflatoxicosis

La aflatoxicosis es el envenenamiento que resulta de la ingestión de aflatoxinas, dos formas de aflatoxicosis han sido identificadas: la primera es una intoxicación aguda severa, causando un daño directo al hígado seguido de un malestar general o la muerte y la segunda es una intoxicación causada por una exposición crónica casi asintomática. Una revisión de la literatura ha proveído evidencia clara de que la dosis y el tiempo de exposición a las aflatoxinas tiene un mayor efecto en la toxicología y puede desencadenar ciertas consecuencias: 1) grandes dosis causan enfermedad aguda y la muerte, comúnmente por conducto de cirrosis hepática; 2) dosis crónicas subletales tienen consecuencias inmunológicas y nutricionales; y 3) Cualquier dosis tiene un efecto acumulativo aumentando el riesgo de padecer cáncer (Williams *et al.*, 2004). Todas las especies animales que consumen o han consumido dosis subletales de aflatoxinas por varios días (e incluso semanas) desarrollan un síndrome subagudo de toxicidad el cual comúnmente incluye signos patológicos de daño hepático, de moderado a severo (Wogan, 1966).

La aflatoxina B₁ ha sido designada como la aflatoxina más tóxica sobre las demás, pues tiene mayor capacidad de carcinogénesis que las otras aflatoxinas (Cullen & Newberne, 1993). Estudios epidemiológicos realizados en Asia y África han asociado la incidencia de cáncer

primario del hígado con el consumo de alimentos contaminados con aflatoxinas (Álvarez *et al.*, 2000).

Medidas sanitarias

Los niveles establecidos inicialmente por la Food and Agricultural Organization (FAO) y la World Health Organization (WHO) fueron fijados en 30 µg/Kg en alimentos destinados para consumo humano (Adams y Moss, 2000). Actualmente muchos países son más estrictos en cuanto a la legislación del contenido de aflatoxinas que deben presentar ciertos productos. Por ejemplo, la Comunidad Económica Europea tiene su reglamentación para el contenido de aflatoxinas en cereales, con excepción del maíz, que es de 2 µg/Kg para la aflatoxina B₁ y 4 µg/Kg para la suma de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ y para nueces y frutas secas de 5 µg/Kg y 10 µg/Kg, también en ese mismo orden, para aflatoxina M₁ presente en leche y sus productos derivados el contenido no debe rebasar los 0.05 µg/Kg (The Commission of the European Communities, 1998; 2002).

La FDA marca un estándar para aflatoxinas de 20 ppb para humanos en maíz y otros granos, aunque a nivel de la iniciativa privada se exigen estándares de 10 ppb o menos para granos, especialmente para el maíz (Dohlman, 2003).

2.3.5.2. Fumonisinias

Las fumonisinias son un grupo de metabolitos tóxicos producidos principalmente por *Fusarium moniliforme*, también se ha reportado que *F. proliferatum* puede producirlas. La fumonisinina B₁ es la que se encuentra con mayor frecuencia y además es la más extensamente estudiada, la producción de esta sustancia generalmente se da en el campo, pero un inadecuado almacenamiento puede contribuir también a su formación (Chu, 2002).

Las fumonisinias pueden ser encontradas esencialmente en granos de maíz, y productos derivados, y otros granos como sorgo y arroz. Los principales efectos nocivos que pueden causar son neurotóxicos, nefrotóxicos, hepatotóxicos, edema pulmonar y cerebral, lesiones cardiacas y cáncer de esófago, se ha demostrado en experimentos con animales que estos

compuestos tienen potencial cancerígeno (Chu, 2002; Gimeno y Martins, 2003, Muro-Cacho *et al.*, 2004).

La FDA recomienda niveles máximos de contaminación por fumonisinas (FB₁, FB₂, FB₃) de 2000 µg/Kg para granos de maíz desgerminados y 4000 µg /Kg para productos derivados de granos de maíz parcialmente desgerminados. En Suiza la concentración máxima admisible que fue propuesta para fumonisinas (FB₁, FB₂) fue de 1000 µg/Kg para productos de maíz (Gimeno y Martins, 2003).

2.3.5.3. Ocratoxina A

Son un grupo de toxinas producidas por algunas especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, de los cuales, la ocratoxina A se ha señalado como la más tóxica.

En 1965 se reportó que la ocratoxina A era un metabolito producido por *Aspergillus ochraceus* y reportes más recientes señalan que también es producida por *Penicillium verrucosum* y *P. nordicum*, contaminantes comunes de la cebada (Chu, 2002; Bennett & Klich, 2003).

El riñón es el órgano blanco al cual las ocratoxinas atacan. Estos metabolitos son nefrotóxicos para todos los animales, otros estudios han señalado que las ocratoxinas también son compuestos hepatotóxicos y supresores del sistema inmune y la ocratoxina A, ha sido señalada por la IARC como posible carcinógeno para los humanos (categoría 2B) [IARC, 1993]. La ocratoxina A ha sido encontrada en cebada, trigo, avena, granos de café y otros productos vegetales, sin embargo, en la cebada hay contaminaciones particularmente altas (Peraica *et al.*, 1999; Bennett & Klich, 2003).

En Europa, han sido considerados límites para la ocratoxina A de 5 ng/g para cereales utilizados como materia prima y de 3 ng/g para productos terminados (Truckess & Maragos, 2001).

2.3.5.4. Tricotecenos

Los tricotecenos (TCTCs) son un grupo de compuestos producidos por muchos géneros fúngicos, pero es principalmente producido por el género *Fusarium*. El más frecuente de encontrar como contaminante en los alimentos es el desoxinivalenol (DON), conocido también como vomitoxina, seguido del nivalenol (NIV) y el diacetoxiscirpenol (DAS) mientras que la toxina T-2 es menos común, aunque es el compuesto más tóxico de este grupo de toxinas (Peraica *et al.*, 1999).

A diferencia de la aflatoxina B₁ y la ocratoxina A, donde los efectos primarios y las manifestaciones clínicas están bien definidos para el hígado y riñón, los tricotecenos afectan diferentes órganos, incluyendo el tracto gastrointestinal, el sistema hematopoyético, sistema nervioso, sistema inmune y el sistema cardiovascular (Chu, 2002).

El desoxinivalenol es producido por *F. graminearum* y otras especies relacionadas tales como *F. culmorum* y *F. crookwellense*. Es común encontrar este contaminante en granos de maíz, trigo, cebada, avena, sorgo y centeno. El desoxinivalenol induce anorexia y vómitos en humanos y animales y se ha encontrado que puede fomentar el desarrollo de la lesión inicial causada por la aflatoxina B₁ (Chu, 2002; Gimeno y Martins, 2003). La toxina T-2, es producida por las especies de *F. sporotrichoides*, *F. poae*, *F. tricinctum*, *F. acuminatum*, se encuentra como contaminante, aunque no tan frecuente, en granos de cereales como cebada, maíz, avena y trigo. Puede causar hemorragia, edema y necrosis en tejidos epidérmicos. Son comunes las reacciones de inflamación en tejidos epiteliales cerca de la nariz y boca (Peraica *et al.*, 1999; Chu, 2002; Muro-Cacho *et al.*, 2004).

Actualmente la Comunidad Económico Europea no tiene legislación para DON, aunque en Holanda en 1999, se propusieron límites de concentración máxima para esta micotoxina de 120 µg /Kg para trigo limpio y 60 µg/Kg para pan y en Rusia e Israel se han establecido límites para la toxina T-2 de 100 mg/Kg en cereales y harinas (Gimeno y Martins, 2003).

2.3.5.5. Zearalenona

Las zearalenonas son biosintetizadas por especies pertenecientes al género *Fusarium*, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, y *F. crookwellense*. Todas estas especies son contaminantes de los cultivos de cereales a nivel mundial, sobre todo en trigo y maíz, pero también en el sorgo, cebada y piensos compuestos. La zearalenona y sus derivados tienen efectos estrogénicos en varias especies animales (infertilidad, edema vulvar, prolapso vaginal e hipertrofia mamaria en hembras, así como feminización de los machos) [Peraica *et al.*, 1999; Bennett & Klich, 2003].



Objetivos



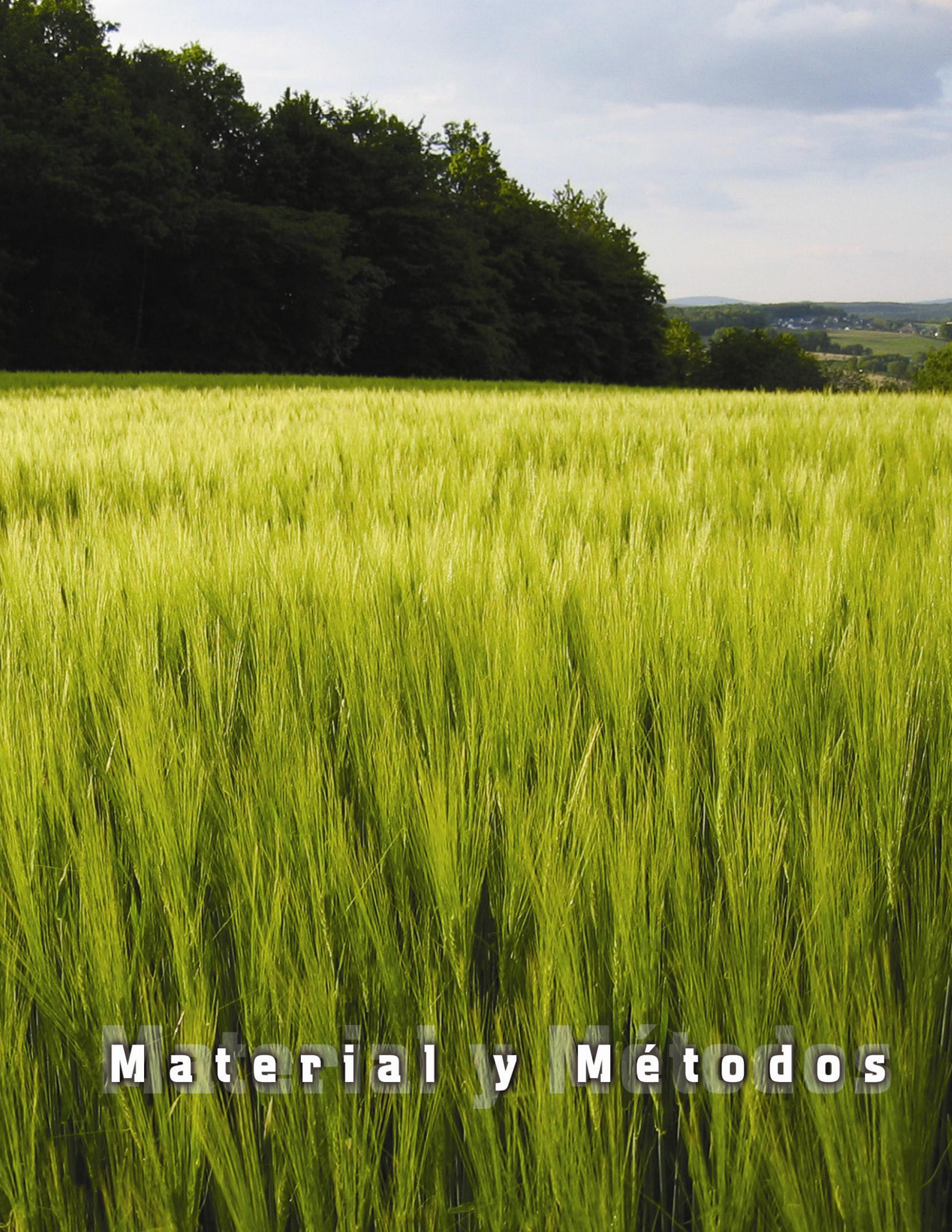
3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la composición de la microflora colonizadora de granos de cebada cultivada en el Municipio de Tlanalapa, en el Estado de Hidalgo, así como el contenido de aflatoxinas presentes.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Identificar los géneros fúngicos que componen la microflora de los granos de cebada
- ◆ Aislar e identificar cepas pertenecientes a especies fúngicas potencialmente toxigénicas
- ◆ Probar la capacidad aflatoxigénica de las cepas de *Aspergillus* spp. aisladas
- ◆ Determinar y cuantificar la posible presencia de aflatoxinas
- ◆ Conocer la evolución de la microflora presente en la cebada, en diferentes etapas: precosecha, cosecha y almacenamiento.



Material y Métodos



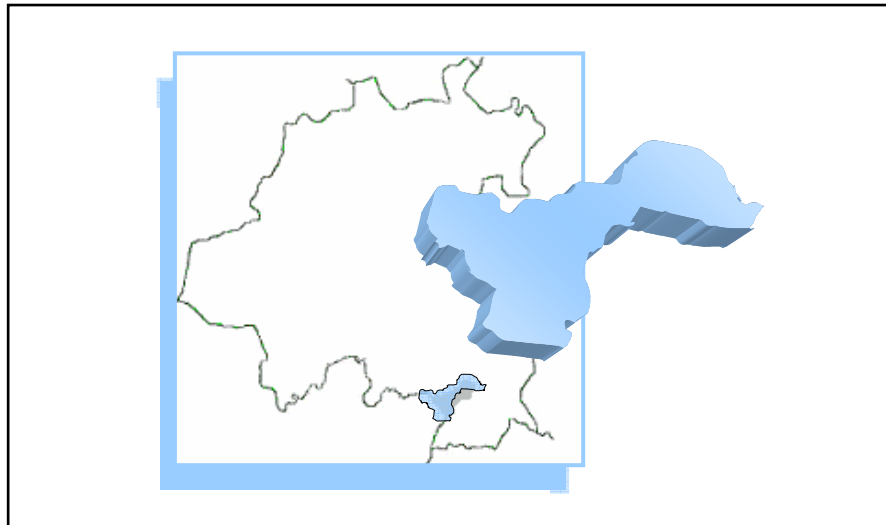
4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. ZONA DE ESTUDIO

4.1.1. LOCALIZACIÓN

El Municipio de Tlanalapa se encuentra al sur del Estado de Hidalgo (fig. 6) y se ubica geográficamente entre los paralelos 19° 49´ de latitud norte y 98° 36´ de latitud oeste, a una altitud de 2,460 metros sobre el nivel del mar.

Figura 6. Localización del Municipio de Tlanalapa



4.1.2. LÍMITES

Tiene una superficie total de 156.70 Kilómetros cuadrados, colinda al norte con Singuilucan y Zempoala, al sur con el Estado de México y Tepeapulco, al este con Tepeapulco y al oeste con Zempoala y el Estado de México.

4.1.3. CLIMA

El clima del Municipio es templado-subhúmedo y semiseco-templado con lluvias en verano. La precipitación se distribuye en periodos más o menos definidos, el temporal o periodo de lluvias es de abril a septiembre, con una precipitación anual de 468.36 milímetros por año, con una máxima incidencia en septiembre y una mínima en diciembre. El periodo de sequía se registra de enero a marzo y de noviembre a diciembre. La temperatura media anual es de 14.1 °C, la máxima es en mayo con 21.2 °C y la mínima en diciembre con 8.3 °C. (INEGI, 2005). Las heladas tienden a presentarse a finales de septiembre o principios de octubre, aumentando en número e intensidad en los meses posteriores (INIFAP, 1997).

4.2. MUESTRAS ANALIZADAS

Se analizaron un total de 40 muestras de granos de cebada (*Hordeum vulgare* L.) variedad Esmeralda, obtenidas de diez productores de la zona de estudio. Las muestras de granos analizadas correspondían a la cosecha 2004-2005. La recolección de las muestras se llevó a cabo de forma aleatoria. En cada muestreo, de cada productor se recolectaron cinco muestras de aproximadamente 200 g cada una, que se mezclaron para obtener una sola muestra de aproximadamente 1kg de donde se tomaron los gramos necesarios para llevar a cabo el análisis. Todas las muestras recolectadas se guardaron inmediatamente en bolsas de polietileno, se identificaron y se mantuvieron en refrigeración hasta su estudio.

Las muestras se recolectaron en cuatro periodos distintos de recolección:

- ◆ Un mes previo a la cosecha. En el campo, se recolectaron las plantas de cebada con todo y espiga, y se procedió a separar los granos de las espigas en el laboratorio
- ◆ En el momento de la cosecha. La recolección se efectuó directamente de la máquina trilladora
- ◆ Después de tres meses de almacenamiento
- ◆ Después de cinco meses de almacenamiento

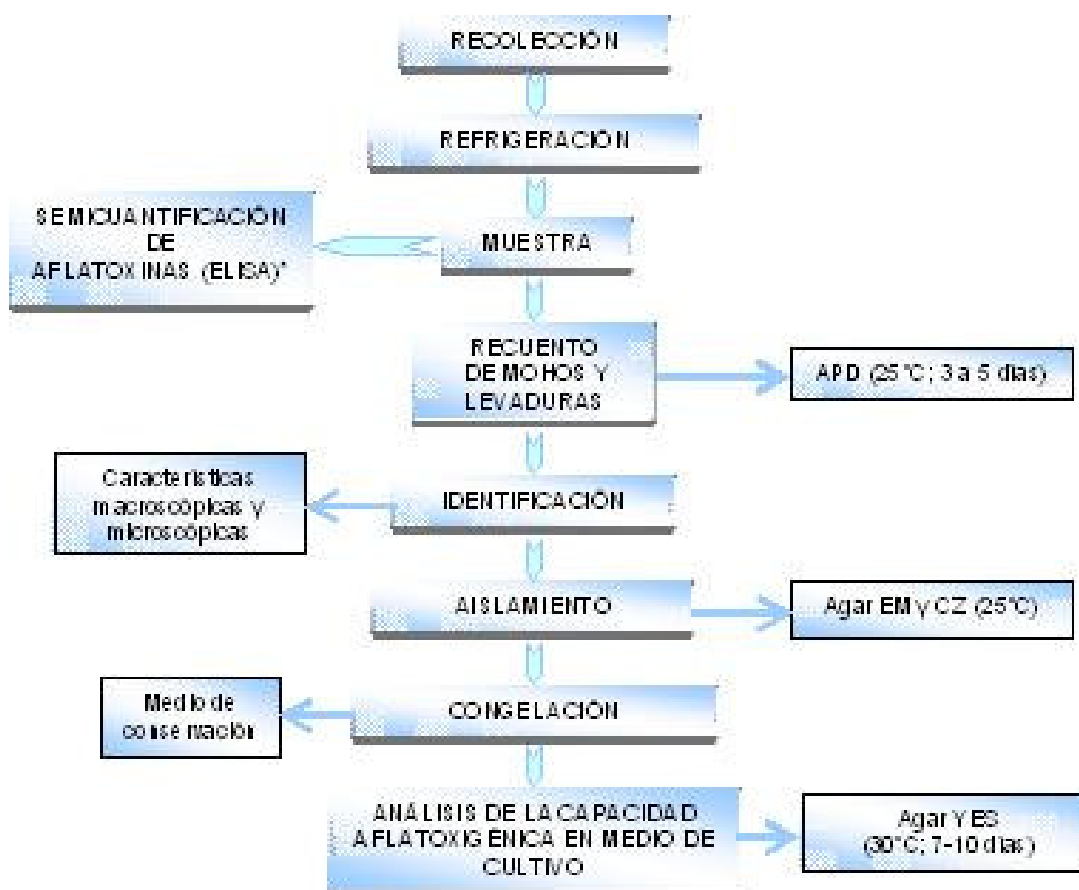
El almacenamiento se llevó a cabo bajo las condiciones habituales de cada uno de los productores. En general, cada una de las bodegas (de aproximadamente 5 x 3 m²) en donde fueron almacenados los granos de cebada, estaba construida a base de block y techada con loza sin aplanado. Ninguna de las bodegas de almacenamiento contaba con algún sistema de control de temperatura y humedad.

Todos los productores almacenaron los granos en sacos (el llenado de los mismos se realizó de forma manual con palas de metal), y estos fueron apilados sobre tarimas de madera (30 a 40 centímetros de altura).

4.3. MÉTODOS

En la figura 7 se presenta el diagrama de la metodología utilizada a lo largo del estudio.

Figura 7. Diagrama de la metodología utilizada para el estudio de las muestras de cebada



El análisis sólo se realizó a las muestras recolectadas antes de la cosecha y a las muestras obtenidas durante la misma

4.3.1. RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS

Previo al recuento de mohos y levaduras se realizó el análisis del crecimiento fúngico aparente en los granos de cebada, esto se efectuó mediante una inspección visual. La cantidad de granos con señales de decoloración, escoriaciones y manchas se reportó como porcentaje de crecimiento fúngico aparente.

El conteo de mohos y levaduras se expresa como el número de unidades aerobias y mesófilas formadoras de colonias, que se hacen visibles cuando una alícuota de la suspensión de un producto examinado, ha sido transferida a un medio nutritivo para hongos e incubada aeróbicamente a 25°C por cinco días (ICC, 1980).

La metodología de elección para establecer la calidad de los granos de cereales, es el recuento directo en placa o el recuento por dilución, sin esterilización superficial realizada sobre el grano (ICMSF, 2001).

Para llevar a cabo el análisis, se pesaron 10 gramos de cada muestra de granos de cebada, a continuación, cada muestra fue diluida en la proporción 1:10 en solución salina con Tween 80 y homogenizada en el Stomacher[®] durante aproximadamente 2 minutos. Esta dilución se consideró la primera dilución decimal, a partir de la cual se efectuaron 4 diluciones sucesivas, utilizando el mismo diluyente. Se sembró 0.1 mL de cada una de las diluciones de cada muestra, por duplicado, en el medio de cultivo APD (Medio de cultivo recomendado en la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994; Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos), mediante la técnica de siembra en superficie. Todas las placas sembradas fueron incubadas durante 5-7 días a 25°C. Trascurrido este tiempo, se procedió al recuento de todas las colonias de hongos y levaduras crecidas.

Las placas utilizadas para llevar a cabo el recuento fueron aquellas que contenían entre 10 y 300 colonias. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g).

4.3.2. IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS FÚNGICAS

La identificación de las colonias fúngicas sólo se llevó a cabo a nivel de género, basados en sus características macroscópicas y microscópicas.

El estudio macroscópico se llevó a cabo a simple vista, observando la morfología y la forma de crecimiento de las colonias sobre la superficie del medio. Inmediatamente, se procedió a realizar el estudio microscópico. La preparación de la muestra se efectuó según la técnica de la cinta adhesiva (Rodríguez-Tudela & Aviles, 1991), la cual consiste en aplicar una porción de cinta adhesiva transparente sobre la superficie de la colonia y pegarla posteriormente, por presión, sobre un portaobjetos en el que previamente se ha colocado una gota de azul de metileno.

Las colonias de hongos que no se podían identificar a causa de la ausencia de cuerpos fructíferos, se sembraron en medio Agar EM y CZ y se incubaron a la misma temperatura, tratando de promover el desarrollo de los mismos. Las colonias que no desarrollaron cuerpos fructíferos después de 7 días de incubación bajo estas condiciones, se denominaron como *Mycelia sterilia*.

Para la identificación y clasificación de los hongos, se utilizaron los criterios establecidos por el tratado de Von Arx (1981) y el manual de Samson *et al.* (2000).

4.3.2.1. Criterios de identificación

Tras siete días de incubación se procedió a la observación de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los cultivos.

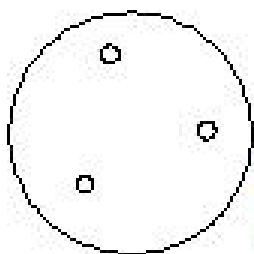
Para las características macroscópicas se tomó en cuenta parámetros como: coloración del anverso y reverso de las colonias, textura de las colonias, presencia de pigmento difundido.

Los principales parámetros microscópicos que se tomó en cuenta fueron: forma de los cuerpos fructíferos, forma, disposición y ornamentación de las esporas, forma y tamaño de las ascosporas (si las hay).

4.3.3. AISLAMIENTO DE COLONIAS FÚNGICAS POTENCIALMENTE MICOTOXIGÉNICAS

Paralelamente al recuento, se realizó el aislamiento e identificación de aquellas colonias que, a simple vista o mediante su observación al microscopio se consideraron pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Estas cepas se aislaron en los medios agar EM y CZ. Mediante un asa de platino se depositó un inóculo de esporas en tres sitios distintos (formando un triángulo equilátero [fig. 8]) de la placa de petri con 30 mL del medio de cultivo y se incubó a 25°C, durante el tiempo requerido para el desarrollo óptimo de la colonia fúngica. Se realizaron las resiembras necesarias hasta obtener cultivos puros. Cada cepa se aisló por duplicado.

Figura 8. Depósito del inóculo de esporas sobre la superficie del medio



4.3.4. CONGELACIÓN DE LAS CEPAS

Las cepas de géneros micotoxigénicos fueron conservadas por congelación, con la finalidad de establecer un banco de cepas, para ello se suspendió un trozo de micelio en un medio congelante estéril (ver anexo), a partir de un cultivo de siete días en agar EM. Se utilizaron viales de conservación (Eppendorf de 1 mL de capacidad) de plástico y por duplicado, los cuales fueron congelados a -10°C. El trozo de micelio se obtuvo cortando alrededor de 1 cm² de la superficie del agar donde se encontraba localizada la colonia fúngica ya aislada.

4.3.5. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA EN MEDIO DE CULTIVO

Todas las cepas de *Aspergillus* aisladas de las muestras de cebada, se sometieron a un análisis para determinar su capacidad para producir aflatoxinas en medio de cultivo para lo cual se sembraron en agar YES y se incubaron a 30°C de 7 a 10 días. Posteriormente las cajas petri que contenían las colonias de *Aspergillus* ya desarrolladas, fueron colocadas bajo una lámpara de radiación UV a 365 nm en completa oscuridad. Las colonias que presentaran un halo fluorescente de color azul o verde-amarillo a su alrededor se considerarían como aflatoxigénicas.

El medio YES es fácil de preparar, relativamente barato, y es adecuado para la producción de altos niveles de aflatoxinas, por estas razones, se puede hacer un análisis de las cepas de *Aspergillus* spp. potencialmente micotoxigénicas para examinar su habilidad para la producción de aflatoxinas utilizando este medio (Davis *et al.*, 1966).

4.3.6. EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE AFLATOXINAS TOTALES

Las muestras de cebada fueron analizadas por el método ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), para determinar la presencia de aflatoxinas totales.

4.3.6.1. Fundamento de la técnica

El test se basa en una reacción antígeno-anticuerpo. Los micropozos están recubiertos con anticuerpos de captura contra anticuerpos anti-aflatoxina. Se agregan estándares de aflatoxina o la solución de las muestras, conjugado aflatoxina-enzima y anticuerpos anti-aflatoxina a los micropozos. La aflatoxina libre y el conjugado aflatoxina-enzima compiten para unirse a sitios del anticuerpo anti-aflatoxina (inmuno-ensayo enzimático competitivo). Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-aflatoxina se unen a los anticuerpos de captura inmovilizados sobre la placa. El conjugado aflatoxina-enzima que no se unió es removido posteriormente en un proceso de lavado. El substrato / cromógeno es agregado a los

micropozos e incubado. El conjugado aflatoxina-enzima unido a los micropozos a través de los anticuerpos, convierte al cromógeno en una sustancia azul. La adición de la solución stop provoca un cambio de color de azul a amarillo. La medición se realiza fotométricamente a 450 nm; la absorción es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxinas en la muestra.

4.3.6.2. Preparación de las muestras

La extracción y determinación de las aflatoxinas se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en el kit comercial utilizado (ver anexo 3).

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el paquete SPSS versión 12.0 para Windows. Los procedimientos empleados se indican a continuación.

4.4.1. ANÁLISIS DE VARIANZA

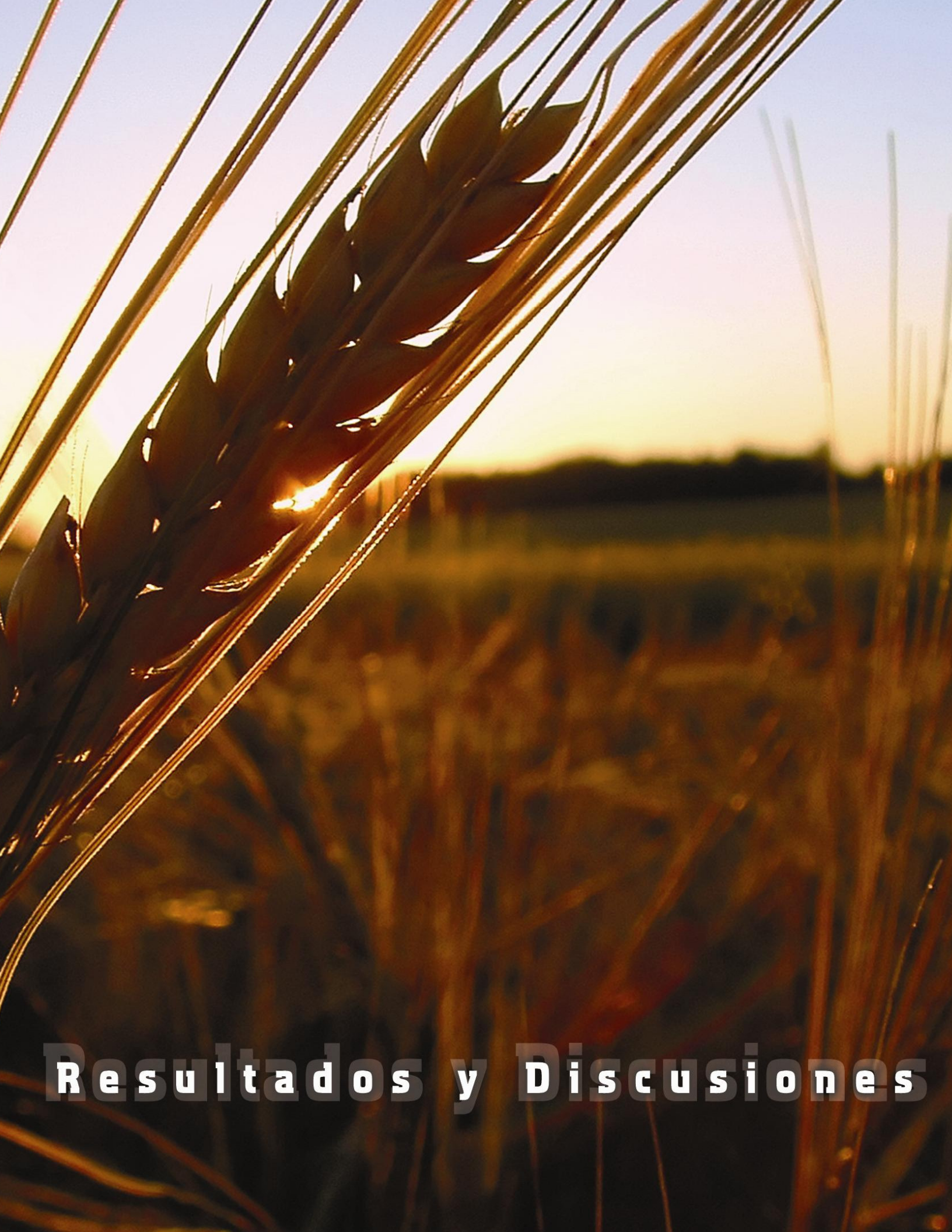
Se realizó un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA de una vía), con los datos que presentan homogeneidad de varianzas, comparando los resultados obtenidos del recuento total de mohos y levaduras, recuento de levaduras y el recuento de mohos, en cada una de las etapas de recolección.

Variables:

Variable dependiente: datos obtenidos de los recuentos, la población de levaduras y mohos, expresados en UFC/g de muestra.

Factor: cada una de las etapas de recolección de muestras.

Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, para conocer si existían diferencias significativas entre las medias de todos los tratamientos realizados.



Resultados y Discusiones



5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. RECUENTO TOTAL DE MOHOS Y LEVADURAS

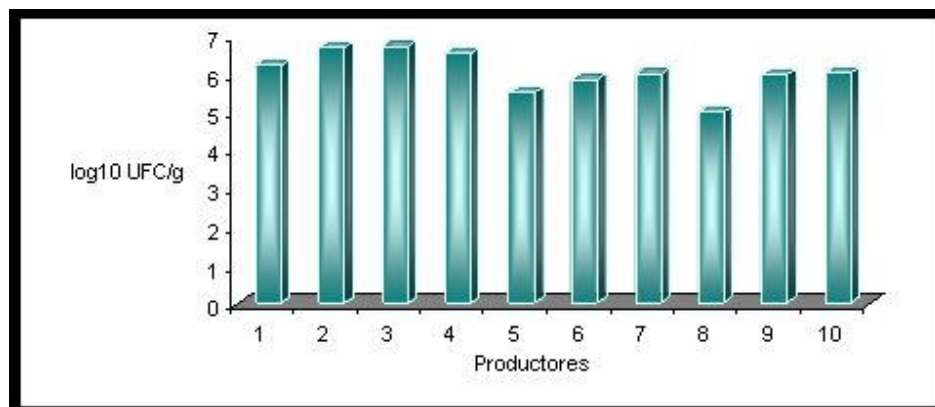
El recuento total de mohos y levaduras es un buen indicador del control de calidad de piensos y materias primas. Un número considerablemente más alto de mohos y levaduras, que los estándares establecidos es un signo de deterioro en la calidad del grano (Löiveke, 2004^b).

5.1.1. MUESTRAS RECOLECTADAS UN MES PREVIO A LA COSECHA (PC)

El 60% de las muestras PC presentaba crecimiento fúngico aparente. El porcentaje de granos enmohecidos en estas muestras se encontró entre el 5-20%. La separación de los granos de la espiga se realizó minuciosamente y de forma manual en el laboratorio, por lo que estas muestras no presentaron material extraño contaminante.

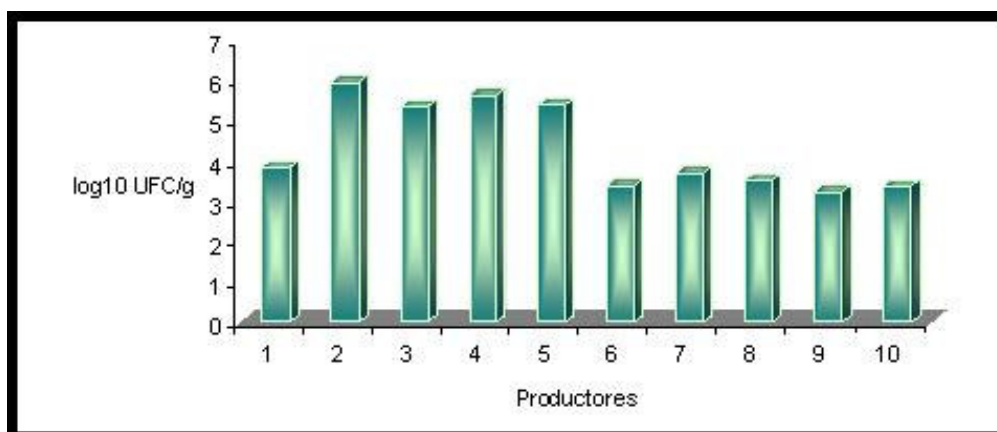
En esta etapa de recolección los recuentos totales se encontraron en valores de 10⁵ a 10⁶ UFC/g (fig. 9). La muestra perteneciente al productor 3 fue la que presentó los recuentos totales de mohos y levaduras más elevados (5.7×10^6 UFC/g) y al contrario de ésta, los recuentos totales de la muestra del productor 8 fueron más los bajos (1.1×10^5 UFC/g).

Figura 9. Recuento de mohos y levaduras en las muestras PC



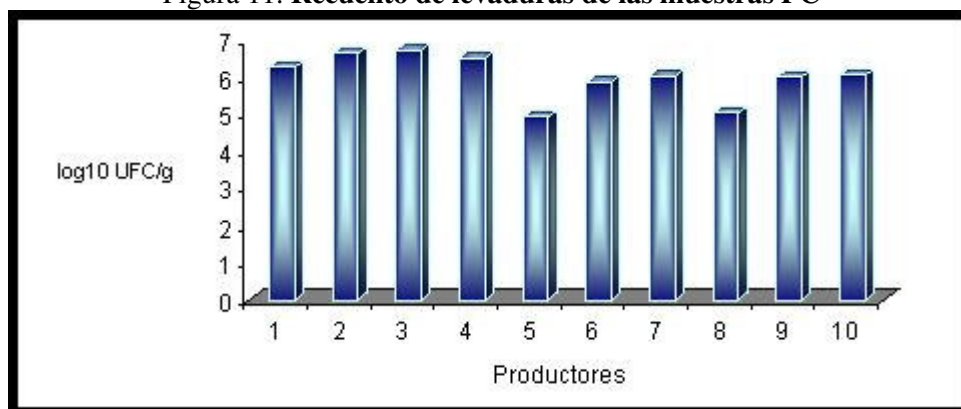
Los recuentos de mohos se hallaron en niveles de 10^3 a 10^5 UFC/g (fig. 10). La muestra perteneciente al productor 2 fue en la que se observó una mayor contaminación con mohos (8.3×10^5 UFC/g) y en contraste con ésta, la muestra que pertenecía al productor 9 (1.7×10^3 UFC/g) resultó ser la que tuvo el recuento de mohos más bajo.

Figura 10. Recuento de mohos de las muestras PC



Los recuentos de levaduras en las muestras PC se registraron con límites de 10^4 a 10^6 UFC/g (fig. 11). La muestra perteneciente al productor 3 fue la que tuvo el recuento de levaduras más alto (5.5×10^6 UFC/g) y al contrario de ésta, la muestra obtenida del productor 5 (8.4×10^4 UFC/g) presentó el recuento de levaduras más bajo.

Figura 11. Recuento de levaduras de las muestras PC



Los reportes sobre recuentos totales en granos de cebada antes de la cosecha son escasos, sin embargo, nuestros resultados se muestran más altos que los obtenidos [10^4 UFC/g] por Follstad & Christensen (1962), en granos de cebada antes de ser cosechados, aunque

concuerdan con los resultados reportados por otros autores (10^5 UFC/g), obtenidos de mezclas de maíz y trigo utilizadas como forraje (Bauduret, 1980; Saubois & Nepote 1994; Martínez, 2003).

Los recuentos de mohos de los productores 2, 3, 4, y 5 fueron considerablemente mayores a los reportados por Follstad & Christensen (1962), quienes encontraron niveles de contaminación por mohos de 10^3 UFC/g, sin embargo, el resto de las muestras presentaron resultados similares.

Numerosos reportes han revelado que la zona de cultivo, los factores climáticos y las prácticas agrícolas son los responsables de un aumento en la actividad de ciertos organismos fúngicos (Rabie & Lübben, 1993; ICMSF, 2001; Young & Loughman, 2001; Akar *et al.*, 2003), esto indica que durante el tiempo que permanecieron los granos analizados en el campo, se pudieron haber presentado las condiciones adecuadas para el desarrollo y crecimiento elevado de mohos y levaduras.

En lo que respecta a las prácticas agrícolas, un factor que puede llegar a contribuir con la población de mohos es el sistema de monocultivo de la cebada, ya que se considera que puede aumentar la presencia de enfermedades en las plantas y por tanto, la presencia de hongos en los granos; por último, el volumen de siembra por hectárea es otro factor más a considerar, puesto que un volumen de semillas por hectárea demasiado alto, puede favorecer la formación de microclimas dentro del área de cultivo que pueden servir como reservorios de organismos fúngicos (Follstad & Christensen, 1962; López, 1991; Young & Loughman, 2001; INIFAP, 2004).

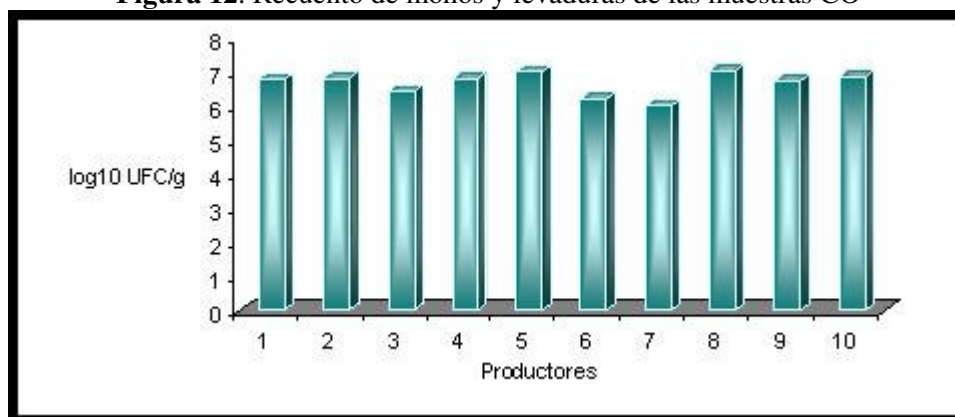
Puesto que las condiciones climáticas a las que estuvieron sometidos los cultivos, fueron las mismas, todo parece indicar que las diferencias observadas en los recuentos totales, de mohos y de levaduras, entre los productores, pudieron deberse a situaciones de índole cultural (por ejemplo, prácticas agrícolas efectuadas por cada uno de los productores) ya que se ha reportado que si al momento de realizar la preparación del suelo para los cultivos, se mantiene suficiente material orgánico sobre la superficie, los hongos serán responsables de la mayoría de los procesos de descomposición y la actividad microbiana ocurrirá cerca de la superficie (De la Cruz, 2002).

5.1.2. MUESTRAS RECOLECTADAS EN LA ETAPA DE COSECHA (CO)

El 100% de las muestras CO mostraba crecimiento fúngico aparente. La mayoría de las muestras presentaron el 50% de sus granos enmohecidos, con excepción de las muestras provenientes de los productores 8 y 9, que tuvieron un menor porcentaje de granos afectados (40 y 30 %, respectivamente). Estas muestras presentaron una cantidad de polvo considerable y contenían restos vegetales secos, fragmentos de tallos y hojas.

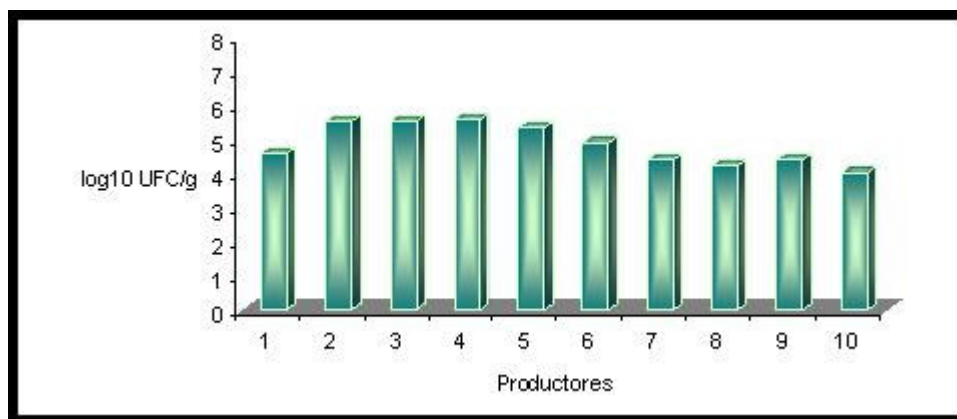
Los recuentos totales en las muestras CO, presentaron cantidades de 10^6 a 10^7 UFC/g (fig. 12). La muestra perteneciente al productor 8 fue la que presentó los recuentos totales de mohos y levaduras más elevados (1.2×10^7 UFC/g) mientras que, el recuento total más bajo correspondió a la muestra del productor 7 (1.1×10^6 UFC/g).

Figura 12. Recuento de mohos y levaduras de las muestras CO



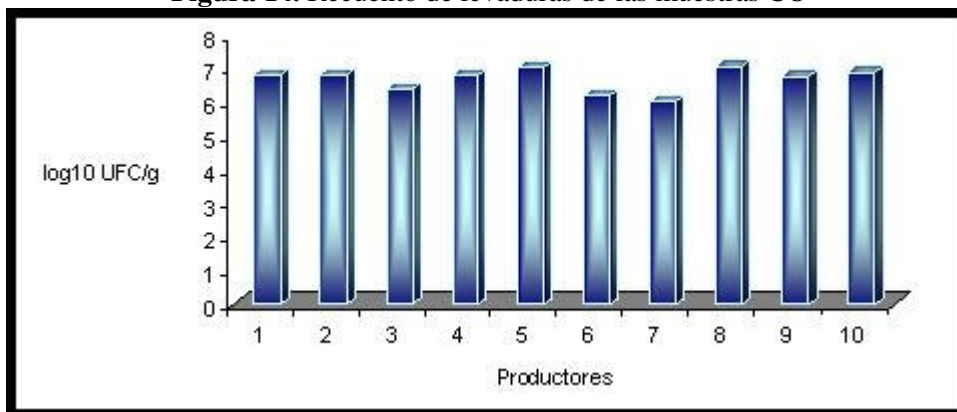
Los recuentos de mohos en las muestras CO, se hallaron en niveles de 10^4 a 10^5 UFC/g (fig. 13). La muestra correspondiente al productor 4 fue la que tuvo el recuento de mohos más alto (4.0×10^5 UFC/g) y a diferencia de ésta, el recuento de mohos de la muestra del productor 10 fue el más bajo (1.2×10^4 UFC/g).

Figura 13. Recuento de mohos de las muestras CO



Los recuentos de levaduras en las muestras CO, mostraron valores de 10^6 a 10^7 UFC/g (fig. 14). En la muestra del productor 8 se observó el recuento de levaduras más alto (1.2×10^7 UFC/g) y al contrario de ésta, en la muestra del productor 7 se encontró el recuento más bajo (1.1×10^6 UFC/g).

Figura 14. Recuento de levaduras de las muestras CO



Los resultados de los recuentos de mohos y levaduras obtenidos de las muestras CO, se muestran más altos que los obtenidos por Kristensen & Elmholt (2002), los cuales obtuvieron recuentos totales de mohos y levaduras de 10^5 UFC/g en granos de centeno recién cosechados y establecieron una relación entre el momento de la cosecha y la población de hongos, puesto que los granos que se cosechaban a tiempo presentaban recuentos más bajos que los granos cosechados tardíamente; no obstante, nuestros resultados coinciden con los reportados en un estudio llevado a cabo en Polonia (Krysinska *et al.*, 2001), en el cual se realizó un análisis de

la contaminación fúngica en granos de trigo recientemente cosechados con alto contenido de polvo y los recuentos totales caían en un rango de 10^6 a 10^7 UFC/g.

En lo que respecta al recuento de mohos, los resultados de las muestras pertenecientes a los productores 1, 6, 7, 8, 9 y 10, fueron los más bajos (10^4 UFC/g), estos valores concuerdan con los reportados por Zvicevicius *et al.* (2005) para granos de cebada cosechada recientemente utilizada como forraje, sin embargo, son superiores a los obtenidos en este mismo estudio para granos de cebada maltera (10^3 UFC/g). Las muestras de los productores 2, 3, 4 y 5 presentaron recuentos de mohos en un orden de 10^5 UFC/g, valores superiores a los reportados por Zvicevicius *et al.* (2005) y otros autores para mezclas de cereales (trigo, trigo forrajero y centeno) [10^4 UFC/g] (Kristensen & Elmholt, 2002; Löiveke, 2004^b). Para todas las muestras analizadas, los recuentos de levaduras, fueron mayores que los obtenidos (10^5 UFC/g) por Kristensen & Elmholt (2002), en granos de centeno recién cosechados.

Es inmediatamente después de la cosecha cuando en los granos se desarrollan cambios importantes, los cuales dependen de la temperatura y del contenido de humedad (Muir & White, 2004), por lo que también durante la cosecha las condiciones climáticas juegan un papel importante en la deposición de microorganismos en la superficie del grano (Ackermann, 1998). Asimismo, la severidad en la infección se incrementa cuando se ha retrasado la cosecha y al presentarse temporadas lluviosas (Kristensen & Elmholt, 2002; Löiveke, 2004^a), la cantidad de polvo en esta etapa igualmente juega un papel importante en el grado de contaminación, pues las operaciones agrícolas en áreas rurales, y en particular durante la cosecha, se han considerado como una importante fuente de polvo, compuesto esencialmente por materia orgánica y bioaerosoles, que permiten la dispersión de esporas fúngicas en áreas cercanas (Abdel Hameed & Khoder, 2001; Mitakakis *et al.*, 2001). Las muestras analizadas en esta etapa contenían una cantidad considerable de polvo y la cosecha se realizó tardíamente, esto podría explicar los altos recuentos de mohos y levaduras obtenidos para todas las muestras.

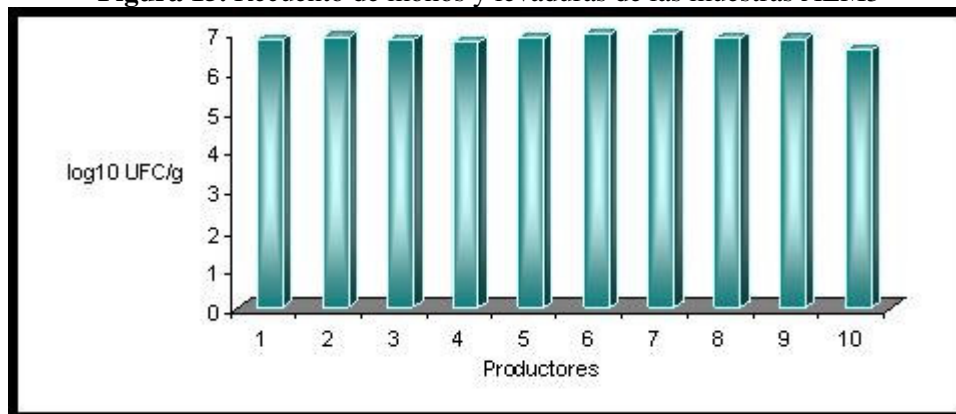
5.1.3. MUESTRAS ALMACENADAS

5.1.3.1. Muestras almacenadas durante 3 meses (ALM3)

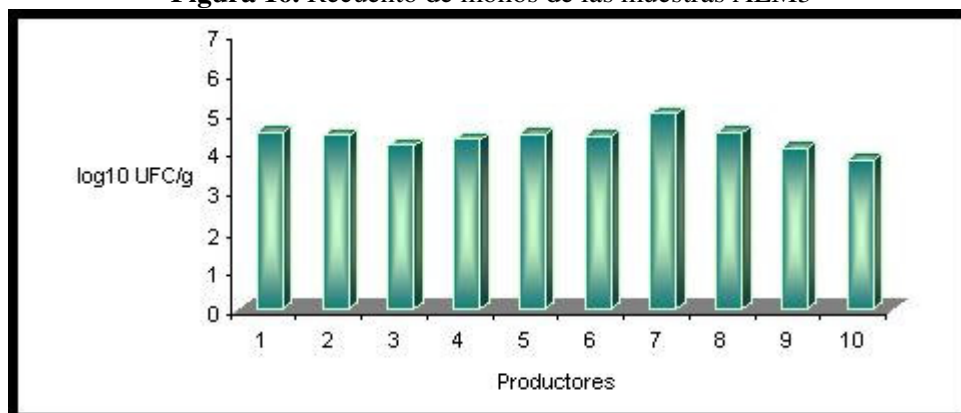
Todas las muestras recolectadas durante esta etapa presentaron crecimiento fúngico aparente. La mayoría mostró un 60% de granos enmohecidos con excepción de las muestras pertenecientes a los productores 8 y 9, que presentaron un porcentaje de granos aparentemente contaminados del 50%. Las muestras de esta etapa presentaban además de un elevado aumento en la cantidad de polvo, una gran cantidad de tierra, piedras pequeñas, trozos de insectos y abundantes restos de materia orgánica (trozos de tallos y hojas secas).

Los recuentos totales de mohos y levaduras, en las muestras ALM3, registraron cifras de 10^6 a 10^7 UFC/g (fig. 15). Las muestras pertenecientes a los productores 6 y 7, fueron las que presentaron los recuentos totales más elevados (1.1×10^7 UFC/g), y en contraste con éstas, el recuento total de la muestra del productor 10 fue el más bajo (3.8×10^6 UFC/g).

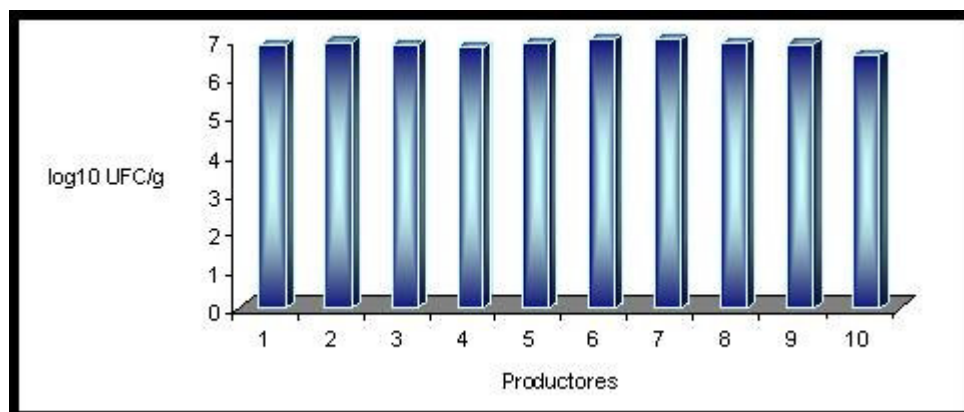
Figura 15. Recuento de mohos y levaduras de las muestras ALM3



Los recuentos de mohos en las muestras ALM3, se hallaron en niveles de 10^3 a 10^4 UFC/g (fig.16). La muestra que presentó el recuento de mohos más alto fue la procedente del productor 7 (9.9×10^4 UFC/g), en cambio, la muestra del productor 10 resultó ser la que tuvo el menor recuento (6.4×10^3 UFC/g).

Figura 16. Recuento de mohos de las muestras ALM3

Los recuentos de levaduras en las muestras ALM3, presentaron cantidades de 10^6 a 10^7 UFC/g (fig. 17). Al igual que en el recuento total, las muestras correspondientes a los productores 6 y 7 mostraron los recuentos de levaduras más elevados (1.1×10^7 UFC/g) mientras que, la muestra del productor 10, tuvo el recuento más reducido (3.8×10^6 UFC/g).

Figura 17. Recuento de levaduras de las muestras ALM3

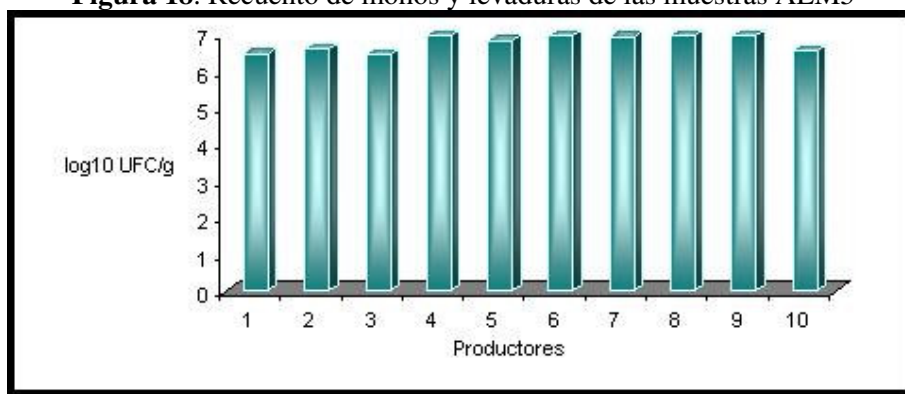
5.1.3.2. Muestras almacenadas durante 5 meses (ALM 5)

La muestra correspondiente al productor 4 era la que más enmohecida se observaba (presentaba el 80% de sus granos afectados), las muestras de los productores 3 y 5 presentaban un grado de enmohecimiento menor (70 % de sus granos afectados) y el resto de las muestras presentaba un porcentaje inferior de contaminación (60% de granos afectados).

La cantidad de tierra, polvo y piedrecillas encontrados en este estadio de recolección, al igual que los restos de material orgánico contaminado, era similar a la de la etapa anterior.

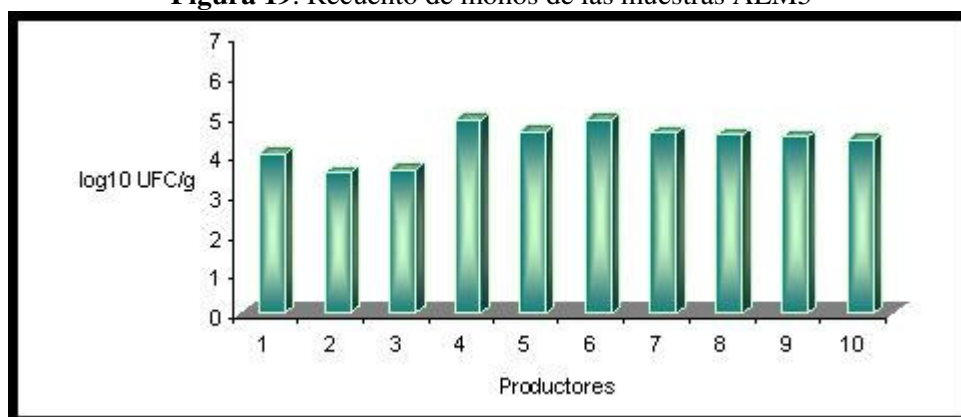
Los recuentos totales de las muestras ALM5, mostraron valores de 10^6 a 10^7 UFC/g (fig. 18). En la muestra perteneciente al productor 4 se observó el recuento total más alto de esta etapa (1.0×10^7 UFC/g) por el contrario, el recuento total de la muestra obtenida del productor 3, fue el más bajo (2.8×10^6 UFC/g).

Figura 18. Recuento de mohos y levaduras de las muestras ALM5



Los recuentos de mohos de las muestras ALM5, se observaron en niveles de 10^3 a 10^4 UFC/g (fig. 19). La muestra que presentó una mayor contaminación con mohos fue la correspondiente al productor 4 (8.6×10^4 UFC/g) en contraste, la muestra del productor 2 resultó ser la que tuvo un menor recuento (3.8×10^3 UFC/g).

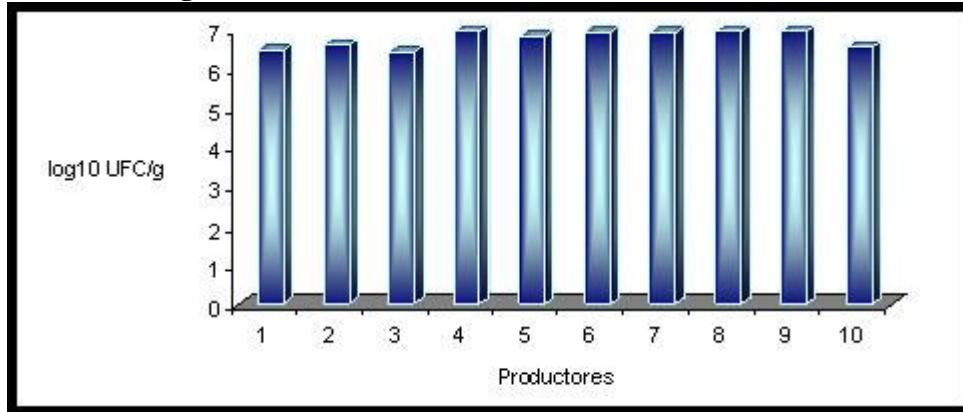
Figura 19. Recuento de mohos de las muestras ALM5



Los recuentos de levaduras en las muestras ALM5 registraron cantidades de 10^6 a 10^7 UFC/g (fig. 20). La muestra que se obtuvo del productor 4 presentó el recuento de levaduras más alto

(1.0×10^7 UFC/g) a diferencia de ésta, la muestra proporcionada por el productor 3, presentó el recuento de levaduras más reducido de esta etapa (2.8×10^6 UFC/g).

Figura 20. Recuento de levaduras de las muestras ALM5



Con respecto al recuento de mohos, los resultados obtenidos en las muestras ALM3 y ALM5, fueron más bajos que los valores reportados por Aran & Eke (1987) y Löiveke *et al.* (2004) de (10^3 - 10^6 UFC/g) y (10^4 - 10^5 UFC/g) respectivamente en granos de arroz, avena, cebada, maíz y trigo, en granjas de Turquía y Estonia. Sin embargo, Baliukoniene *et al.* (2003) y Railiene *et al.* (2005), reportaron recuentos similares (10^4 UFC/g) a los obtenidos en nuestro estudio, en granos de cebada almacenados provenientes de granjas (pequeña y mediana producción) y molinos, ambos en Lituania. Los valores de tres de las muestras de cebada analizada (productor 10; muestras ALM3 y productores 2 y 3; muestras ALM5) coinciden con valores reportados (10^3 UFC/g) por Follstad & Christensen (1962), en granos de cebada recolectados de granjas de Estados Unidos.

Los resultados de los recuentos de levaduras durante el almacenamiento son similares a los encontrados por Laitila *et al.* (2005), en granos de cebada conservados en un ambiente de alta humedad.

El almacenamiento, si las condiciones lo permiten, es la etapa en que generalmente los mohos presentes en los granos se hacen visibles. La humedad y el calor pueden incrementar el rango de deterioro y junto con la composición del aire intergranular, pueden llegar a afectar la presencia de mohos a lo largo del mismo (Muir & White, 2004).

Los hongos que se encuentran presentes durante el almacenamiento pueden tener su origen en los contenedores de transporte, en los sacos y en los mismos depósitos. El polvo generado cada vez que se maneja el grano es una de las principales causas de dispersión de las esporas fúngicas al ambiente de los silos, asimismo, el polvo de los granos que usualmente se recoge, se le vuelve a añadir a los propios granos. Por otra parte, los granos almacenados están moribundos y les faltan los mecanismos defensivos de los granos frescos, por lo que en condiciones inadecuadas de almacenamiento se pueden ver desarrollados diversos organismos fúngicos. (ICMSF, 2001). En el interior de un volumen de grano ya almacenado, la diseminación de las esporas fúngicas, por medio de insectos parece ser la forma más importante en que se puede propagar la contaminación (Ramírez, 1984; Muir & White, 2004).

Es pertinente mencionar que las condiciones de almacenamiento de los productores, tienen como objetivo proteger a los granos de elementos como la lluvia, la humedad del suelo, aves, y plagas de insectos y roedores, sin embargo, no les proporcionan una protección adecuada de elementos como la humedad del ambiente, el viento y el polvo que puede ser acarreado por éste.

Debido a que la parte frontal de los almacenes no poseía ningún tipo de protección, a los granos se les proveyó de una ventilación considerable durante el almacenamiento. Como la humedad relativa del ambiente no estaba controlada, se promovió la formación de puntos de humedad dentro de los mismos sacos y dado que el sistema utilizado para llenar los sacos facilitó la dispersión de polvo hacia los granos, se explica el incremento de levaduras durante ésta etapa, ya que el desarrollo de estos organismos depende enormemente de las condiciones del medio y la humedad (ICMSF, 2001). Aunque se observaron diferencias entre los recuentos de las muestras de los diferentes productores, éstas no fueron tan importantes, lo cual resulta comprensible puesto que las condiciones de almacenamiento fueron las mismas.

5.1.4. COMPARACIÓN DE RESULTADOS EN LAS DIFERENTES ETAPAS

Con respecto al crecimiento fúngico aparente de las muestras de cebada, se observó que en los granos aparentemente contaminados con mohos, se notaba cierto grado de decoloración, por lo que los granos presentaron un color amarillo más claro y opaco, además, se advertía la presencia de pequeños puntos negros y excoriaciones sobre la superficie del mismo. En las muestras PC, si bien los granos contaminados presentaban las señales ya descritas, éstas no eran tan pronunciadas como en las muestras CO, así como en las muestras ALM3 y ALM5, además que en los granos de las tres últimas etapas mencionadas, principalmente en ALM5, se podían observar una mayor cantidad de pequeñas motas negras que invadían la superficie de los granos. Esto coincide con los signos de contaminación fúngica reportados por Young & Loughman (2001), quienes analizaron granos de cebada dañados por mohos, sin embargo, los granos de cebada de Tlanalapa, no presentaron coloración gris alguna, que de acuerdo a los autores antes mencionados, corresponde a una forma más extrema de contaminación fúngica. Al igual que en nuestro caso, Follstad & Christensen (1962), aislaron una mayor carga fúngica en granos decolorados y manchados que en granos aparentemente sanos. Kotheimer & Christensen (1961), hallaron un mayor número de microorganismos en el malteado, después del remojo de la semilla de cebada, en granos afectados por manchas y decoloración, que en granos aparentemente saludables y claros.

Los recuentos totales de mohos y levaduras en todas las muestras analizadas, a lo largo del estudio, presentaron valores de recuentos de entre 10^5 y 10^7 UFC/g (fig. 21), lo que en si representa una contaminación alta, siendo menor el rango en que se mantuvieron los recuentos en la etapa previa al cosechado de las muestras, aumentando en el transcurso de un mes y manteniéndose en los mismos rangos en las etapas posteriores. Estos resultados son más altos, incluyendo a los valores de la etapa de precosecha, en al menos una unidad logarítmica, que los resultados obtenidos por otros autores al analizar muestras de granos de cereales (maíz y trigo) destinados para consumo humano (Abarca *et al.*, 1994; Castellá *et al.*, 1996; Castellá *et al.*, 1999; Martínez, 2003). Las muestras PC presentaron los recuentos totales más bajos.

En la figura 21 se muestran las medias de los valores de los recuentos de mohos y levaduras obtenidos para cada etapa de recolección. Para determinar si estos resultados diferían significativamente, se realizó un ANOVA entre los resultados de las etapas. Se observaron diferencias significativas, para al menos una de las medias de las etapas de recolección ($F=16.567$ y sig. 0.00). La prueba de Tukey nos indicó que los valores del recuento total de mohos y levaduras en las muestras PC, resultaron significativamente inferiores (sig. 0.05) a los obtenidos en las muestras recolectadas en los demás estadios.

El grado de contaminación fúngica en granos y cereales almacenados y en piensos, puede utilizarse como una medida de la calidad de las condiciones de almacenamiento (temperatura y grado de humedad adecuados, etc.) a las que han sido sometidas. Así, los piensos o granos con bajos recuentos fúngicos (10^1 - 10^3 UFC/g), pueden considerarse de mejor calidad y más seguros, que aquellos con recuentos (10^6 UFC/g) más altos (Karunaratne & Bullerman, 1990).

Es importante enfatizar que todas las muestras analizadas, en los distintos periodos de recolección, presentaron recuentos totales de mohos y levaduras más elevados que el valor permitido por la ICMSF, que es de 1×10^4 UFC/g (ICMSF, 1980; Freitas & Scussel, 2002), sin embargo, ciertas muestras de la etapa PC, mostraron recuentos de mohos y levaduras similares al máximo nivel permitido por Chelkoswski (1991), que reporta que el recuento total de mohos y levaduras no debería superar el valor de 1×10^5 UFC/g.

En relación a los recuentos de mohos en las muestras analizadas, a lo largo del estudio, estos mostraron cifras de 10^3 y 10^5 UFC/g. Las muestras PC resultaron con la mayor contaminación por mohos, y al contrario de ésta, las etapas ALM3 y ALM5 fueron las que presentaron una menor presencia de mohos.

En la figura 22 se muestran las medias de los valores del recuento de mohos, obtenidos para cada etapa de recolección. Para determinar si estos resultados diferían significativamente, se realizó un ANOVA entre los resultados de las etapas. Se observaron diferencias significativas para al menos una de las etapas de recolección ($F=4.68$ y sig. de 0.005). La prueba de Tukey

reveló que los valores obtenidos del recuento de mohos son significativamente mayores (sig. 0.05) en las muestras PC y CO.

Con respecto a los recuentos de levaduras, estos se encontraron en cantidades de 10^4 a 10^7 UFC/g, siendo las etapas ALM3 y ALM5 las que presentaron los valores más altos y la etapa PC los valores más bajos. Curiosamente, los recuentos de mohos presentaron los valores más bajos en las fases ALM3 y ALM5, siendo la etapa PC la que presentó los valores más altos del recuento de mohos. Una gran cantidad de levaduras en condiciones de almacenamiento pueden impedir el desarrollo de ciertos géneros de mohos, esto puede ser debido a la competencia por el oxígeno, pero también por la cantidad de CO_2 que pueden llegar a producir (Manhanna, 1991; Hoffman & Combs, 2004).

En la figura 23 se muestran las medias de los valores de los recuentos de levaduras, obtenidos en cada etapa de recolección. Para determinar si estos resultados diferían significativamente se realizó un ANOVA entre las etapas. Se observaron diferencias significativas para al menos unas de las etapas de recolección ($F= 8.78$, sig. 0.00). El análisis de Tukey indicó que los valores de los recuentos de levaduras en las muestras PC, son significativamente inferiores que los valores de los recuentos de las demás etapas.

Los recuentos totales de las muestras analizadas, fueron un reflejo del grado de contaminación por levaduras, pues en todos los casos, a excepción de una muestra en la etapa de precosecha, los recuentos de levaduras fueron mayores que los recuentos de mohos, principalmente en las etapas en que se realizaron los recuentos fúngicos al estar los granos almacenados. Las levaduras normalmente no causan problemas de deterioro (ICMSF, 2001), aunque en suficiente cantidad pueden contribuir a la formación de inestabilidad aeróbica y a la disminución del pH (Hoffman & Combs, 2004).

Figura 21. Medias de los recuentos de mohos y levaduras en las etapas de muestreo

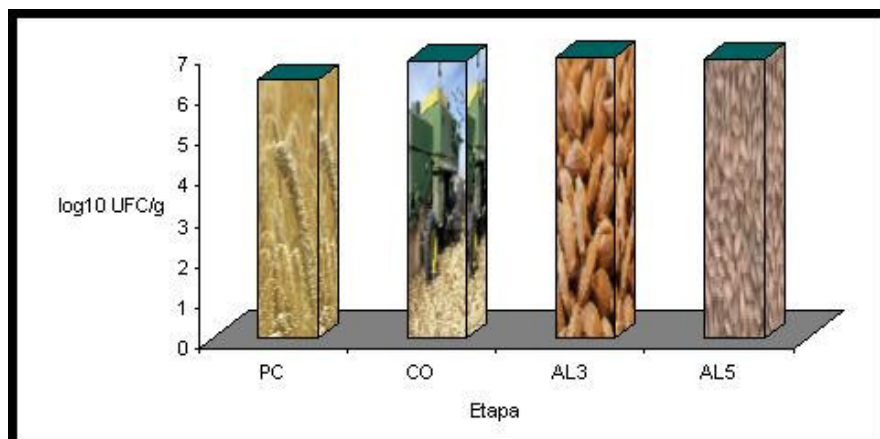


Figura 22. Medias de los recuentos de mohos en las etapas de muestreo

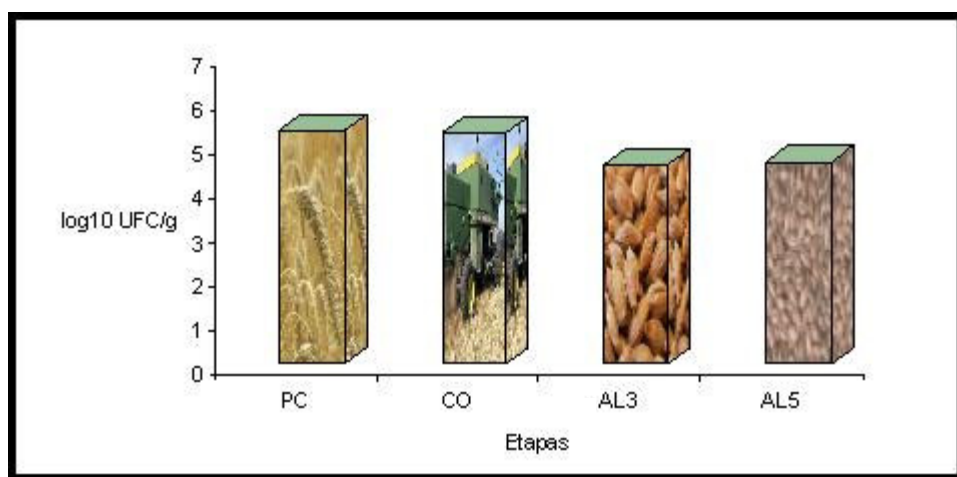
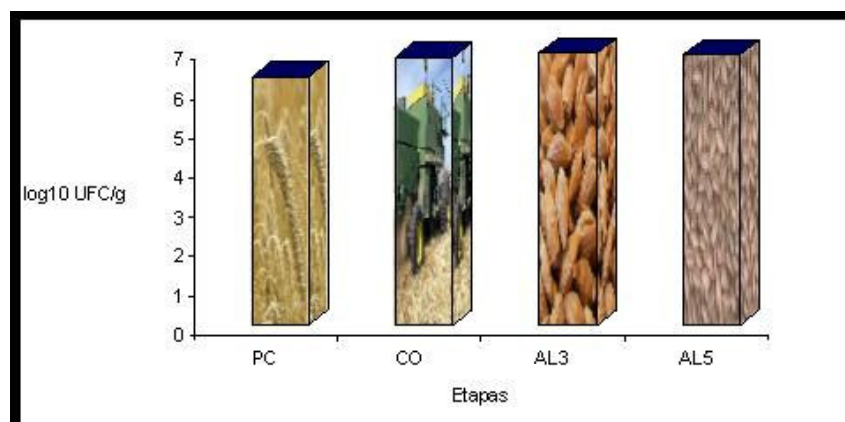


Figura 23. Medias de los recuentos de levaduras en las etapas de muestreo



5.2. GÉNEROS FÚNGICOS AISLADOS

Se aislaron 15 géneros fúngicos en las distintas muestras de cebada analizadas: *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp., *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Ulocladium* spp., *Epicoccum* spp., *Trichoderma* spp., *Curvularia* spp., *Aureobasidium* spp., *Chrysonilia* spp., *Geomyces* spp., *Trichotecium* spp. y *Mycelia sterilia*.

Los géneros fúngicos aislados se reportaron en porcentaje de frecuencia, el cual se calculó como el número de muestras en que estuvo presente el género, sobre el total de las muestras analizadas, por cien.

5.2.1. MUESTRAS RECOLECTADAS UN MES PREVIO A LA COSECHA (PC)

En esta etapa se aislaron 7 géneros fúngicos en las distintas muestras de cebada analizadas: *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Curvularia* spp., *Fusarium* spp., *Mycelia sterilia*, *Penicillium* spp. y *Rhizopus* spp., (cuadro 6) de los cuales, los géneros aislados con mayor frecuencia fueron: *Cladosporium* spp. (100%), *Alternaria* spp. (60%), *Penicillium* spp. (50%) y *Mycelia sterilia* (50%), nuestros resultados coinciden con los de Marchand (2003), en un estudio llevado a cabo en granos de cebada recolectados antes de la cosecha, en diferentes zonas pertenecientes a los Valles Altos de los Estados de Hidalgo y Tlaxcala (tiene especial importancia, debido a la cercanía con nuestras zonas de muestreo), en donde los géneros predominantes fueron *Alternaria* spp (97%) y *Penicillium* spp. (30%), sin embargo, el autor reportó la incidencia de *Aspergillus* spp., el cual, en el presente estudio no se aisló en las muestras PC. También nuestros datos muestran concordancia con los resultados obtenidos por otros autores en distintas partes del mundo, durante el estudio de la micoflora en muestras de cebada antes de ser cosechada (Follstad & Christensen, 1962; Rabie & Lübben, 1993; Young & Loughman, 2001), donde los géneros *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Mycelia sterilia* y *Penicillium* spp. se encontraban dentro de los géneros predominantes en las muestras analizadas.

La mayoría de los géneros aislados en esta etapa (*Cladosporium* spp., *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp.), no se consideran parásitos de las plantas (con excepción de *Fusarium* spp.); aunque pueden llegar a crecer a costa de excreciones de las plantas y material orgánico (polvo, polen, etc.), este tipo de organismos usualmente no penetran al interior de la semilla, pero bajo ciertas condiciones pueden llegar a cambiar a la forma de vida parásita, logrando dañar la vitalidad y la calidad de los granos (Löiveke *et al.*, 2004), por lo que se considera que la incidencia de estos géneros fúngicos en etapas cercanas a la cosecha, es un factor importante en la reducción de la cantidad y la calidad de las materias primas y especialmente las especies de hongos que son capaces de producir micotoxinas juegan un papel substancial en la calidad sanitaria de los granos (ICMSF, 2001; Akar *et al.*, 2003).

5.2.2. MUESTRAS RECOLECTADAS EN LA ETAPA DE COSECHA (CO)

Los géneros fúngicos aislados en esta etapa, coincidieron con los que se aislaron en la etapa anterior, exceptuando a los géneros *Aspergillus* spp., *Epicoccum* spp., *Trichoderma* spp. y *Ulocladium* spp., los cuales se aislaron en ciertas muestras CO (cuadro 6), sin embargo, a diferencia de la etapa anterior, en ésta no se logró aislar el género *Curvularia* spp. De los 10 géneros aislados en esta etapa, los que se observaron con mayor frecuencia fueron: *Cladosporium* spp. (100%), *Fusarium* spp. (70%), *Mycelia sterilia* (80%) y *Alternaria* spp. (60%). Los datos obtenidos coinciden con los reportados por otros autores en muestras de granos de cebada recolectados poco después de la cosecha y que fueron obtenidas de diferentes regiones pertenecientes a los Municipios de Apan, Tepeapulco, Singuilucan (De la Cruz, 2002) y Tolcayuca, Hidalgo (Romero, 2004), municipios vecinos de Tlanalapa, en dichos estudios se encontró que los géneros *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp. fueron los géneros dominantes y se pueden localizar habitando de manera considerable el interior de la semilla de cebada. Igualmente nuestros resultados reflejan similitud con los obtenidos por otros autores durante el estudio de la micoflora en muestras de cebada recién cosechada (Chong & Sheridan, 1982; Lee *et al.*, 1986; Ackermann, 1998; Semaskiene *et al.*, 2005), donde los géneros *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. y *Cladosporium* spp. se encontraban dentro de los géneros predominantes en las muestras analizadas.

A diferencia con Abdel-Kader *et al.* (1979), en el presente estudio, los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* no fueron los géneros aislados con mayor frecuencia, aunque se aislaron cepas pertenecientes a estos géneros en por lo menos una muestra de cebada analizada en ésta etapa.

Se pudo observar que luego de haber sido cosechados, los granos transportan consigo una gran variedad de géneros fúngicos tanto de campo como de almacenamiento que pueden estar presentes como esporas o micelio tanto en la superficie como en las capas más internas de la semilla (Ramírez, 1984; Pan de la Guerra, 2000; Baliukoniene *et al.*, 2003). Nuestros resultados muestran concordancia con Christensen & Kauffman (1969), quienes observaron que, en el momento de la cosecha, los granos no eran colonizados en gran medida por hongos de almacenamiento.

Cuadro 6. Porcentaje de frecuencia de los géneros fúngicos aislados en las muestras PC y CO

Género fúngico	Frecuencia de aislamiento	
	Muestras PC	Muestras CO
	%	%
<i>Alternaria</i> spp.	60	60
<i>Aspergillus</i> spp.	0	20
<i>Cladosporium</i> spp.	100	100
<i>Curvularia</i> spp.	10	0
<i>Epicoccum</i> spp.	0	10
<i>Fusarium</i> spp.	20	70
<i>Mycelia Sterilia</i>	50	80
<i>Penicillium</i> spp.	50	30
<i>Rhizopus</i> spp.	20	30
<i>Trichoderma</i> spp.	0	10
<i>Ulocladium</i> spp.	0	20

5.2.3. MUESTRAS ALMACENADAS

5.2.3.1. Muestras almacenadas durante 3 meses (ALM3)

Los géneros fúngicos que se aislaron en esta etapa, coinciden con los géneros identificados en las muestras CO, con excepción del género *Aureobasidium* spp., que fue aislado por lo menos de una muestra, mientras que el género *Epicoccum* spp. el cual se presentó en las muestras CO, no fue aislado en las muestras ALM3. Los géneros aislados con mayor frecuencia fueron: *Fusarium* spp. (100%), *Cladosporium* spp. (100%), *Mycelia sterilia* (100%) y *Alternaria* spp. (40%) [cuadro 7].

5.2.3.2. Muestras almacenadas durante cinco meses (ALM5)

Los géneros fúngicos encontrados, se igualan con los géneros aislados en la etapa anterior (cuadro 7), sin embargo, en esta etapa se presenta el cambio de micoflora más notable, al no aislarse los géneros *Aspergillus* spp., *Aureobasidium* spp., *Penicillium* spp. y *Rhizopus* spp., mismos que se hallaron presentes en la etapa anterior y con la aparición de los géneros *Chrysonilia* spp., *Geomyces* spp. y *Trichotecium* spp. Los géneros con mayor frecuencia de aislamiento fueron: *Fusarium* spp. (100%), *Cladosporium* spp. (100%), *Mycelia sterilia* (80%), *Alternaria* spp. (50%) y *Ulocladium* spp. (40%).

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por otros autores durante el estudio de la micoflora de granos de cebada almacenados (Ackermann, 1998; Löiveke *et al.*, 2004; Railiene *et al.*, 2005), en donde los géneros predominantes fueron *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium* y *Mycelia sterilia*, sin embargo, la incidencia de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* en estos estudios, es mayor a la reportada por nosotros.

En contraste con El-Kady *et al.* (1982), quien reporta al género *Aspergillus* como el género predominante en muestras de cebada almacenada, en el presente estudio este género no fue uno de los aislados con mayor frecuencia, aunque en las muestras ALM3, se aisló de por lo menos dos muestras.

Cuadro 7. Porcentaje de frecuencia de los géneros fúngicos aislados en las muestras ALM3 y ALM5

Género fúngico	Frecuencia de aislamiento	
	Muestras ALM3	Muestras ALM5
	%	%
<i>Alternaria</i> spp.	40	50
<i>Aspergillus</i> spp.	20	0
<i>Aureobasidium</i> spp.	10	0
<i>Chrysonilia</i> spp.	0	30
<i>Cladosporium</i> spp.	100	100
<i>Fusarium</i> spp.	100	100
<i>Geomyces</i> spp.	0	10
<i>Mycelia sterilia</i>	100	80
<i>Penicillium</i> spp.	10	0
<i>Rhizopus</i> spp.	20	0
<i>Trichoderma</i> spp.	10	10
<i>Trichotecium</i> spp.	0	10
<i>Ulocladium</i> spp.	20	40

Los parámetros de calidad del grano pueden cambiar durante el almacenamiento de la cebada, incluso en aquellos acondicionados adecuadamente. Los cambios pueden ser debidos a una ventilación inadecuada, a un incremento en la concentración de agua en las paredes del granero o al calentamiento debido a factores biológicos (la respiración de los organismos juega un papel importante) [Ramírez, 1984; Pan de la Guerra, 2000; Baliukoniene *et al.*, 2003; Muir & White; 2004], por lo que se estos factores deben ser cuidadosamente controlados durante un almacenamiento por largos periodos. En México, el problema de conservación de los granos reviste una mayor importancia debido a la carencia de buenos almacenes, aunque en muchas partes existen almacenes donde el manejo del granos se realiza con toda propiedad, puede afirmarse en forma general que muchos de los agricultores siguen empleando bodegas carentes de toda ventaja para la buena conservación de los granos, además, el secado y la limpieza de los granos se practica a muy baja escala (Ramírez, 1984).

5.2.4. COMPARACIÓN DE RESULTADOS EN LAS DIFERENTES ETAPAS

La micoflora de las muestras de cebada analizada estaba conformada por dos grupos de géneros ecológicamente definidos como hongos de campo y de almacenamiento (Christensen & Kaufmann, 1969). El primer grupo está constituido fundamentalmente por *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. y *Ulocladium* spp. y el segundo por *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. Estudios similares en otras partes del mundo que concuerdan con nuestros resultados, muestran que los principales géneros fúngicos, a nivel de campo y almacenamiento, que contaminan los granos de cebada pertenecen a los géneros *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Fusarium* spp., *Ulocladium* spp., *Penicillium* spp. y *Rhizopus* spp. (Flannigan & Healy, 1983; Lacey *et al.*, 1991). El cuadro 8 muestra los resultados de frecuencia de aislamiento de los géneros fúngicos encontrados en las diferentes etapas de nuestro estudio, comparadas con los resultados reportados por distintos autores.

Los géneros fúngicos que se aislaron en todas las etapas del estudio fueron: *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Fusarium* spp. y *Mycelia sterilia*. La frecuencia de *Cladosporium* spp. fue la misma en todas las etapas de recolección (100%), asimismo, *Mycelia sterilia* mostró una frecuencia de aislamiento alta en las muestras PC, CO, ALM3 y ALM5 (50%, 80%, 100% y 80%, respectivamente). La frecuencia con que se aisló al género *Alternaria* spp. fue igual para las muestras PC y CO (60%) y aunque disminuyó en las muestras ALM3 y ALM5, está continuó siendo importante (40% y 50%, respectivamente). *Fusarium* spp. presentó una baja frecuencia de aislamiento en las muestras PC (20%), sin embargo, este género fue predominante en las muestras CO, ALM3 y ALM5 (70%, 100% y 100%).

La presencia del género *Cladosporium* spp. en todas las muestras analizadas (PC, CO, ALM3 y ALM5), puede deberse a que de todos los mohos aislados en nuestro estudio, las esporas de este género fúngico se encuentran presentes en el aire en mayor cantidad (Carrillo, 2003), esto puede ser atribuido al tamaño y a la naturaleza de sus esporas pues el género *Cladosporium* spp. produce cadenas de conidios particularmente secos, fácilmente dispersados por el aire (Abdel Hameed & Khoder, 2001). Las especies de este género son consideradas saprobias y causantes comunes de la descomposición de las hojas y frecuentes colonizadoras de los espacios interiores (Abbott, 2002). En cuanto a la ocurrencia de *Cladosporium* spp., el clima húmedo es más favorable para que ésta suceda, especialmente durante la maduración del grano y en la etapa de cosechado (Semaskiene *et al.*, 2005).

Cuadro 8. Comparación con otros autores de los géneros aislados en las diferentes etapas de nuestro estudio

a=valores mayores a los reportados en el estudio, b=valores menores a los reportados en el estudio, c=valores aproximados a los reportados en el estudio, d=géneros que no se aislaron en la etapa mencionada

No se encontraron reportes del aislamiento de los géneros *Chrysonilia* spp., *Geomyces* spp. y *Trichotecium* spp.

Género	Frecuencia de aislamiento			Referencias
	Precosecha	Cosecha	Almacén	
	%	%	%	
<i>Alternaria</i> spp.	100 ^a , 97 ^a	90 ^a , 100 ^a , 100 ^a , 50 ^c , 50 ^c	8 ^b	Chong & Sheridan, 1982; Lee <i>et al.</i> , 1986; Ackerman, 1998; Young & Loughman, 2001; Baliukoniene <i>et al.</i> , 2003; Marchand, 2003; Romero, 2004; Semaskiene <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus</i> spp.	1.4 ^d , 7 ^d	25 ^c , 20 ^c , 18 ^c , 50 ^a	31 ^c , 7 ^c , 95 ^a	El-Kady <i>et al.</i> 1982; Chong & Sheridan, 1982; Lee <i>et al.</i> , 1986; Ackerman, 1998; Young & Loughman, 2001; Czerwiewski, 2002; De la Cruz, 2002; Baliukoniene <i>et al.</i> , 2003; Marchand, 2003
<i>Aureobasidium</i> spp.		2 ^d		Lee <i>et al.</i> , 1982
<i>Cladosporium</i> spp.	30 ^b , 17 ^b	82 ^c , 50 ^b , 100 ^c		Chong & Sheridan, 1982; Ackerman, 1998; Young & Loughman, 2001; Marchand, 2003; Semaskiene <i>et al.</i> , 2005
<i>Curvularia</i> spp.	2 ^b	9 ^d , 3 ^d		Chong & Sheridan, 1982; Lee <i>et al.</i> , 1986; Young & Loughman, 2001
<i>Epicoccum</i> spp.	3 ^d	25 ^c , 84 ^a , 5 ^c		Chong & Sheridan, 1982; Lee <i>et al.</i> , 1986; Ackerman, 1998; Young & Loughman, 2001
<i>Fusarium</i> spp.	12 ^c , 100 ^a	50 ^b , 7 ^b , 97 ^a , 15 ^b , 90 ^a , 55 ^c	17 ^b	Chong & Sheridan, 1982; Lee <i>et al.</i> , 1986; Ackerman, 1998; Young & Loughman, 2001; De la Cruz, 2002; Baliukoniene <i>et al.</i> , 2003; Marchand, 2003; Romero, 2004; Semaskiene <i>et al.</i> , 2005
<i>Mycelia sterilia</i>	40 ^c			Young & Loughman, 2001
<i>Penicillium</i> spp.	30 ^c	94 ^a , 13 ^c	40 ^a	Chong & Sheridan, 1982; Lee <i>et al.</i> , 1986; Baliukoniene <i>et al.</i> , 2003; Marchand, 2003
<i>Rhizopus</i> spp.		69 ^a	16 ^c	Chong & Sheridan, 1982; Baliukoniene <i>et al.</i> , 2003
<i>Trichoderma</i> spp.		13 ^c		Chong & Sheridan, 1982
<i>Ulocladium</i> spp.	47 ^d	78 ^a		Chong & Sheridan, 1982; Young & Loughman, 2001

Además de los géneros ya descritos, en el presente estudio se aislaron géneros que si bien no estuvieron en todas las etapas, sí se presentaron en por lo menos una de éstas: *Curvularia* spp., sólo se presentó en las muestras PC (10%). *Penicillium* spp. al igual que *Rhizopus* spp. se aisló en las muestras PC, CO y ALM3, teniendo *Penicillium* spp. una frecuencia considerable en las muestras PC (50%), sin embargo, ésta disminuyó en las etapas posteriores (30% y 10%), *Rhizopus* spp. en cada etapa mostró una frecuencia baja (20%, 30% y 20%). La frecuencia de *Aspergillus* spp., aunque baja, fue la misma para las muestras CO y ALM3 (20%), mientras que *Epicoccum* spp. únicamente estuvo presente en las muestras CO (10%). Los géneros *Trichoderma* spp. y *Ulocladium* spp. se presentaron en las muestras CO, ALM3 y ALM5, *Trichoderma* spp. tuvo la misma frecuencia de aislamiento en dichas etapas (10%), y si bien *Ulocladium* spp. presentó la misma frecuencia en las muestras CO y ALM3 (20%), está aumentó en las muestras ALM5 (40%). *Aureobasidium* spp. solamente se aisló en las muestras ALM3 (10%), y al igual que éste, los géneros *Chrysonilia* spp. (30%), *Geomyces* spp. (10%) y *Trichoderma* spp. (10%) sólo estuvieron presentes en las muestras ALM5.

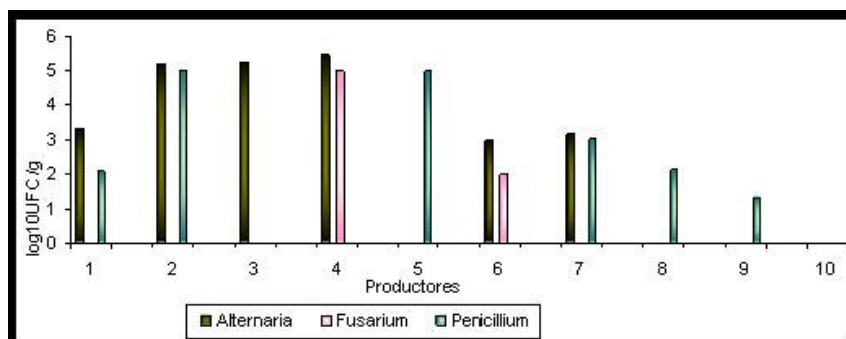
El cambio en la micoflora es un proceso que normalmente se presenta en forma gradual, puesto que dadas las condiciones, los granos de cebada parecen ser contaminados en un principio por parásitos débiles o facultativos, los cuales son mohos que pueden crecer en la superficie de hojas y en los mismos granos, en estos se incluyen los géneros *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp. (fuerte antagonista de *Alternaria*) y *Aureobasidium* spp., aunque este último se aisló hasta la etapa ALM3; posteriormente existen los llamados mohos saprobios, que degradan los nutrientes más sencillos, entre éstos se encuentran los géneros *Rhizopus* spp. y *Ulocladium* spp. Existe otro grupo de mohos que si bien podría ser también catalogado como saprobios, a éstos los caracteriza la capacidad de degradar nutrientes más complejos, entre estos están agrupados *Fusarium* spp. (principalmente considerado como parásito de las plantas) y *Trichoderma* spp., el cual se ve afectado por la presencia de *Fusarium* spp., también a este grupo pertenecen los géneros *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., sin embargo, la necesidad de humedad de estos dos últimos mohos es menor. No obstante, dadas sus características, el tipo de hongo que se desarrolle y domine la comunidad fúngica del grano, dependerá de su interacción con los otros y de cómo responda a las condiciones físicas del mismo (Ghelfa, 1996; Deacon, 1997; Pan de la Guerra, 2000; Abbott, 2002; Akar *et al.*, 2003; Löiveke, 2004^b).

5.3. GÉNEROS POTENCIALMENTE TOXIGÉNICOS

5.3.1. MUESTRAS RECOLECTADAS UN MES PREVIO A LA COSECHA (PC)

Los géneros fúngicos potencialmente toxigénicos aislados en las muestras PC fueron: *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. (fig. 24). El género *Alternaria* spp. mostró una frecuencia alta (60%), al igual que el género *Penicillium* spp. (50%), mientras que el género *Fusarium* spp. presentó una frecuencia baja (20%).

Figura 24. Géneros potencialmente toxigénicos aislados en las muestras PC



Nuestros resultados coinciden con los de Flannigan (1970), quien en un estudio realizado en Escocia en lotes experimentales de cebada observó que el hongo potencialmente toxigénico que se encontraba con una mayor frecuencia era *Alternaria* spp. (85%), otro género potencialmente toxigénico aislado comúnmente en este estudio fue *Penicillium* spp. De igual forma, en un estudio de lotes experimentales de 3 cosechas de cebada inglesa, se observó que *Alternaria* fue el género dominante (75%), también se ha comprobado que en Inglaterra, la cebada está contaminada con una gran variedad de especies pertenecientes al género *Penicillium* (ICMSF, 2001).

La frecuencia de aislamiento obtenida para el género *Fusarium* spp. coincide con los resultados reportados por otros autores (Salas *et al.*, 1999; Henriksen & Elen; 2005), quienes reportan una baja frecuencia de aislamientos para este género en granos de cebada antes de ser cosechados.

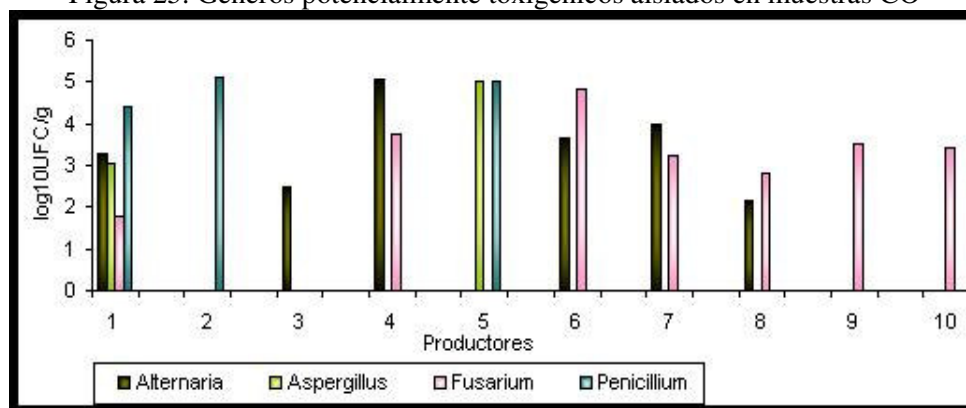
Los géneros *Alternaria* y *Fusarium* se presentan frecuentemente en los cultivos cuando éstos se exponen a condiciones ambientales húmedas; la infección por *Fusarium* aumenta cuando estas condiciones coinciden con la etapa de floración de la espiga, sin embargo, ha sido observada una alta incidencia para *Alternaria* en climas relativamente secos (Sutton, 1982; Cantalejo *et al.*, 1998; Young & Loughman, 2001; NCFAP, 2002; Semaskiene *et al.*, 2005), lo anterior podría explicar la alta frecuencia de *Alternaria* y la baja frecuencia de *Fusarium*, obtenidas en esta etapa.

Con respecto a la alta frecuencia con que se aisló *Penicillium*, a pesar de ser catalogado como hongo de almacenamiento, se ha reportado que algunas especies del género *Penicillium* pueden llegar a invadir los granos antes de la cosecha por lo que también se le puede clasificar como hongo intermedio entre el campo y el almacenamiento (Pan de la Guerra, 2000).

5.3.2. MUESTRAS RECOLECTADAS EN LA ETAPA DE COSECHA (CO)

Los géneros fúngicos potencialmente toxigénicos aislados en las muestras CO fueron: *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. (fig. 25). El género *Fusarium* spp. aumentó su frecuencia en relación a la etapa inmediata anterior (70%), mientras que el género *Alternaria* spp. mantuvo la misma frecuencia (60%). En las muestras CO, también se aislaron géneros pertenecientes al grupo de hongos de almacenamiento con una frecuencia de aislamiento relativamente baja, como fueron *Aspergillus* spp. (20%) y *Penicillium* spp. (30%)

Figura 25. Géneros potencialmente toxigénicos aislados en muestras CO



Coincidiendo con nuestros resultados, en el este de Canadá se han reportado infecciones bastante severas, causadas por el género *Fusarium* spp. llegando a afectar del 50 al 60% de los cultivos (Tekauz, 1999). En un estudio llevado a cabo por Zvicevicius *et al.* (2005), en cebada maltera recién cosechada, se aislaron cepas de los géneros potencialmente toxigénicos: *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp., sin embargo, en cebada destinada al consumo animal también aislaron cepas de *Fusarium* spp. y cepas de *Alternaria* spp., aunque los géneros *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp., tuvieron una frecuencia más baja. Czerwiecki *et al.* (2002), aislaron cepas de *Aspergillus* spp. con un 25% de frecuencia en granos después de cosechados, valor que se asemeja al obtenido en el presente estudio.

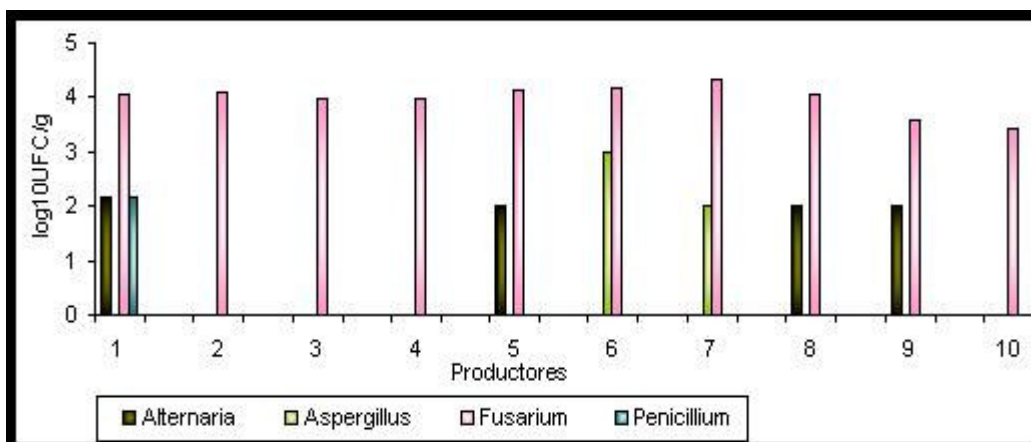
Krysinka *et al.* (2001) detectaron altas poblaciones de *Fusarium* en el polvo desprendido por los granos al momento de ser cosechados, y dada la alta cantidad de polvo observada en nuestras muestras, esto podría explicar el aumento en la frecuencia de este género, en relación a la etapa anterior. Con respecto a *Penicillium* spp. es importante añadir que este género se desarrolla mejor que el género *Aspergillus* spp. en zonas templadas y en climas fríos (ICMSF, 2001), de ahí que el aislamiento de *Penicillium* en esta etapa sea mayor que el del género *Aspergillus*, mismo género que también ha sido clasificado como hongo de almacenamiento, no obstante, *Aspergillus* puede desarrollarse también en el campo al existir condiciones de sequía, logrando así afectar a los cultivos durante ese espacio de tiempo (Ramírez, 1984; Cassel *et al.*, 2001); no obstante, Hua (2002) y (2004) reporta que ciertas cepas de levaduras saprobias pueden ser capaces de modular la producción de esporas de *Aspergillus* spp., asimismo, Moreno (2004) ha reportado que la actividad de algunas especies de *Fusarium* spp. en granos de cereales, reduce la presencia de *Aspergillus flavus* sin embargo, no se puede afirmar que esta sea la principal razón de la baja frecuencia que presentó *Aspergillus*.

5.3.3. MUESTRAS ALMACENADAS

5.3.3.1. Muestras almacenadas durante 3 meses (ALM3)

Los géneros fúngicos potencialmente toxigénicos aislados en las muestras ALM3 fueron: *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. (fig. 26).

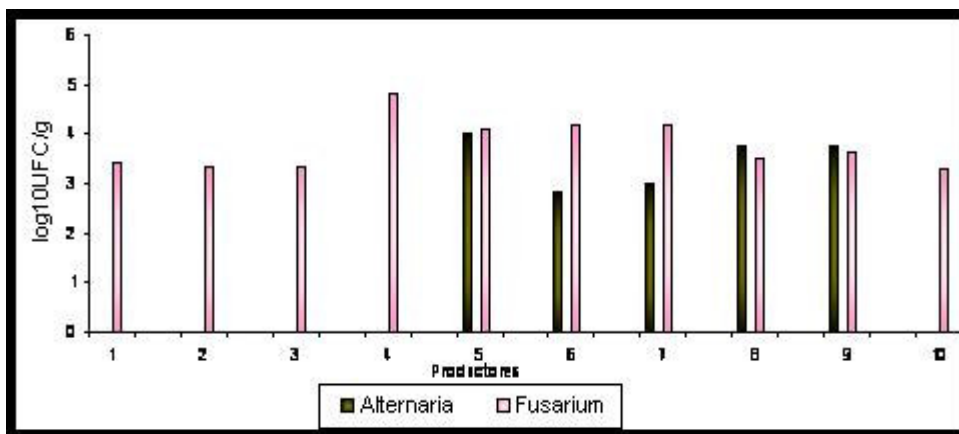
Figura 26. Géneros potencialmente toxigénicos aislados en las muestras ALM3



5.3.3.2. Muestras almacenadas durante 5 meses (ALM5)

Los géneros fúngicos potencialmente toxigénicos aislados en las muestras ALM5 fueron: *Alternaria* spp. y *Fusarium* spp. (fig. 27).

Figura 27. Géneros potencialmente toxigénicos aislados en las muestras ALM5



Los datos de frecuencia que obtuvimos para *Fusarium* spp. en las muestras ALM3 y ALM5 se incrementaron en relación al periodo de recolección anterior. La frecuencia del género *Alternaria* spp. fue menor en las muestras ALM3 (40%) que en las muestras ALM5 (50%). La presencia de ambos géneros durante el almacenamiento, también implica un riesgo sanitario. En las muestras ALM3 el género *Aspergillus* spp. se mantuvo con la misma frecuencia de aislamiento que en las muestras CO (20%), desapareciendo completamente en

las muestras ALM5. El género *Penicillium* spp. en las muestras ALM3, presentó una disminución en la frecuencia de aislamiento (10%) con relación a la etapa anterior, mostrándose totalmente ausente en las muestras ALM5.

En concordancia con nuestros resultados, Christensen & Kaufmann (1969), reportaron que luego de seis semanas de almacenamiento los granos de cebada eran invadidos por *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. También nuestros datos coinciden con Ackerman (1998), el cual reportó la presencia de *Alternaria* spp., *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp. en granos de cebada almacenados; sin embargo, en contraste con nuestros resultados, la frecuencia de *Aspergillus* aumentó con el transcurso del tiempo de almacenamiento.

A diferencia de lo reportado por Follstad & Christensen (1962) y Ackerman (1998), en el presente estudio la frecuencia de los géneros *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. no aumentó durante el periodo de almacenamiento, si no que disminuyó.

La alta frecuencia del género *Fusarium* spp. (100%), se considera contradictoria, ya que este género fúngico es clasificado como un hongo que se desarrolla en el campo, aunque diversos autores han sugerido que *Fusarium* spp. puede ser clasificado como un grupo intermedio entre el campo y el almacenamiento, con la habilidad de desarrollarse durante el almacenamiento siempre y cuando las condiciones de humedad lo permitan. El tiempo que permanezca en el grano almacenado, depende del contenido de humedad y la temperatura en que se conserven los granos, pues se ha reportado que el desarrollo de *Fusarium* dentro de un volumen de granos almacenados, se ve inhibido a temperaturas mayores de 20°C (Ackermann, 1998; Cantalejo *et al.*, 1998; Pan de la Guerra 2000; Carrillo 2003).

Algunos autores consideran que cuando no se aíslan géneros clasificados como de almacenamiento, pero que, en su lugar se aíslan altos porcentajes de hongos de campo, es un indicio de que los granos han sido cosechados recientemente o que han sido almacenados bajo buenas condiciones (Ackermann, 1998; Muir & White, 2004); por ejemplo, al almacenar el grano con un contenido de humedad mayor al recomendado, el género *Alternaria* spp.

comenzará a desaparecer y los hongos que se desarrollan durante el almacenamiento comenzarán a incrementarse (Christensen & Kaufmann, 1969).

Aspergillus spp. y *Penicillium* spp. representan un mayor riesgo en productos ya almacenados, y se ha concluido que estos hongos pueden contaminar el grano durante o después de la cosecha, puesto que los conidios de estos hongos están presentes comúnmente en el aire aunque el género *Aspergillus* spp. crece y se desarrolla rápido a temperaturas cercanas a los 30°C y el género *Penicillium* spp. es abundante principalmente en granos con alto contenido de humedad, almacenados a bajas temperaturas (Pan de la Guerra, 2000; Akar *et al.*, 2003).

Haasum & Nielsen (1998) reportan que los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* se ven afectados por concentraciones de CO₂ cercanas a 20% (con excepción de *P. roqueforti*), igualmente señalan que si bien *Fusarium* se ve afectado por el CO₂, la mayoría de las especies de este género, son más resistentes a concentraciones altas de CO₂ que los géneros anteriores, en otro punto se menciona que el género *Alternaria* se ve inhibido por concentraciones de CO₂ de hasta 15%, pero un posterior aumento en la concentración del gas parece estimular su desarrollo; lo que explicaría el comportamiento de estos géneros durante el almacenamiento, debido a que una elevada cantidad de levaduras pueden producir CO₂ suficiente para poder inhibir el desarrollo de otros organismos.

5.3.4. COMPARACIÓN DE RESULTADOS EN LAS DIFERENTES ETAPAS

En el transcurso del estudio se aislaron colonias de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* los cuales son los géneros potencialmente toxigénicos más importantes a nivel mundial (Fernández, 2000; Adebajo & Popoola, 2003; Carrillo, 2003). En las fotos 1-8, se pueden observar las imágenes macroscópicas y microscópicas representativas de los géneros potencialmente toxigénicos aislados en las diferentes etapas del presente estudio.

Foto 1. Colonias de *Alternaria* spp. después de 5 días de incubación en agar EM, a 25°C, aisladas en la etapa ALM5

1



Foto 2. Microfotografía de conidios de una cepa de *Alternaria* spp. aislada en la etapa ALM5. 1800 magnificaciones

2

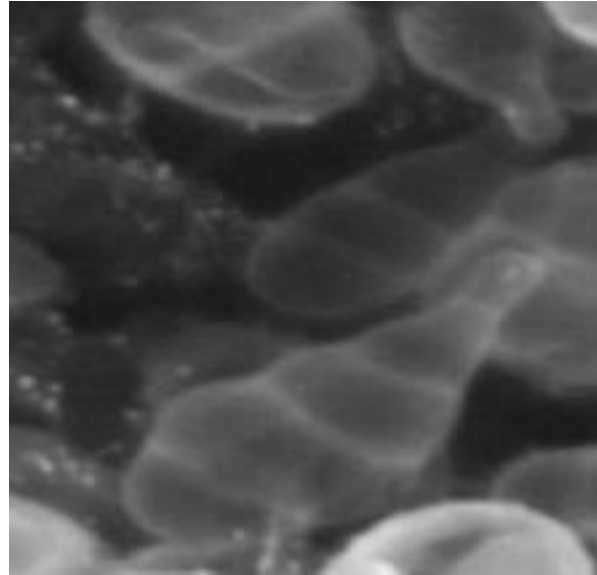


Foto 3. Colonias de *Aspergillus* spp. después de 7 días de incubación en agar EM a 25°C, aisladas en la etapa CO

3



Foto 4. Microfotografía de un conidióforo de una cepa de *Aspergillus* spp. aislada en la etapa CO. 500 magnificaciones

4

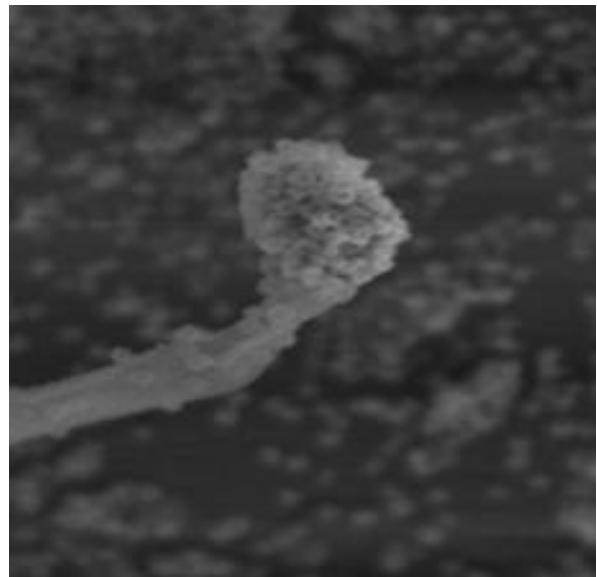


Foto 5. Colonias de *Fusarium* spp. después de 5 días de incubación en agar EM, a 25°C, aisladas en la etapa ALM3

5



Foto 6. Microfotografía de conidios de una cepa de *Fusarium* spp. aislada en la etapa ALM3. 5000 magnificaciones

6

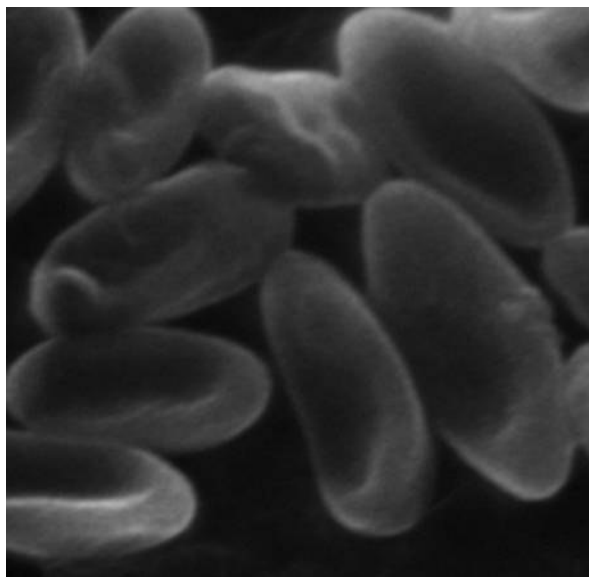


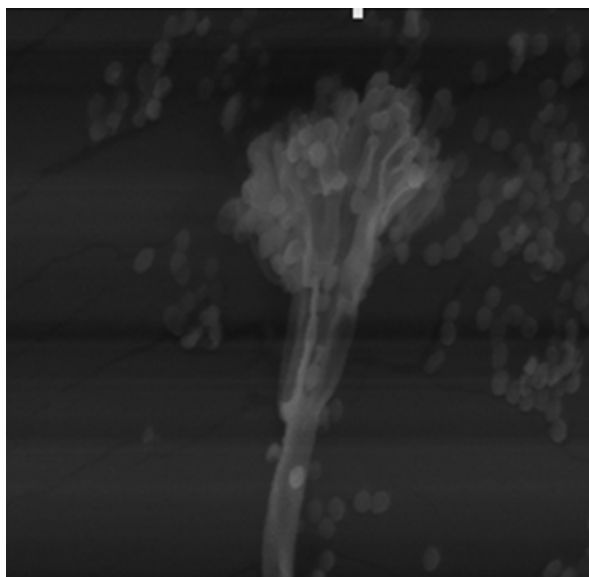
Foto 7. Colonias de *Penicillium* spp. después de 5 días de incubación en agar EM a 25°C, aisladas en la etapa PC

7



Foto 8. Microfotografía de un conidióforo de una cepa de *Penicillium* spp. aislada en la etapa PC. 600 magnificaciones

8



Los géneros que predominaron en las muestras PC, fueron *Alternaria* spp. (60%) y *Penicillium* spp. (50%), siendo el género *Fusarium* spp. el que mostró una frecuencia baja (20%), observándose una total ausencia del género *Aspergillus* spp. En las muestras CO el género *Fusarium* spp. mostró una alta frecuencia de aislamiento (70%), seguido del género *Alternaria* spp. (60%), el cual no mostró variación alguna en su frecuencia con respecto a la etapa anterior, el género *Penicillium* spp. registró una frecuencia baja (30%), al igual que el género *Aspergillus* spp. (20%). En las muestras ALM3 el género *Fusarium* spp. aumentó su frecuencia (100%), al contrario del género *Alternaria* spp. que mostró una disminución en la misma (40%), *Aspergillus* spp. continuó con la misma frecuencia que la etapa anterior (20%) y *Penicillium* spp. disminuyó de forma crítica (10%). En las muestras ALM5 sólo se aislaron los géneros toxigénicos *Fusarium* spp. (100%) y *Alternaria* spp. (50%).

Con relación a la cantidad de géneros potencialmente toxigénicos que se presentaron en cada etapa de recolección, las muestras CO y ALM3 fueron donde se registró la mayor cantidad de los mismos (*Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, y *Penicillium*) lo que corrobora la importancia del recuento total como parámetro de calidad sanitaria de los granos. Las muestras PC presentaron una menor cantidad de dichos géneros (*Alternaria*, *Fusarium* y *Penicillium*) siendo ésta la etapa en la que el control de la contaminación por mohos es más complicado. En las muestras ALM5 se aisló la menor cantidad de géneros potencialmente toxigénicos (*Alternaria* y *Fusarium*), quizás debido a la competencia entre la micoflora presente.

En las figuras 28, 29, 30 y 31 se muestran las medias de los valores de los recuentos para los géneros *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. respectivamente, aislados en cada etapa de recolección. Para determinar si estos resultados diferían significativamente se realizó un ANOVA entre las diferentes etapas. Se observaron diferencias significativas para al menos una de las medias sólo para el género *Alternaria* spp. El análisis de Tukey (sig. 0.05) indicó que los valores de los recuentos de *Alternaria* spp. son significativamente superiores en la etapa PC.

Figura 28. Promedio de los recuentos de *Alternaria* en cada etapa

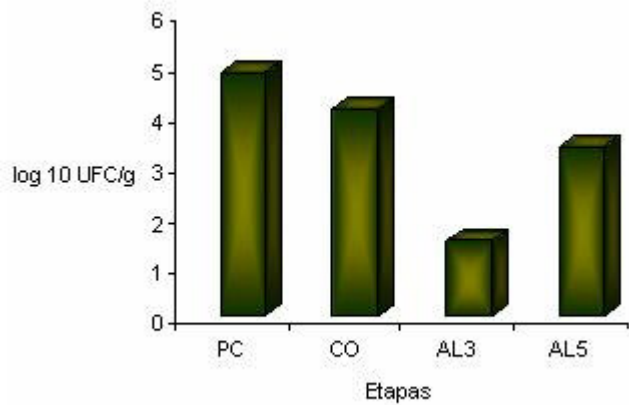


Figura 29. Promedio de los recuentos de *Aspergillus* en cada etapa

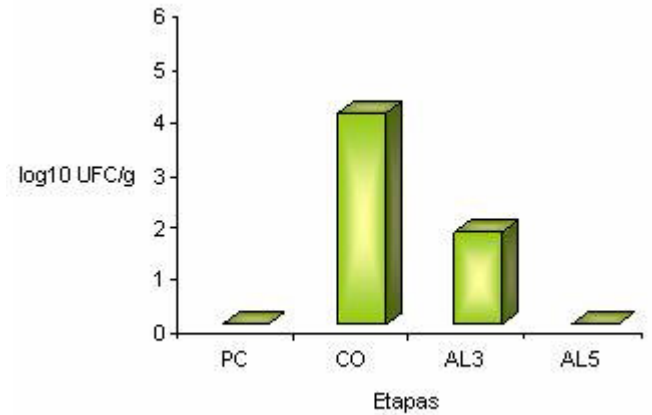


Figura 30. Promedio de los recuentos de *Fusarium* en cada etapa

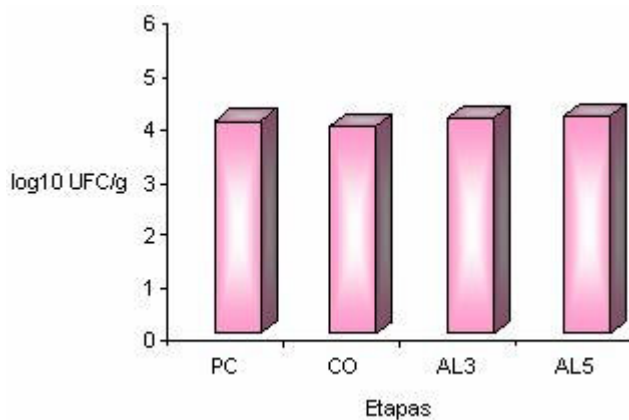
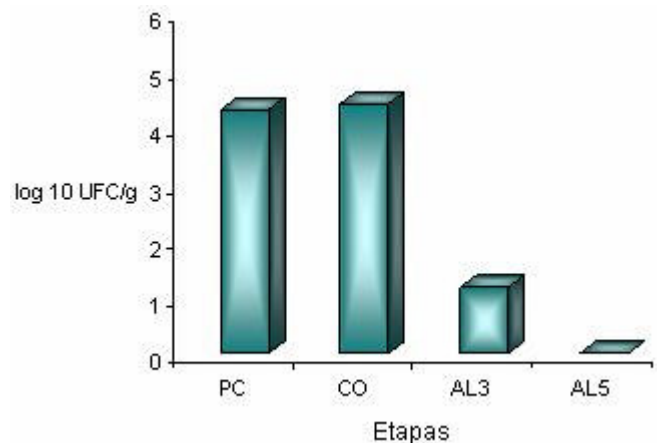


Figura 31. Promedio de los recuentos de *Penicillium* en cada etapa



La contaminación de los alimentos (tanto para consumo humano como animal) por mohos, siempre es indeseable, ya que la presencia de géneros fúngicos potencialmente toxigénicos, independientemente del nivel, siempre puede causar problemas de toxicidad debidos a la presencia de micotoxinas (Sharma *et al.*, 1980; Karunaratne & Bullerman, 1990).

5.4. CONTENIDO DE AFLATOXINAS TOTALES

El límite de detección del método inmunoenzimático utilizado para la cuantificación de las aflatoxinas totales presentes en las muestras es < 1.7 ppb.

El contenido de aflatoxinas totales de las muestras PC no excedió la cantidad de 1.7 ppb (Coef. Corr.= 0.9916). En las muestras CO, el rango de valores oscilaba de 2.4 ppb a 7 ppb (Coef. Corr.=0.9962), siendo la muestra más contaminada la correspondiente a la muestra obtenida del productor 10, con 7 ppb, y las muestras menos contaminadas le pertenecían a los productores 4 y 7, con 2.4 ppb cada una. En el cuadro 9 se muestra la concentración de aflatoxinas totales (ppb) que se detectó en cada productor en esta etapa.

Cuadro 9. Concentración de aflatoxinas en las muestras CO

Productor	Concentración de aflatoxinas (ppb)
1	3.6
2	3.2
3	3.9
4	2.4
5	2.8
6	4.1
7	2.4
8	2.9
9	6.3
10	7.0

Los recuentos del género *Aspergillus* en éstas muestras se encontraron en niveles de 10^3 a 10^5 UFC/g, se ha reportado que la cantidad de inóculo puede afectar la biosíntesis de aflatoxinas, con grandes poblaciones se reducen las posibilidades de producción de toxinas por falta de nutrientes, ocurriendo una máxima producción de aflatoxinas en sustratos con una carga de 10^3 UFC/g, sin embargo también se reporta que las cepas de *Aspergillus* no aflatoxigénicas pueden competir con el hongo productor de aflatoxinas por el sustrato necesario para la

síntesis de dichos metabolitos, o crear condiciones no favorables para la producción de los mismos (Moreno, 2004).

El contenido de aflatoxinas en las muestras analizadas en el presente estudio fue bajo, coincidiendo con algunos autores (Smith & Moss, 1985; Pan de la Guerra, 2000) que consideran a la cebada como un cultivo poco susceptible a la contaminación por aflatoxinas.

Diversos autores coinciden en que las aflatoxinas pueden ser producidas antes de la cosecha del grano así como en operaciones post-cosecha, debido al crecimiento de mohos del género *Aspergillus* spp., cuando las condiciones ambientales se caracterizan por un estrés en el contenido de humedad del suelo y con temperaturas elevadas, aunque generalmente las aflatoxinas se presentan en países con zonas de climas tropicales (Webley & Jackson, 1998; Bankole & Adebajo, 2003).

Sin duda alguna, las aflatoxinas son las micotoxinas que han sido más profundamente estudiadas en todo el mundo (Abarca *et al.*, 2000; Robledo *et al.*, 2001) y de todas las existentes, son las únicas cuya presencia en cereales está regulada en nuestro país. En nuestro estudio investigamos la cantidad de aflatoxinas totales en granos de cebada y aunque mayores cantidades de aflatoxinas fueron detectadas en las muestras recolectadas durante la cosecha, la concentración en realidad fue varias veces más baja que el nivel máximo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002 (Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal) que es de 20 ppb de aflatoxinas totales en cereales, utilizados para elaboración de productos para consumo humano. Aunque los niveles de aflatoxinas encontrados en las muestras de cebada analizadas fueron bajos, se ha comprobado que la ingesta repetida de pequeñas cantidades de estas toxinas disminuye la producción y aumenta la mortalidad de los animales, por lo que representa un serio problema para la industria avícola y ganadera. Al mismo tiempo, es de sobra conocido, el hecho de que la contaminación de los piensos por aflatoxinas, puede resultar en la presencia de residuos de las mismas o sus metabolitos, en productos tales como carne (ave, cerdo, vacuno, etc.), leche y huevos, con el consiguiente riesgo para la salud humana que esto representa (Jaimez, 2001).

5.5. CAPACIDAD AFLATOXIGÉNICA EN MEDIO DE CULTIVO

En condiciones óptimas, *A. flavus* produce al cabo de 15 días, unos 300 ng de aflatoxinas por mL de medio YES a 30°C (Carrillo, 2003).

En total se aislaron 14 cepas pertenecientes al género *Aspergillus* spp. (Cuadro 10).

Cuadro 10. Cepas aisladas de *Aspergillus*, etapa en la que se obtuvieron y productor al que pertenecen

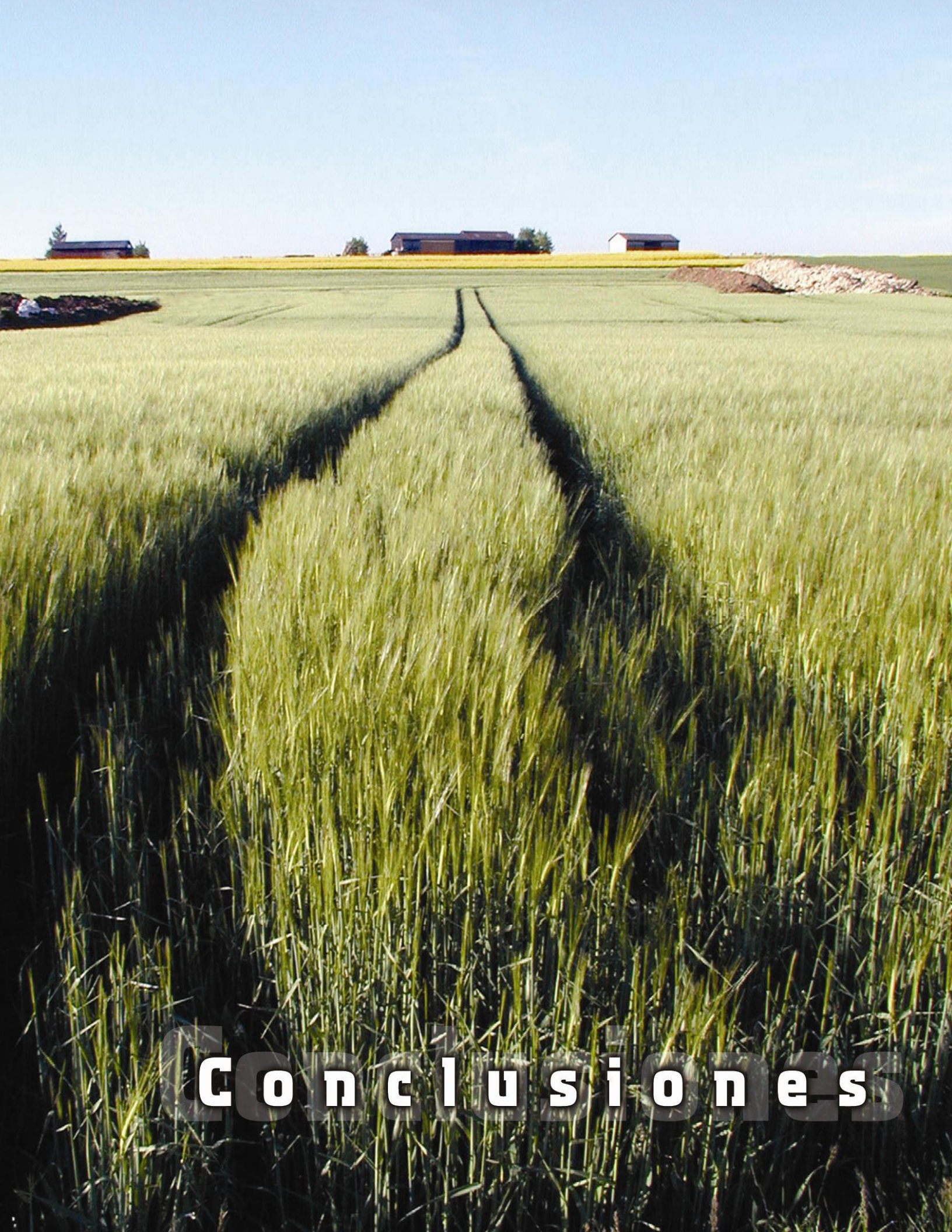
Etapa	Productor	Cepas aisladas
Cosecha	1	10
Cosecha	5	2
3 meses de almacenamiento	6	1
5 meses de almacenamiento	7	1

Las cepas del género *Aspergillus* spp. aisladas, se sembraron en medio YES y después de 7-10 días de incubación, ninguna presentó un halo fluorescente brillante característico que es indicativo de la presencia de aflatoxinas, lo que nos indicó que estas cepas no son aflatoxigénicas, en medio de cultivo.

Generalmente la producción de micotoxinas no ocurre sin el crecimiento del moho productor. Además, la presencia de hongos micotoxigénicos en determinado producto no indica automáticamente la presencia de micotoxinas, sin embargo, cuando las toxinas están presentes éstas pueden persistir mucho después de que el crecimiento vegetativo haya ocurrido y los mohos hayan muerto (Bullerman *et al.*, 1984).

Nuestros resultados indican que el tiempo que permaneció la cebada en el campo (aproximadamente 1 mes), desde la etapa de precosecha hasta la fase de recolección fue suficiente para que especies toxigénicas del género *Aspergillus* spp. consiguieran aumentar la cantidad de aflatoxinas, aunque no sobrevivieron hasta la cosecha.

Dentro de una especie considerada potencialmente toxigénica, el porcentaje de cepas productoras puede ser muy distinto, algunos autores indican que aproximadamente el 40% de los aislamientos son aflatoxigénicos. Sin embargo, en la mayoría de los estudios realizados en España con la finalidad de determinar la capacidad aflatoxigénica, en medio de cultivo, de algunas especies de *Aspergillus* spp., el porcentaje de cepas productoras de aflatoxinas fue inferior al 15% (Abarca *et al.*, 2000). Por otro lado, en un estudio realizado en Egipto, Abdel-Mallek *et al.* (1993) reportaron que el porcentaje de cepas del género *Aspergillus* spp. capaces de producir toxinas, fue de 67%, mientras que Jay (2002), en concordancia con nosotros, refiere que de un total de 25 aislamientos de *A. flavus* y *A. parasiticus*, ninguno produjo aflatoxinas en ocho días que duró la prueba e indica que, evidentemente puede haber crecimiento del moho sin producción de aflatoxinas.



Conclusiones



6. CONCLUSIONES

Las condiciones de cultivo y almacenamiento de los granos de cebada de los productores del Municipio de Tlanalapa durante el periodo de estudio, fueron propicias para el crecimiento y desarrollo de mohos y levaduras, entre ellos, hongos de géneros potencialmente toxigénicos.

Todas las muestras analizadas en las diferentes etapas estudiadas presentaron recuentos elevados tanto de mohos como de levaduras, lo que refleja una mala calidad sanitaria.

La micoflora de la cebada analizada estuvo integrada por quince géneros fúngicos, incluidos géneros potencialmente toxigénicos (*Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp.) y deteriorantes de alimentos (*Cladosporium* spp., *Ulocladium* spp. y *Rhizopus* spp.), siendo los géneros predominantes *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. y *Cladosporium* spp.

Los niveles de aflatoxinas encontrados estuvieron por debajo del límite que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002; sin embargo, se ha comprobado que la ingesta repetida de bajos niveles de las mismas, pueden afectar la salud de humanos y animales haciéndolos más susceptibles a las enfermedades infecciosas.

No parece existir una correlación entre la presencia de cepas de *Aspergillus* spp. y la presencia de aflatoxinas en las muestras analizadas.

Durante el periodo de almacenamiento, ocurrió un cambio drástico en la micoflora contaminante de los granos de cebada, ya que la población de mohos disminuyó significativamente mientras que la de levaduras aumentó notablemente, además, de imprevisto, los mohos de campo prevalecieron sobre los hongos de almacenamiento.

El perfil de micotoxinas que podría surgir de los géneros potencialmente toxigénicos aislados es muy amplio, la presencia de micotoxinas tales como el ácido tenuazónico, desoxinivalenol, toxina T-2, zearalenona, aflatoxinas y ocratoxinas, entre otras, podrían llegar a ser importantes en los granos de cebada, con el consiguiente riesgo sanitario que esto representa para la salud humana y animal.



Perspectivas



7. PERSPECTIVAS

Sería recomendable conocer la calidad micológica de cebada de otras regiones para poder relacionarla con factores como el clima, época de cosecha, sistema de cultivo empleado, condiciones de almacenamiento, etc.

Debido a la alta incidencia de los géneros toxigénicos *Alternaria* spp. y *Fusarium* spp. en las muestras analizadas, sería pertinente efectuar un estudio para determinar la presencia de las micotoxinas que producen, en granos de cebada.

Sería recomendable asesorar a los productores de cebada acerca de las condiciones de almacenamiento que favorecen el desarrollo de mohos y levaduras para que en la medida de lo posible se prevenga su crecimiento y por consiguiente, la formación de micotoxinas en los mismos.

Resultaría interesante realizar un monitoreo continuo de la calidad sanitaria de cereales cultivados en el estado de Hidalgo así como estudiar la presencia de micotoxinas en productos derivados de cereales contaminados.



Bibliografía



8. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca M. L.** (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la aspergillosis nosocomial. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: 79-84.
- Abarca M. L.; Bragulat M. R.; Castellá G. & Cabañes F. J.** (1994). Mycoflora and aflatoxin-producing strains in animal mixed feeds. *J. Food Protect.* 57:256-258.
- Abarca M. L.; Bragulat M. R.; Castella G.; Accensi F. y Cabañes F. J.** (2000). Hongos productores de micotoxinas emergentes. *Rev. Iberoam. Micol.* 17: 63-68.
- Abbott S. P.** (2002). Molds and other fungi in indoor environments: summary of biology, known health effects and references. AkaMOLDLAB.
- Abdel Hameed A. A. & Khoder M. I.** (2001). Suspended particulates and bioaerosols emitted from an agricultural nonpoint source. *J. Environ. Mon.* 3: 206-209.
- Abdel-Kader M. I. A.; Moubasher A. H. & Abdel-Hafez S.I.I.** (1979). Survey of the mycoflora of barley grains in Egypt. *Mycopathologia.* 69 (3): 143-147.
- Abdel-Mallek A. Y.; El-Maraghy S. S. M. & Hasan H. A. H.** (1993). Mycotoxin-Producing potential of some *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* isolates found on corn grains and sunflower seeds in Egypt. *Journal of Islamic Academy of Sciences.* 6(3): 167-180.
- Ackermann A.** (1998). Mycoflora of South African barley and malt. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56 (4): 169-176.
- Adams M. R. & Moss M. O.** (2000). Non-bacterial Agents of Foodborne Illness. *Food microbiology.* 2nd Edition. RSC Royal Society Chemistry. London, pp. 285-287.
- Adebajo L. O. & Popoola O. J.** (2003). Mycoflora and mycotoxins in kolanuts during storage. *African Journal of Biotechnology.* 2(10): 365-368.
- Akar T.; Avci M. & Dusunceli F.** (2003). Barley: Post-Harvest Operations. The Central Research Institute for Field Crops. Ankara, Turkey. Edited by AGST/ FAO: Mejía D.
- Alexopoulos C. J., Mims C. W. & Blackwell M.** (1996). Introductory mycology. 4th edition. John Wiley & sons. Inc. pp. 62, 214.
- Alvarez B. M.; Carvajal M. M.; Ruisanchez P. N. y Rojo F.** (2000). Aductos-ADN-Aflatoxina como biomarcadores de exposición en grupos de riesgo de cáncer de hígado. *Rev. Cubana Oncol.* 16(1): 35-39.
- Antón A. y Lisazo J.** (2001). Hongos y micotoxinas. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Tres Cantos (Madrid).
- Aran N. & Eke D.** (1987). Mould mycoflora of some Turkish cereals and cereal products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 3(3):281-287.
- Baliukoniene V.; Bakutis B. & Stankevicius H.** (2003). Mycological and mycotoxicological evaluation of grain. *Ann. Agric. Environ. Med.* 10:223-227.
- Bankole S. A. & Adebajo A.** (2003). Micotoxins in foods on West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *African Journal of Biotechnology.* 2(9): 254-263.
- Bauduret P.** (1990). A mycological and bacteriological survey on feed ingredients and mixed poultry feed in Reunion Island. *Mycopathologia,* 109: 157-164.
- Bennett J. W. & Klich M.** (2003). Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(3): 497-516.
- Berenger J. S.** (2000). Hongos en microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Diaz de Santos (editorial), 2a Edición. pp. 100, 101. Citado por Jaimez, 2001.
- Bold H.; Alexopoulos C. J. y Delevoryas T.** (1988). Morfología de las plantas y hongos. Introducción al reino de los hongos. 1ª edición. Ediciones Omega. Barcelona. pp. 699-704, 790-794.
- Bullerman L.; Shroeder L. & Park K. Y.** (1984). Formation and control of mycotoxin in food. *J. Food Prot.* 47:637-643. Citado por Jaimez, 2001.
- Cantalejo M. J.; Carrasco J. M. & Hernández E.** (1998). Incidence and distribution of *Fusarium* species associated with feeds and seeds from Spain. *Rev. Iberoam. Micol.* 15:36-39.
- Carrillo L.** (2003). Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. pp. 25-50.

- Cassel E. K.; Campbell B.; Draper M. & Epperson B.** (2001). Aflatoxins. Hazards in grain. Aflatoxicosis and livestock. Cooperative Extension Service. South Dakota State University/ College of Agriculture & Biological Sciences/USDA. FS 907.
- Castellá G.; Bragulat M. R. & Cabañes F. J.** (1996). Mycoflora and fumonisins-producing strains of *Fusarium moniliforme* in mixed poultry feeds and component raw material. *Mycopathologia*, 133: 181-184.
- Castellá G.; Bragulat M. R. & Cabañes F. J.** (1999). Surveillance of fumonisins in maize-based feed and cereals from Spain. *J. Agr. Food Chem.* 47: 4707-4710.
- Chelkowski J.** (1991). Mycological quality of mixed feed and ingredients. En: *Cereal grain. Mycotoxins, fungi and quality in drying and storage.* Ed: Chelkowski J. Elsevier, Amsterdam. pp: 217-227.
- Chong L. M. & Sheridan J. E.** (1982). Mycoflora of barley (*Hordeum vulgare* L.) seed in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany.* 20: 187-189.
- Christensen C. & Kaufmann H. H.** (1969). *Grain Storage: The role of fungi in quality loss.* University of Minnesota Press, Minneapolis. pp. 17-21.
- Chu F. S.** (2002). Mycotoxins. In: Cliver D. & Riemann H. P. *Foodborne Diseases.* 2nd Edition. Academic Press. Barcelona, Spain pp. 271-301.
- Chu F. S.; Chang C. C.; Ashoor S. & Prentice N.** (1975). Stability of aflatoxin B1 and Ochratoxin A in brewin. *Applied Microbiology.* 29 (3): 313-316.
- CEIEGDRUS.** (2004). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola del Estado de Hidalgo. SAGARPA-SIAPSAGEH. Pachuca, Hgo. México.
- Constantine J. A.** (1979). *Introducción a la micología.* Editorial Universitaria de Buenos Aires. 3^a edición. Buenos Aires, Argentina. pp. 8-15, 278-290.
- Cullen J. M. & Newberne P. M.** (1993). en: Eaton D. L. and Groopman J. D.; Eds., *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance* (Academic Press, London). pp. 1-26
- Czerwiecki L.; Czajkowska D. & Witkowska-Gwiazdowska A.** (2002). On ochratoxin A and fungal flora in polish cereals from conventional and ecological farms. Part 2: Occurrence of ochratoxin A and fungi in cereals in 1998. *Foods Additives and Contaminants.* 19 (11): 1051-1057.
- Davis N. D.; Diener U. L. & Eldridge D. W.** (1966). Production of aflatoxins B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. *Applied Microbiology.* 14 (3):378-380.
- De la Cruz M. F.** (2002). Incidencia de hongos en semillas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) provenientes de tres sistemas de labranza en los llanos de Apan, Hgo. Tesis Profesional, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 44-60.
- Deacon J. W.** (1997). *Modern Mycology.* 3rd edition. Blackwell Science. Edininburgh. pp. 58-80, 128-150, 200-216.
- Dohlman E.** (2003). Mycotoxins hazards and regulations. Impacts on food and animal feed crop trade. In: Buzby J. (Ed.) *International trade and food safety: economic theory and case studies.* USDA. Econ. Res. Serv., AER-828. pp. 97-108.
- El-Kady I. A.; Abdel-Hafez S. I. I. & El-Maraghy S. S.** (1982). Contribution to the fungal flora of cereal grains in Egypt. *Mycopathologia.* 77 (2): 103-109.
- Fernández E. E.** (2000). *Microbiología e inocuidad de los alimentos.* Universidad Autónoma de Querétaro. 1^a Edición. pp. 65-89, 123-138.
- Ferris J.; García J.; Berbel O. y Clar S.** (2001). Micotoxinas y Cáncer Pediátrico. *Rev. Esp. Pediatr.* 57 (3):279-280.
- Flannigan B.** (1970). Comparison of seed-borne mycofloras of barley, oats and wheat. *Trans. Br. Mycol. Soc.;* 55(2):267-76.
- Flannigan B. & Healy R. E.** (1983). The mycoflora of barleys accepted and rejected for malting. *Journal of the Institute of Brewing,* 89: 341-343.
- Follstad M. N. & Christensen C. M.** (1962). Microflora of barley kernels. *Scientific Journal Series, Department of Plant Pathology, University of Minnesota.* 10: 331-336.
- Frazier W. y Westhoff D.** (2000). *Microbiología de los Alimentos* Acribia. 4^a edición. Zaragoza, España. pp. 15-178.
- Freitas L. L. & Scussel V. M.** (2002). Toxigenic fungi in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) classes black and color cultivated in the state of Santa Catarina, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 33: 47-59.
- Ghelfa G.** (1996). Micobiota de granos de cebada y de malta. Especies fúngicas potencialmente micotoxigénicas y relacionadas con el gushing de la cerveza. Trabajo especial de la Licenciatura en Bioquímica, Uruguay. pp. 14-21.
- Gimeno A. y Martins M. L.** (2003). Análisis de Riesgos de las más relevantes Micotoxinas en humanos. I Symposium panamericano de Micotoxinas para la Industria, México D.F.
- Griffin D. H.** (1994). *Fungal Physiology.* 2nd edition. Wiley-Liss. New York. pp. 115-160, 178-203.

- Guzmán G.** (1981). Hongos ¿ que es un hongo?. Editorial Limusa. 2a Edición. México. pp. 3.
- Haasum I. & Nielsen P. V.** (1998). Ecophysiological characterization of common food-borne fungi in relation to pH and water activity under various atmospheric compositions. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 451-460.
- Harbison R. D.; Stedeford T.; Banasik M. & Muro-Cacho C. A.** (2004). Toxicology and risk assessment of mycotoxins. *Journal of Land Use*. 19 (2): 451-457.
- Henriksen B. & Elen O.** (2005). Natural *Fusarium* grain infection level in wheat, barley and oat early application of fungicides and herbicides. *J. Phytopathology*. 153: 214:220.
- Henry S. H.; Bosch F. X.; Troxell T. C. & Bolger P. M.** (1999). Reducing Liver Cancer. Global Control of Aflatoxin. *Science*. 286: 1126-1132.
- Herrera T. y Ulloa M.** (1998). El reino de los hongos, micología básica y aplicada. 2ª edición. México. D.F. pp.137-149.
- Hoffman P. C. & Combs D. K.** (2004). Molds and mycotoxins in corn silage and high moisture corn. Managing for aerobic stability. University of Wisconsin-Madison, Dairy Science Department.
- Hua S. S. T.** (2002). Potential use of saprophytic yeast to control *Aspergillus flavus* in almond and pistachio orchards. III International Symposium on Pistachos and Almonds. Acta Horticulture, No. 591. International Society for Horticultural Science. Lauven, Belgium.
- Hua S. S. T.** (2004). Field assessment of an effective yeast strain to control aflatoxin-producing fungus, *Aspergillus flavus*. California Conference on Biological Control IV. Berkeley, California.
- Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI).** (2005). Sistemas Nacionales Estadísticos y de Información Geográfica.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)** (1997). Guía para cultivar cebada maltera de temporal en el Estado de Hidalgo. Centro de Investigación regional del Centro, Pachuca. Folleto para productores no. 8.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)** (2004). Impacto económico y potencial del uso de bajas densidades de siembra en cebada maltera de temporal en el altiplano hidalguense. Centro de Investigación regional del Centro, Pachuca. Folleto técnico no. 3.
- International Agency for Research on Cancer (IARC).** (1987). Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1-42. Report of an IARC Expert Committee. Lyon, France: suppl 7.
- International Agency for Research on Cancer (IARC).** (1993). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon, France: 56
- International Association for Cereal Science and Technology (ICC).** (1980). Determination of the fungus germ count (plate count methods) in cereals, cereals products, and animal feed. General Principles of the available ICC Standards Methods. ICC standard No. 134
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF).** (1980). Ecología microbiana de los alimentos. Volumen 2. Cereales y sus productos derivados. Editorial Acribia S.A. 1ª edición. Zaragoza, España. pp. 679-738.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF).** (2001). Microorganismos de los alimentos. Ecología microbiana de los productos alimentarios. Cereales y derivados. Editorial Acribia. S.A. 1ª edición. Zaragoza, España. pp. 293-311.
- Isaac S.** (1992). Fungal-plant interactions. Chapman & Hall. 1ª Edition. New York. pp. 8-10, 26-57, 43-78.
- Jaimez O. J.** (2001). Contribución al estudio de micotoxinas en alimentos. Desarrollo de nuevas técnicas de análisis. Tesis para optar el grado de Doctor. Área de Nutrición y Bromatología. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria, Campus Lugo. Universidad de Santiago de Compostela, España. pp. 30-70.
- Jay J. M.** (2002). Microbiología moderna de los alimentos. Micotoxinas. Editorial Acribia. 4a Edición. Zaragoza, España. Pp. 561-575.
- Jayas D. S.** (1995). Stored-grain Ecosystems. New York. Cited by Zvicevicius *et al*, 2005.
- Karunaratne A. & Bullerman L. B.** (1990). Interactive effects of spore bad and temperature on aflatoxin production. *J. Food Prot* 53: 227-229. Citado por: Jaimez O. J. (2001).
- Kotheimer J. B. & Christensen C. M.** (1961). Microflora of barley kernels. Wallerstein Labs. *Communs*. 24: 21-28.
- Kristensen E. F. & Elmholt S.** (2002). High-temperature drying of organically grown bread rye. *EurAgEng*. Budapest. 02-PH-016.
- Krysinska E.; Kiecana I.; Perkoski J. & Dutkiewicz J.** (2001). Levels of fungi and mycotoxins in samples of grain dust collected on farms in Eastern Poland. *Ann Agric Environ Med*. 8: 269-274.
- Lacey J.** (1989). Pre and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology*, Symposium Supplement 1989, pp. 11s-25s.
- Lacey J.; Ramakrishna N.; Hamer A.; Magan N. & Marfleet I. C.** (1991). Grain fungi. En: *Handbook of Applied Mycology*, Vol. 3: Food and Feeds, (ed. D. K. Arora, K. G. Mukerji and E. H. Marth), Marcel Dekker, Inc., p. 121-177.

- Laitila A.; Wilhelmson A.; Kotaviita E.; Olkku J.; Home S. & Juvonen R.** (2005). Yeast diversity in malting process. VTT Biotechnology.
- Lee U.; Jang H.; Tanaka T.; Toyasaki N.; Sugiura Y.; Oh Y.; Cho C. & Ueno Y.** (1986). Mycological survey of Korean cereals and production of mycotoxins by *Fusarium* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 52: 1258-1260.
- Löiveke. H.** (2004^a). *Fusarium* spp. As an important problem in cereal production in Estonia. Latvian Journal of Agronomy. 7: 84-88. Epidemiology Facets of Harmful Organisms Cropping Systems Issue of the International Conference. Jelgava, Latvia.
- Löiveke. H.** (2004^b). The effect of fungicides on the microflora of grains. Latvian Journal of Agronomy. 7: 115-118. Epidemiology Facets of Harmful Organisms Cropping Systems Issue of the International Conference. Jelgava, Latvia.
- Löiveke H.; Ilumae E. & Laitamm H.** (2004). Microfungi in grain feeds and their potential toxicity. Agronomy Research. 2(2): 195-205.
- López B. L.** (1991). Cebada. Cereales. Cultivos herbáceos. Ediciones Mundi-Prensa. 1a Edición. Madrid. Vol. 1 pp. 246-249.
- Lowe D. P. & Arendt E. K.** (2004). The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: a review. The Institute & Guild of Brewing. 10(3):163-180.
- Manhanna, W.C.** (1991). Silage fermentation and additive use in North America. NFIA (Feed Ingredient Institute).
- Marchand C. R.** (2003). La fusariosis de la espiga de la cebada: especies, distribución, daños, toxinas y perspectivas de manejo en los Valles Altos de México. Tesis para obtener el grado de Maestría. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 18-69.
- Martínez E. B.** (2003). Estudio de especies micotoxigénicas del género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum* Dierckx. Tesis para optar el grado de Doctor. Departament de Sanitat i d' Anatomia Animals. Facultat de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona. pp. 126-159.
- Mitakakis T. Z.; Clift A. & Mcgee P. A.** (2001). The effect of local cropping activities and weather on the airborne concentration of allergenic *Alternaria* spores in rural Australia. Granada. 40(4-5): 230-239.
- Molina J. L.** (1989). Taxonomía, citología, origen filogenético En: Molina J. L.; García L. F.; Ramos J.M.; Hassan S. & Brufau J. La cebada. Ediciones Mundi-Prensa. Coedición Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación. Madrid, España pp. 20-23.
- Moreno L. J.** (2004). Estudio comparativo de *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare en la producción de aflatoxinas bajo diferentes condiciones de humedad y temperatura. Tesis para obtener grado de Maestría. Facultad de Estudios superiores, Cuautitlan. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 25-76.
- Mossel D. y Moreno B.** (2003). Microbiología de los Alimentos. Acribia. Zaragoza, España. pp. 57-59.
- Muir W. E. & White N. D. G.** (2004). Microorganisms in stored grains. Grain Preservation Biosystems. University of Manitoba.
- Muro-Cacho C. A.; Stedeford T.; Banasik M.; Suchecki T. T. & Persad A.S.** (2004). Mycotoxins: Mechanisms of Toxicity and Methods of Detection for Identifying Exposed Individuals. Journal of Land Use 19 (2): 537-545.
- National Center for Food and Agricultural Policy (NCFAP).** (2002). Fungal resistant barley. Washington, DC.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994.** Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002.** Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.
- Olmos B. G.** (1998). El cultivo de la cebada maltera de temporal. Impulsora Agrícola, S.A. de C.V. pp. 5-10.
- Pan de la Guerra D.** (2000). Contaminantes Fúngicos y micotoxinas en granos de trigo. Tesis. Facultad de Ciencias, Universidad de la Republica de Montevideo, Uruguay. pp. 40-79.
- Peraica M.; Radic B. y Pavlovic M.** (1999). Efectos tóxicos de las Micotoxinas en el ser Humano. Bulletin of the WHO. 77 (9): 754-766.
- Pier A.C.; McLoughlin M. E.; Richard J. L.; Baetz A. & Dahfren R. R.** (1985). In utero transfer of aflatoxin and selected effects in neonatal pigs. In: Lacey J.; ed. Trichothecenes and other mycotoxins. New York pp. 495-506.
- Prado G.; Carabias R.; Rodríguez E. y Herrero E.** (2002). Presencia de residuos y contaminantes en leche humana. Rev. Esp. Salud Publica 76 (2): 133-147.
- Rabie C. J. & Lübben A.** (1993). The mycoflora of South African barley and barley malt. In: Proc. 4th Sci. Tech. Conv. Inst. Brew. Central S. Afr. Sect. pp. 25-36.
- Railiene M.; Raila A.; Zvicevicius E.; Steponaviciene A.; Lugauskas A.; Levinskaite L. & Raudoniene V.** (2005). Evaluation of the impact of grain processing technology upon distribution of toxic micromycetes. Botanica Lithuanica. 7: 105-113.
- Ramírez G. M.** (1984). Almacenamiento y conservación de granos y semillas. CIA. Editorial Continental, S.A. de C.V. 1^a Edición. México. pp. 36-67.
- Ray B.** (2001). Fundamental food microbiology. Foodborne intoxications. CRC press. 2nd edition. New York. pp. 330-331.

- Robledo M. L.; Marín S. y Ramos A. J.** (2001). Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). *Rev Iberoam Micol* 18: 141-144.
- Rodríguez-Tudela J. L. & Aviles P.** (1991). Improved adhesive method for microscopic examination of fungi in culture. *J.Clin. Microbiol.* 29:2604-2605.
- Romero B. S.** (2004). Hongos transmitidos por semilla de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en la región de Tolcayuca, Hgo. Tesis Profesional, Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 47-79.
- SAGARPA.** (2004). Información Estadística Documental de los Distritos de Desarrollo Rural de Pachuca y Tulancingo.
- Salas B.; Steffenson B. J.; Casper H. H.; Tacke B.; Prom L. K.; Fetch T. G. & Schwarz P.B.** (1999). *Fusarium* Species Pathogenic to Barley and their associated mycotoxins. *The American Phytopathological Society.* 83(7): 667-674.
- Samson R.A.; Hoekstra E.S.; Frisvad J. C. & Filtenborg O.** (2000). Introduction to Food and Airborne Fungi. Editorial CBS. 6th edition. Wageningen, The Netherlands. pp. 37-50, 128-160, 175-196.
- Saubois A. & Nepote M. C.** (1994). Aflatoxins in mixed feeds for rabbits. *Boletín micológico.* 9: 115-120.
- Semaskiene R.; Mankeviciene A.; Dabkevicius Z. & Leistrumaitė A.** (2005). Toxic fungi infection and mycotoxin level in organic grain. *Botanica Lituanica.* 7: 17-25.
- Sharma A.; Behere A. G.; Padwal-Desai S. R. & Nadkarni G. B.** (1980). Influence of inoculum size of *Aspergillus parasiticus* spores on aflatoxin production. *Appl. Microbiol.* 40: 989-993. Citado por: Jaimez O. J. (2001).
- Smith J.E. & Moss M.** (1985). *Mycotoxins. Formation, analysis and significance*, Wiley and Sons, U.K.
- Sutton J.C.** (1982). Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Plant Pathol.* 4: 195-209.
- Swanson B. G.** (1987). Mycotoxins on fruits and vegetables. *Acta Horticulturae* 207: 49-61.
- Tekauz A.** (1999). *Fusarium* head blight of barley: a palnt pathologist's perspective. *Canadian Barley Symposium.*
- The Commission of the European Communities.** (2002). Commission Regulation (EC) No 257/2002. *Official Journal of the European Communities* 41 :12-15.
- The Commission of the European Communities.** (1998). Commission Regulation (EC) No 1525/98. *Official Journal of the European Communities* 201 :43-46.
- Truckess M. W. & Maragos C. M.** (2001). Joint Mycotoxin Committee. Technical Committee Reports: *Journal of AOAC International.* 84 (1): 303-308.
- Ulloa M.** (1991). *Diccionario ilustrado de micología.* 1ª edición. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 158, 172, 188.
- USDA (United States Department of Agriculture).** (2002). Grain fungal diseases & mycotoxin reference. Grain Inspection, Packers and stockyards administration. Technical services division.
- Von Arx J. A.** (1981). *The genera of fungi sporulating in pure culture.* Cramer, J. (Editor), 3rd edition, Vaduz, Germany. pp. 67, 89, 106.
- Webley D. J. & Jackson K. L.** (1998). Mycotoxins in cereals. A comparasion between North America, Europe and Australia. *Australian Postharvest Conference.*
- www.cat.cc.md.us.**
- www.unex.es/**
- Webster J.** (1993). *Introduction to Fungi.* Cambridge University Press. 2nd Edition. New York, USA. pp 516-517.
- Williams J. H.; Phillips T. D.; Jolly P. E.; Stiles J. K.; Jolly C. M. & Aggarwal D.** (2004). Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 80: 1106-1122.
- Wilson D. M.; Payne G. A. & Groopman J.** (1994). en: Eaton D. and Groopman J.; Eds., *The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance* (Academic Press, San Diego) pp. 309-322.
- Wogan G. N.** (1966). Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriological Reviews.* American Society for Microbiology 30: 460-471.
- Young K. & Loughman R.** (2001). Fungal associations with weather stained barley in Western Australia. 10th Australian barley technical symposium. ABTS.
- Zvicevicius E.; Raila A.; Novosinskas H.; Krasauskas A.; Brazauskiene I. & Petraitiene E.** (2005). Influence of active ventilation on mycological contamination during grain drying. *Botanica Lithuanica.* 7:115-122.



A n e x o s



9. ANEXOS

ANEXO 1

MATERIAL DE USO GENERAL

Material de laboratorio

- Algodón y gasas
- Agitadores de vidrio y magnéticos
- Asas de Digralsky
- Asas de platino
- Bolsas estériles para Estomacher®
- Cajas petri de plástico, estériles (100 x 15 cm)
- Cinta adhesiva
- Embudos de filtración de plástico
- Espátulas
- Frascos de plástico oscuros con tapón
- Frascos de vidrio para esterilizar (SCHOTT DURAN®)
- Frascos goteros
- Gradillas
- Mecheros de Bunsen
- Micropipetas (GILSON® y BRAND®) y puntas de capacidad variable
- Papel aluminio
- Papel filtro (WHATMAN®)
- Papel parafinado (PARAFILM®)
- Picetas
- Pipetas Pasteur, pipetas aforadas, pipetas graduadas
- Probetas
- Portaobjetos
- Tubos de ensayo con tapón de rosca (PYREX®)
- Vasos de precipitados (PYREX®)
- Viales de plástico Eppendorf
- Vidrios de reloj

Aparatos

- Autoclave, modelo SM-200 (YAMATO®)
- Balanza analítica, modelo BP 2215 (SARTORIUS)
- Balanza granataria electrónica, modelo QT-2000 (ADAM EQUIPMENT)
- Campana de flujo laminar, modelo cfv-60 (LAB CONCO)
- Contador de colonias, modelo FE-500 (FELISA®)
- Espectrofotómetro lector de ELISA, modelo EL301 (MICROWELL)
- Incubadora, modelo imperial III (LAB-LINE INSTRUMENTS)
- Lámpara ultravioleta, modelo uvls-24 (ENTECLA)
- Microscopio óptico (LABOMED)
- Microscopio electrónico de barrido (JSM-6300, JEOL)
- Molino Micro-mill (BEL-ART PRODUCTS)
- Parrilla de calentamiento, modelo sp46925 (THERMOLYNE)
- Stomacher®, modelo 400 (SEWARD)
- Vortex genie-2, modelo G-560 (SCIENTIFIC INDUSTRIES)

ANEXO 2

MEDIOS DE CULTIVO, COLORANTE Y DILUYENTE

Medio de cultivo para el recuento de mohos y levaduras

-Agar de papa y dextrosa (APD)

Composición:

- ◆ Agar.....15.0 g
- ◆ Dextrosa.....20.0 g
- ◆ Infusión de papa.....4.0 g
- ◆ Agua destilada.....1000 mL

Preparación:

Se utilizó el agar papa dextrosa de DIBICO, con los ingredientes ya mezclados. Para rehidratar el medio se disuelven 39 gramos del polvo en un litro de agua, se esteriliza durante 15 minutos a 121°C, se deja enfriar y se distribuye en cajas de petri.

Medios de cultivo para el aislamiento de mohos

- Extracto de Malta (EM)

Composición:

- ◆ Agar.....15.0 g
- ◆ Extracto de malta.....30.0 g
- ◆ Peptona de harina de soya.....4.0 g
- ◆ Agua destilada.....1000 mL

Preparación:

Se utilizó el agar extracto de malta MERCK, con los ingredientes ya mezclados. Para rehidratar el medio se disuelven 48 gramos del polvo en un litro de agua hirviendo, se esteriliza durante 10 minutos a 121°C. Se deja enfriar y se distribuye en cajas de petri.

-Agar Czapek Dox (CZ)

Composición:

- ◆ Agar.....15.0 g
- ◆ Sacarosa.....30.0 g
- ◆ Nitrato de sodio.....3.0 g
- ◆ Fosfato Dipotásico.....1.0 g
- ◆ Sulfato de Magnesio.....0.5 g
- ◆ Cloruro de Potasio.....0.5 g
- ◆ Sulfato Ferroso.....0.01 g
- ◆ Agua destilada.....1000 mL

Preparación:

Se utilizó el agar Czapek Dox BD Bioxon, con los ingredientes ya mezclados. Para rehidratar el medio se disuelven 50 gramos del polvo en un litro de agua destilada hirviendo, se esteriliza durante 15 minutos a 121°C. Se deja enfriar y se distribuye en cajas de petri.

Medio de conservación en congelación

Composición:

- ◆ Leche desnatada en polvo (DIFCO).....20.0 g
- ◆ Triptona (DIFCO).....30.0 g
- ◆ Glicerina.....3.0 g
- ◆ Agua destilada.....320.0 mL

Preparación:

Se pesan los componentes, se disuelven en 320 mL de agua destilada, se esteriliza a 110°C durante 10 minutos, enfriando rápidamente abriendo la espita del autoclave. Se distribuye en viales Eppendorf estériles.

Medio de cultivo para la producción de micotoxinas**-Agar Extracto de Levadura (YES)****Composición:**

- ◆ Agar.....12.0 g
- ◆ Extracto de levadura.....3.0 g
- ◆ Triptona.....6.0 g
- ◆ Agua destilada.....1000 mL

Preparación:

Se pesan 21 gramos del medio, y se disuelven en un litro de agua destilada. Se calienta agitando hasta el punto de ebullición, durante un minuto. Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos. Vaciar en cajas petri.

DILUYENTE**-Solución Salina con Tween 80****Composición:**

- ◆ Cloruro de Sodio (MEYER).....12.0 g
- ◆ Twenn 80 (MERCK).....3.0 g
- ◆ Agua destilada.....100.0 mL

Preparación:

Se pesan los componentes, se mezclan y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos

COLORANTE**-Azul de metileno****Composición:**

- ◆ Azul de metileno (TÉCNICA QUÍMICA)....12.0 g
- ◆ Agua destilada.....3.0 g
- ◆ Etanol (TÉCNICA QUÍMICA)

Preparación:

Se pesa el colorante, se disuelve en unas gotas de alcohol etílico, posteriormente se añade el agua, en pequeños volúmenes, hasta la completa dilución del colorante.

ANEXO 3

MATERIAL PARA EL ANÁLISIS INMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Material y reactivos

Kit comercial RIDASCREEN® FAST Aflatoxin (R-BIOPHARM)

Contenido del kit:

- ◆ Placas con micropozos recubiertos con anticuerpos de captura
- ◆ Estándares de aflatoxinas con concentraciones de: 0 ppb, 1.7 ppb, 5 ppb, 15 ppb, 45 ppb
- ◆ Conjugado aflatoxina-peroxidasa
- ◆ Anticuerpo anti-aflatoxina
- ◆ Solución de sustrato/cromógeno
- ◆ Solución stop, ácido sulfúrico 1N

Metanol, grado analítico (TÉCNICA QUÍMICA)

Agua destilada

ANEXO 4.

NORMAS OFICIALES MEXICANAS

09-13-95 NORMA Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Materia Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud. JOSE MELJEM MOCTEZUMA, Director General de Control Sanitario de Bienes y Servicios, por acuerdo del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 38 fracción II, 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 194 fracción I de la Ley General de Salud; 2o. fracción III, 34, 37, 40 y demás aplicables del Reglamento de la Ley General de Salud en de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios; 8o. fracción IV y 13 fracción I del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y **CONSIDERANDO** Que con fecha 28 de abril de 1994, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, la Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana. Que con fecha 15 de agosto de 1994, en cumplimiento del acuerdo del Comité y lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación** el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana a efecto que dentro de los siguientes noventa días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario. Que en fecha previa, fueron publicadas en el **Diario Oficial de la Federación** las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización. Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-111-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. METODO PARA LA CUENTA DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS.

PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma participaron los siguientes organismos e instituciones:

SECRETARIA DE SALUD

Dirección General de Control Sanitario de Bienes y Servicios

Laboratorio Nacional de Salud Pública

SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA

Instituto Nacional de la Pesca

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

INDUSTRIAS VINICOLAS PEDRO DOMEQ, S.A. DE C.V.

JUGOS DEL VALLE, S.A. DE C.V.

LECHE INDUSTRIALIZADA CONASUPO, S.A. DE C.V. LICONSA

SIGMA ALIMENTOS, S.A. DE C.V.

SOCIEDAD MEXICANA DE NORMALIZACION Y CERTIFICACION, S.C.

NORMEX

INDICE

0. INTRODUCCION

1. OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACION

2. FUNDAMENTO

3. REFERENCIAS

4. DEFINICIONES

5. SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

6. REACTIVOS Y MATERIALES

7. APARATOS E INSTRUMENTOS

8. PREPARACION DE LA MUESTRA

9. PROCEDIMIENTO

10. EXPRESION DE RESULTADOS

11. INFORME DE LA PRUEBA

12. CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

13. BIBLIOGRAFIA

14. OBSERVANCIA DE LA NORMA

15. VIGENCIA

0. Introducción

Los mohos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la flora normal de un alimento, o como agentes contaminantes y en los equipos sanitizados inadecuadamente, provocando el deterioro fisicoquímico de éstos, debido a la utilización en su metabolismo de los carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos originando mal olor, alterando el sabor y el color en la superficie de los productos contaminados. Además los mohos y levaduras pueden sintetizar metabolitos tóxicos termoresistentes, capaces de soportar algunas sustancias químicas, así como la irradiación y presentan capacidad para alterar sustratos desfavorables, permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas.

Es de gran importancia cuantificar los mohos y levaduras en los alimentos, puesto que al establecer la cuenta de estos microorganismos, permite su utilización como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada.

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana establece el método general para determinar el número de mohos y levaduras viables presentes en productos destinados al consumo humano por medio de la cuenta en placa a 25 ± 1 °C.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que requieran efectuar este método en productos nacionales o de importación, para fines oficiales.

2. Fundamento

El método se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3,5 e incubado a una temperatura de 25 ± 1 °C, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos.

3. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

NOM-109-SSA1-1994 Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

NOM-110-SSA1-1994 Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico

NOM-092-SSA1-1994 Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

4. Definiciones

Para fines de esta Norma se entiende por:

4.1 Colonias, agrupamiento de células en forma de masas visibles, sobre el agar de cultivo.

4.2 Levaduras, son microorganismos cuya forma dominante de crecimiento es unicelular. Poseen un núcleo y se multiplican por reproducción sexual o asexual, por gemación o por fisión transversal. La reproducción sexual cuando ocurre, es por medio de ascosporas contenidas en un saco o asca.

4.3 Mohos, grupo de hongos microscópicos; organismos pertenecientes al reino Fungi, que se caracterizan por tener un cuerpo formado por estructura filamentosa con ramificaciones, que se conocen con el nombre de hifas, el conjunto de hifas constituye el micelio, carecen de clorofila, se alimentan por absorción pudiendo propagarse por esporas flageladas o no, las paredes celulares pueden ser de queratina, celulosa o manana. Crecen formando colonias en un medio selectivo a 25 °C.

4.4 Unidades Formadoras de Colonias (UFC), término que debe utilizarse para reportar la cuenta de colonias en placa, las cuales pueden surgir de una célula o de un cúmulo de células.

5. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

mm milímetro

µm micrómetro

g gramo

ml mililitro

pH potencial de hidrógeno

N normal

°C grado Celsius

% por ciento

UFC unidades formadoras de colonias

l litro

h hora

6. Reactivos y materiales

6.1 Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser de grado analítico y cuando se indique agua debe entenderse como agua destilada.

6.1.1 Medios de cultivo.

Agar papa - dextrosa, comercialmente disponible en forma deshidratada.

Preparación del medio de cultivo.

Seguir instrucciones del fabricante y después de esterilizar, enfriar en baño de agua a 45 ± 1 °C, acidificar a un pH de $3,5 \pm 0,1$ con ácido tartárico estéril al 10% (aproximadamente 1,4 ml de ácido tartárico por 100 ml de medio). Después de adicionar la solución, mezclar y medir el pH con potenciómetro. Dejar solidificar una porción del medio. Hacer esto en cada lote de medio preparado.

A fin de preservar las propiedades gelificantes del medio, no calentar después de agregar el ácido tartárico.

6.1.2 Soluciones.

6.1.2.1 Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)

FORMULA

INGREDIENTES CANTIDADES

Fosfato de potasio monobásico 34,0 g

Agua 1,0 l

Preparación:

Disolver el fosfato en 500 ml de agua y ajustar el pH a 7,2 con hidróxido de sodio 1 N.

Llevar a 1,0 l de agua.

Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Conservar en refrigeración (solución concentrada).

Tomar 1,25 ml de la solución concentrada y llevar a 1,0 l con agua (solución de trabajo).

Distribuir en porciones de 99, 90 y 9 ml según se requiera.

Esterilizar a 121 ± 1 °C durante 15 minutos.

6.1.2.2 Solución estéril de ácido tartárico al 10%

FORMULA**INGREDIENTES CANTIDADES**

Acido tartárico 10,0 g

Agua destilada 100,0 ml

Preparación:

Disolver el ácido en el agua y esterilizar a $121 \pm 1,0$ °C por 15 minutos o por filtración a través de membrana de 0,45 µm.

6.2 Materiales.

Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 ml (o si es necesario de 1 ml y 2 ml), con tapón de algodón. Pueden utilizarse pipetas graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.

Cajas Petri.

Frascos de vidrio de 250 ml con tapón de rosca.

Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.

Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, etc.

Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio, deben esterilizarse mediante:

Horno, durante 2 h de 170 a 175°C o por 1h a 180°C o autoclave, durante 15 minutos como mínimo a $121 \pm 1,0$ °C.

7. Aparatos e instrumentos

Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170°C.

Incubadora con termostato que pueda ser mantenido a $25 \pm 1,0$ °C provista con termómetro calibrado.

Autoclave que alcance una temperatura mínima de $121 \pm 1,0$ °C.

Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de 0,1 °C y que mantenga la temperatura a $45 \pm 1,0$ °C.

Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.

Registrador mecánico o electrónico.

Microscopio óptico.

Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25 °C.

8. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo a lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994.

Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

9. Procedimiento

9.1 Colocar por duplicado en cajas Petri 1 ml de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.

9.2 Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.

9.3 Verter de 15 a 20 ml de agar papa dextrosa acidificado, fundido y mantenido a 45 ± 1 °C en un baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que es vertido el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.

9.4 Mezclar cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en el sentido contrario y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa. Permitir que la mezcla se solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría. **9.5** Preparar una caja control con 15 ml de medio, para verificar la esterilidad.

9.6 Invertir las cajas y colocarlas en la incubadora a 25 ± 1 °C.

9.7 Contar las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, considerar los conteos de 4 días de incubación y aún de 3 días. En este caso, informar el periodo de incubación de 3 o 4 días en los resultados del análisis.

9.8 Si es necesario, cuando la morfología colonial no sea suficiente, examinar microscópicamente para distinguir las colonias de levaduras y mohos de las bacterias.

10. Expresión de resultados

Cálculo del Método

Considerar las cuentas de placas con 10 a 150 colonias como las adecuadas para el informe.

Multiplicar por el inverso de la dilución, tomando en consideración los criterios de la NOM-092-SSA1-1994.

Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa, para la expresión de resultados.

11. Informe de la prueba

Informar:

Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o ml) de mohos en agar papa – dextrosa acidificado, incubadas a 25 ± 1 °C durante 5 días.

Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o ml) de levaduras en agar papadextrosa acidificado, incubadas a 25 ± 1 °C durante 5 días.

12. Concordancia con normas internacionales

Esta Norma no tiene concordancia con normas internacionales.

13. Bibliografía

13.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

13.2 Secretaría de Salud. 1984. Ley General de Salud. **Diario Oficial de la Federación.** México, D.F.

13.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. **Diario Oficial de la Federación.** México, D.F.

13.4 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. NOM-008-SCFI-1993. Norma Oficial Mexicana.

Sistema General de Unidades de Medida.

13.5 Bacteriological Analytical Manual. 1984. Food and Drugs Administration FDA. Bureau of Foods. Division of Microbiology. 6a Ed. Washington, D.C.

13.6 Norma ISO 7954. 1987. Microbiology - General Guidance for Enumeration of Yeast and Moulds - Colony Count Technique at 25 °C. International Organization for Standardization.

13.7 NORMA-Z-013/02. 1981. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.

13.9 Vanderzant F., Carland S., y Don F., 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Washington, D.C.

14. Observancia de la Norma

La vigilancia en el cumplimiento de la presente Norma corresponde a la Secretaría de Salud.

15. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana, entrará en vigor con su carácter obligatorio a los 30 días siguientes a partir de su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**. Sufragio Efectivo. No Reelección.

México, D.F., a 10 de mayo de 1995.- El Director General, **José Meljem Moctezuma**.- Rúbrica.

NORMA Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Salud.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-188-SSA1-2002, PRODUCTOS Y SERVICIOS. CONTROL DE AFLATOXINAS EN CEREALES PARA CONSUMO HUMANO Y ANIMAL. ESPECIFICACIONES SANITARIAS. ERNESTO ENRIQUEZ RUBIO, Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, con fundamento en los artículos 39 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 4o. y 69-H de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo; 3o. fracciones XXII y XXIV, 13 apartado A) fracciones I, II y IX, 194 fracción I, 195, 199, 201, 205, 210, 214, 284, 401 bis, 401 bis-I y 401 bis-2 de la Ley General de Salud; 38 fracción II, 40 fracciones I, V, XII y XIII, 41, 43 y 47 de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 1o. fracción VII, 4o., 8o., 15, 25, 112, 113, 116 y quinto transitorio del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios; 28 y 34 del Reglamento de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 2 literal C fracción II, 34 y 36 fracción V del Reglamento Interior de la Secretaría de Salud, y 2 fracciones II y III, 7 fracción XVI, y 11 fracciones I y II del Decreto por el que se crea la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios, me permito ordenar la publicación en el **Diario Oficial de la Federación** de la siguiente:

Norma Oficial Mexicana NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias, y **CONSIDERANDO** Que con fecha 11 de marzo de 1999, en cumplimiento de lo previsto en el artículo 46 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, la Dirección General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios presentó al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, el anteproyecto de la presente Norma Oficial Mexicana. Que con fecha 14 de junio de 2000, en cumplimiento del acuerdo del Comité y lo previsto en el artículo 47 fracción I de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación** el proyecto de la presente Norma Oficial Mexicana, a efecto de que dentro de los siguientes sesenta días naturales posteriores a dicha publicación, los interesados presentaran sus comentarios al Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario. Que con fecha previa, fueron publicadas en el **Diario Oficial de la Federación** las respuestas a los comentarios recibidos por el mencionado Comité, en términos del artículo 47 fracción III de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización. Que en atención a las anteriores consideraciones, contando con la aprobación del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, se expide la siguiente:

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-188-SSA1-2002, PRODUCTOS Y SERVICIOS CONTROL DE AFLATOXINAS EN CEREALES PARA CONSUMO HUMANO Y ANIMAL. ESPECIFICACIONES SANITARIAS

PREFACIO

En la elaboración de la presente Norma participaron los siguientes Organismos e Instituciones:

SECRETARIA DE SALUD.

Dirección General de Calidad Sanitaria de Bienes y Servicios. Laboratorio Nacional de Salud Pública.

SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACION.

Dirección General de Agricultura.

Dirección General de Inspectoría Fitozoosanitaria.

Dirección General de Salud Animal.

Dirección General de Sanidad Vegetal.

Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal.

Martes 15 de octubre de 2002 DIARIO OFICIAL (Primera Sección) 23

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.

SECRETARIA DE ECONOMIA.

Dirección General de Política, Comercio Interior y Abasto.

Dirección General de Normas.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

Instituto de Biología.

ASOCIACION NACIONAL DE ESPECIALISTAS EN NUTRICION ANIMAL, A.C.

CAMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACION.

Comité Técnico de Normalización Nacional de Alimentos Balanceados para Animales.
Sección de Fabricantes de Alimentos Balanceados para Animales.
COMPAÑIA NACIONAL DE SUBSISTENCIAS POPULARES.
PRODUCTOS DE MAIZ, S.A.

INDICE

1. Objetivo y campo de aplicación
2. Referencias
3. Definiciones
4. Símbolos y abreviaturas
5. Especificaciones sanitarias
6. Control documental
7. Muestreo
8. Métodos de prueba
9. Concordancia con normas internacionales y mexicanas
10. Bibliografía
11. Observancia de la Norma
12. Vigencia
13. Apéndices normativos
14. Apéndices informativos

1. Objetivo y campo de aplicación

1.1 Esta Norma Oficial Mexicana, establece el límite máximo permisible de aflatoxinas en los cereales destinados para el consumo humano y animal, así como los lineamientos y requisitos sanitarios para el transporte y almacenamiento de los productos.

1.2 Esta Norma Oficial Mexicana es de observancia obligatoria en el Territorio Nacional para las personas físicas o morales que se dedican a su proceso o importación.

2. Referencias

Esta Norma se complementa con lo siguiente:

NOM-003-ZOO-1994 Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoonosanitaria.

NOM-028-FITO-1995 Por la que se establecen los requisitos fitosanitarios y especificaciones para la importación de los granos y semillas, excepto para siembra.

3. Definiciones

Para fines de esta Norma se entiende por:

3.1 Aflatoxinas, a los metabolitos secundarios producidos por varios mohos, cuya estructura química es heterocíclica, pertenecientes al grupo de las bisfurano cumarinas. Poseen toxicidad aguda y crónica, así como efectos mutagénicos y carcinogénicos en animales y el hombre.

24 (Primera Sección) DIARIO OFICIAL Martes 15 de octubre de 2002

3.2 Agentes biológicos, a cualquier organismo capaz de actuar en forma adversa sobre los cereales.

3.3 Almacén, a las instalaciones donde se realizan las actividades como: recepción, almacenamiento, conservación y movilización de los cereales.

3.4 Almacenamiento en intemperie, a la forma de conservación fuera de las bodegas y silos, diseñado para evitar que los cereales entren en contacto con el suelo, agua y otros factores determinantes.

3.5 Cereales, a los granos o semillas comestibles de las plantas de las gramíneas, entre los que se incluyen: arroz, avena, cebada, centeno, maíz, sorgo, triticale y trigo.

3.6 Control, a todas las medidas y disposiciones establecidas con el propósito de prevenir la presencia o evitar el incremento de aflatoxinas en los cereales por encima de los límites permisibles.

3.7 Fauna nociva, a todos los animales capaces de contaminar o destruir los alimentos, por acción mecánica o sus excretas.

3.8 Fungistato, a la sustancia que tiene la propiedad de detener o evitar el crecimiento de los mohos.

3.9 Granel, a los cereales que se almacenan en bodegas o silos y que no están contenidos en un envase específico.

3.10 Instrumento de muestreo, al equipo necesario para la obtención de muestras, pudiendo ser manuales o mecánicos, por ejemplo: caladores cónicos, sonda de profundidad o bala, de alvéolos, los muestreadores Ellis (cucharón), de pelicano, de cangilones, desviador o neumático.

3.11 Limpieza, al conjunto de actividades que tienen por objeto eliminar la suciedad como: tierra, residuos, polvo, grasa u otros materiales extraños en almacenes o unidades de transporte.

3.12 Método de prueba, a los procedimientos analíticos, utilizados en el laboratorio para determinar la presencia de aflatoxinas en los cereales.

3.13 Muestra compuesta, a la que se obtiene reuniendo y mezclando las muestras primarias.

3.14 Muestra primaria, a la obtenida a partir de un punto o momento de muestreo.

3.15 Proceso, al conjunto de actividades relativas a la obtención, elaboración, fabricación, preparación, conservación, mezclado, acondicionamiento, envasado, manipulación, transporte, distribución, almacenamiento y comercialización o suministro al público de los productos.

3.16 Silo, a la construcción cilíndrica de lámina o concreto en donde permanecen los cereales en almacenamiento.

3.17 Suelo, a la capa superior de la tierra, constituida por la fragmentación de la roca y materia orgánica.

3.18 Técnico de muestreo, a la persona encargada de tomar directamente la muestra de cereal de acuerdo con los procedimientos e instrumentos señalados en esta Norma y enviarla al laboratorio o entregarla directamente al verificador.

3.19 Unidades de transporte, a los vehículos en que se traslada el cereal desde el lugar de cosecha hasta el centro de acopio, planta de procesamiento o punto de ingreso al país.

3.20 Verificador, al personal oficial o aprobado por las Secretarías de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y de Salud para desempeñar las acciones de control sanitario.

3.21 Zonas de calentamiento, a la parte de masa de los cereales con la temperatura y humedad más elevada, provocada por un secado inadecuado, humedecimiento accidental, respiración del grano o interacción con agentes biológicos.

4. Símbolos y abreviaturas

Cuando en esta Norma se haga referencia a los siguientes símbolos y abreviaturas se entiende por:

% por ciento
 °C grados Celsius
 µg microgramo
 µL microlitro
 µm micrómetro
 AF aflatoxinas
 g gramo
 HPLC Cromatografía líquida de alta resolución
 kgM Kilogramo molar
 min minuto
 mL mililitro
 MM milimolar
 mm milímetro
 N normalidad
 ng
 nm
 nanogramo
 nanómetro
 Ø diámetro
 PBS solución amortiguadora de fosfatos
 pH potencial de hidrógeno

SAGARPA Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación SSA Secretaría de Salud t toneladas t/min toneladas por minuto Cuando en la presente Norma se haga referencia a las Secretarías debe entenderse que se trata de las Secretarías de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y de Salud. Cuando en la presente Norma se mencione al Reglamento, debe entenderse que se trata del Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. Cuando en la presente Norma se mencione a CICOPLAFEST, debe entenderse que se trata de la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas.

5. Especificaciones sanitarias

5.1 Unidades de transporte.

5.1.1 Cereales de importación.

5.1.1.1 Deben sujetarse a lo que se establece en la NOM-028-FITO-1995 señalada en el apartado de referencias.

5.1.2 Movilización dentro del Territorio Nacional.

5.1.2.1 Deben someterse a limpieza, hasta eliminar suciedad, residuos vegetales, suelo, excretas, restos de animales, fauna nociva, telarañas, productos químicos, sus envases, o cualquier producto o sustancia nociva para el producto.

5.1.2.2 En caso de que se apliquen plaguicidas, deben estar autorizados por CICOPLAFEST.

5.2 Almacenamiento de cereales destinados para consumo humano. Los cereales objeto de esta Norma, además de cumplir con lo establecido en el Reglamento, deben ajustarse a las siguientes disposiciones:

5.2.1 Disposiciones previas a la recepción. Las bodegas y almacenamiento en intemperie deben:

5.2.1.1 Notificar la apertura a la SSA.

5.2.1.2 Establecer un programa de control de fauna nociva.

5.2.1.3 Someterse a limpieza.

5.2.1.4 En caso de que se apliquen plaguicidas, éstos deben estar autorizados para estos fines por CICOPLAFEST.

5.2.1.5 Establecer por escrito, en su caso, los lugares en los que se almacenarán cereales que rebasen el límite máximo de AF señalado en esta Norma.

5.2.1.6 En el caso de los almacenamientos en intemperies, deben contar con dispositivos que eviten el contacto de los cereales con el suelo y contar con termopares. No deben presentar filtraciones o roturas. 26 (Primera Sección) DIARIO OFICIAL Martes 15 de octubre de 2002

5.2.1.7 Las bodegas deben ser edificios provistos de paredes, pisos y puertas, techados o que puedan ser cubiertos, en los que no deben existir goteras, nidos, fisuras o puertas en mal estado. Asimismo deben contar con termopares.

5.2.2 Durante el almacenamiento.

5.2.2.1 No deben almacenarse en la misma bodega cereales con concentraciones 20 µg/kg de AF y los que rebasen este valor.

5.2.2.2 Durante la recepción, el grano debe ser secado a la brevedad hasta alcanzar una humedad 14,5 %, misma que se debe conservar o disminuir durante todo el tiempo que permanezca almacenado.

5.2.2.3 Se permite la aplicación a los cereales de fungistato, siempre y cuando se emplee de acuerdo con las instrucciones del fabricante especificadas en la etiqueta.

5.2.2.4 Los cereales no podrán estar en contacto con el suelo.

5.3 Contaminantes.

5.3.1 Los cereales no deben exceder de 20 µg/kg de aflatoxinas totales.

5.3.2 En el caso de observarse concentraciones desde 21 y hasta 300 µg/kg, el cereal únicamente podrá utilizarse para consumo animal, de acuerdo con el Apéndice Normativo A.

6. Control documental

6.1 El proceso de los productos objeto de esta Norma, debe documentarse en bitácoras o registros de manera que garantice los requisitos establecidos en la Tabla 1. Los registros o bitácoras incluyendo los que se elaboren por medios electrónicos deben:

a) Contar con respaldos que aseguren la veracidad de la información y un procedimiento para la prevención de acceso y correcciones no controladas.

- b) Conservarse por lo menos durante 1 año y estar a disposición de la autoridad sanitaria cuando así lo requiera.
c) El diseño del formato queda bajo la responsabilidad del particular.

Tabla 1. Información mínima de las bitácoras o registros de las diferentes etapas del proceso y de las buenas prácticas de fabricación.

REGISTRO DE:	INFORMACION:	REGISTRO DE:	INFORMACION:
Control o erradicación de fauna nociva.	a) Por contratación: <ul style="list-style-type: none"> - Fecha. - Comprobante de fumigación proporcionado por la empresa responsable. - Sustancias usadas. - Número de licencia de la empresa que aplica. - Responsable. b) Autoaplicación: <ul style="list-style-type: none"> - Fecha. - Aprobación del responsable técnico. - Sustancias usadas. - Responsable. 	Control o erradicación de fauna nociva.	a) Por contratación: <ul style="list-style-type: none"> - Fecha. - Comprobante de fumigación proporcionado por la empresa responsable. - Sustancias usadas. - Número de licencia de la empresa que aplica. - Responsable. b) Autoaplicación: <ul style="list-style-type: none"> - Fecha. - Aprobación del responsable técnico. - Sustancias usadas. - Responsable.
Limpieza y desinfección de las instalaciones y equipo.	<ul style="list-style-type: none"> - Fecha. - Productos usados. - Concentraciones. - Tiempos de contacto. - Procedimiento para evitar la presencia de residuos antes de la llegada de los productos. - Responsable. 	Limpieza y desinfección de las instalaciones y equipo.	<ul style="list-style-type: none"> - Fecha. - Productos usados. - Concentraciones. - Tiempos de contacto. - Procedimiento para evitar la presencia de residuos antes de la llegada de los productos. - Responsable.

Martes 15 de octubre de 2002 DIARIO OFICIAL (Primera Sección) 27

Mantenimiento de instalaciones y equipo. - Tipo de mantenimiento (preventivo o correctivo).

- Operación realizada.
- Fecha.
- Responsable.

Proceso. a) Diagramas de bloque en los que se describa de manera esquemática el proceso de los productos.

b) Lugares donde se almacenarán los cereales que rebasen el límite máximo. c) Origen de los productos.

d) Fechas de recepción y de movilización de los productos.

e) Localización de los puntos de calentamiento (en su caso).

Análisis del producto. a) Físicos del grano:

- Porcentaje de humedad.
- Porcentaje de grano dañado.
- Porcentaje de plagas.
- Temperatura.
- Resultados.
- Fechas.

b) Aflatoxinas:

- Resultados.
- Zonas muestreadas.
- Fechas.
- Método(s) utilizado(s).

7. Muestreo

El muestreo de los cereales objeto de esta Norma además de cumplir con lo que establece la Ley General de Salud, se sujetará a lo siguiente:

7.1 Cereales de importación. El muestreo de estos productos en los puntos de entrada al país, debe sujetarse a lo que se establece en la NOM-028-FITO-1995 del apartado de referencias.

7.2 Cereales dentro del Territorio Nacional.

Generalidades

7.2.1 Se debe poner a disposición del verificador a un técnico de muestreo con un instrumento de muestreo que permita obtener la muestra. En el caso de producto en costales, el instrumento debe llegar al centro de cada costal muestreado.

7.2.2 Adicionalmente, en el caso de establecimientos, el verificador debe solicitar la toma de muestras provenientes de las zonas de calentamiento. Si no existen durante la visita, las tomará de las últimas zonas de calentamiento registradas.

7.2.3 En los establecimientos, el verificador debe solicitar que se tome la temperatura y la humedad de las muestras.

7.2.4 El verificador levantará un acta en la que haga constar, según sea el caso, el área, número de costales o unidades de transporte muestreadas.

7.2.5 Las bodegas y almacenamientos en intemperie, se dividen en zonas o áreas que contengan hasta 2000 t, obteniéndose de cada una, la muestra compuesta.

28 (Primera Sección) DIARIO OFICIAL Martes 15 de octubre de 2002

7.2.6 Se tomarán una o más muestras primarias en cada uno de los puntos de muestreo que se establecen en 7.3.1 cuando se trate de producto a granel, o en 7.3.2 cuando se trate de producto en costales.

7.2.7 De la suma de las muestras primarias, se constituirá una muestra compuesta, la que se homogeneizará, no debiendo ser menor a 5 kg.

7.2.8 Dependiendo de la altura del volumen almacenado, será el número de extracciones para cada punto de muestreo.

Tabla 2. Profundidad con que se efectúe el muestreo.

Profundidad m.	Instrumento de muestreo	No. de extracciones
1	Sonda de alvéolos	1
2	Sonda de bala, sonda de alvéolos.	3*
3	Sonda de bala, sonda de alvéolos.	3*
4	Sonda de bala.	3*
5	Sonda de bala.	3*

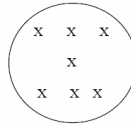
* Las muestras primarias deben obtenerse de diferentes profundidades.

7.3 Puntos de muestreo.

7.3.1 Cereales almacenados a granel en bodegas o almacenamientos en intemperie. Vista superior.



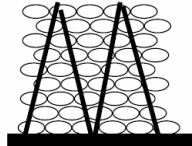
7.3.2 Cereales almacenados a granel en silos. Vista superior.



7.3.2.1 Cuando debido al diseño del silo no sea posible tomar las muestras primarias de la parte superior, se tomarán de las escotillas.

7.3.3 Cereales almacenados en costales.

7.3.3.1 Se deben identificar las estibas, cada una de las cuales se debe muestrear en forma de "M" imaginaria, la que debe ir del primero al último tendido, el ancho máximo de la parte inferior de la "M" no debe ser mayor a 5 m.



Esquema 3. Puntos de muestreo para producto en costales.

7.3.3.2 Debe tomarse una muestra de cada uno de los costales por donde pasen las líneas de la "M" trazada de acuerdo a lo señalado en el esquema anterior.

7.3.3.3 El número mínimo de costales a muestrear por lote, se ajustará a lo señalado en la tabla 2, si el número de sacos almacenados es mayor que el número máximo considerado en la tabla, se muestrearán los restantes como si fuera otro lote.

Tabla 3. Número mínimo de sacos a muestrear por lote

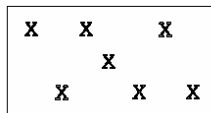
Número de costales

En lote	A muestrear
hasta 99	10
100-199	15
200-299	20
300-499	30
500-799	40
800-1299	55
1300-3199	75
3200-7999	115
8000-21999	150
22000-49999	225

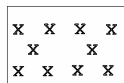
7.3.4 Muestreo de cereales en transportes.

7.3.4.1 Las Secretarías están facultadas para efectuar el muestreo en unidades de transporte en cualquier momento y lugar.

7.3.4.2 Puntos de muestreo.



Esquema 4. Contenedores terrestres de hasta 30 toneladas. Vista superior.
30 (Primera Sección) DIARIO OFICIAL Martes 15 de octubre de 2002



Esquema 5. Contenedores terrestres mayores de 30 toneladas. Vista superior.

7.3.5 Muestreo en movimiento.

7.3.5.1 Las muestras deben tomarse de los lugares o áreas donde el grano se encuentre en movimiento, como durante las operaciones de carga y descarga de las bodegas, almacenamientos en intemperie o durante los movimientos de transferencia entre silos.

7.3.5.2 La cantidad de muestra a obtener, será aproximadamente de 1 muestra primaria de aproximadamente 500 g por cada 12,5 t hasta obtener una muestra compuesta no menor de 5 kg, pudiendo calcularse la frecuencia de introducción del instrumento de muestreo con la siguiente ecuación:

$$M = t/c$$

Donde: M = frecuencia en min con que se debe introducir el instrumento de muestreo. t = toneladas representadas por cada muestra primaria (t/muestra). c = capacidad de la banda transportadora o capacidad de descarga del vehículo (t/min).

7.4 Envío de muestras.

Las muestras deben depositarse en bolsas nuevas de papel kraft, evitando su ruptura y etiquetarse al momento de la toma de muestra, las etiquetas se ajustarán a lo establecido en el Apéndice Normativo B.

8. Métodos de prueba

8.1 Para la verificación sanitaria de las especificaciones que se establecen en esta Norma, se debe aplicar cualquiera de los métodos de prueba señalados en el Apéndice normativo C.

8.2 El particular, para su control interno, podrá utilizar el método de prueba que más se ajuste a sus necesidades.

9. Concordancia con normas internacionales y mexicanas

Esta Norma no es equivalente a ninguna norma internacional ni mexicana, por no existir al momento de su elaboración.

10. Bibliografía

10.1 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1992. Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

Diario Oficial de la Federación, México, D.F.

10.2 Secretaría de Salud. 1984. Ley General de Salud. **Diario Oficial de la Federación**, México, D.F.

10.3 Secretaría de Salud. 1988. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios. **Diario Oficial de la Federación**, México, D.F.

10.4 Secretaría de Salud. 1999. Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. **Diario Oficial de la Federación**, México, D.F.

10.5 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1993. NOM-008-SCFI-1993. Sistema General de Unidades de Medida, **Diario Oficial de la Federación**, México, D.F.

10.6 Almacenes Nacionales de Depósito. Dirección de Operaciones. 1989. "Almacenamientos temporales". México, D.F. p. 1-16.

10.7 Anderson, H.W. et al. 1975. "Aflatoxin contamination of corn in the field". J. Agr. Food Chem. 23(4): 775-782.

Martes 15 de octubre de 2002 DIARIO OFICIAL (Primera Sección) 31

10.8 Auburn University. "Mycotoxins and mycotoxicosis". Alabama Cooperative Extension Service System. www.aces.edu/departament/grain.

10.9 Davis, L. et al. 1980. "Protocols for surveys, sampling, postcollection handling, and analysis of grain samples involved in mycotoxin problems". J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63(1): 95-102.

10.10 Dickens, J.W. "Sampling and detection techniques for aflatoxin in maize" en: Zuber, M.S.; Lillehoj, E.B.; Renfro, B.L. (eds). 1987. "Aflatoxin in maize. A proceedings of the workshop". CIMMYT, M, México, D.F. p. 92-99.

10.11 Diener, U.L.; Davis, N.D. "Biology of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*". en: Zuber, M.S.; Lillehoj, E.B.; Renfro, B.L. (eds). 1987. "Aflatoxin in maize. A proceedings of the workshop". CIMMYT, M, México, D.F. p. 33 -41.

10.12 Federal Grain Inspection Service. 1988. "Grain inspection handbook. Book I" U.S. Government Printing Office, USA. p. 3-1, 3-2, 4-1, 5-1, 5-2.

10.13 Flores, L.J.; Tapia, P.R. 1993. "Guía para la autoverificación de buenas prácticas de higiene en sus establecimientos". Secretaría de Salud, México, D.F.

10.14 Fennema, O.R. 1991. "Handbook of cereal science and technology". Marcel Dekker Inc. USA. p. 56-59.

10.15 Jones, J.K. et al. 1980. "Factors influencing infection by *Aspergillus flavus* in silk inoculated corn". Plant Disease: p. 859-862.

10.16 Koeltzow, D. et al. 1990. "Comparative evaluation of commercially available aflatoxin test methods". J. Assoc. Off. Anal. Chem (4): 548-589.

10.17 Medina, J.C. et al. "Problemas en la cuantificación de micotoxinas y niveles de contaminación en México" en: "Control de calidad de insumos y dietas acuícolas". Aquilla 2, México, D.F. p. 115-129.

10.18 Ortiz, C.A. 1992. "Manual de procedimientos para el análisis de aflatoxinas". Almacenes Nacionales de Depósito, México, D.F. p. 40-42; 47-61.

10.19 Ortiz, C.A. "Manual de procedimientos para el muestreo de granos". Almacenes Nacionales de Depósito, México, D.F. p. 34-41; 58-73, 78, 79.

10.20 Sauer, D.B. et al. "Conditions that affect growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxins in stored maize". in: Zuber, M.S.; Lillehoj, E.B. and Renfro, B. (eds). 1987. "Aflatoxin in maize. A proceedings of the workshop". CIMMYT, México, D.F. p. 42-50.

10.21 Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 1981. NORMA-Z-013/02. Guía para la Redacción, Estructuración y Presentación de las Normas Oficiales Mexicanas". **Diario Oficial de la Federación**, México, D.F.

10.22 United States Department of Agriculture. 1999. "Grain fungal diseases & mycotoxin reference". GIPSA, Kansas City, USA p. 2-6.

10.23 Van Egmond, H. 1989. "Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standar methods of sampling and analysis". Food Add. Cont. 6(2): 139-188.

10.24 World Health Organization. 1993. "Sampling plans for afltoxin analysis in peanuts and corn". FAO. Food and Nutrition Paper No. 55; Rome, Italy.

11. Observancia de la Norma

La vigilancia en el cumplimiento de la presente Norma corresponde a SAGARPA y SSA en sus ámbitos de competencia.

12. Vigencia

La presente Norma Oficial Mexicana entrará en vigor a los 90 días naturales siguientes al de su publicación en el **Diario Oficial de la Federación**.

México, D.F., a 1 de agosto de 2002.- El Presidente del Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario, **Ernesto Enríquez Rubio**.- Rúbrica.

32 (Primera Sección) DIARIO OFICIAL Martes 15 de octubre de 2002

APENDICE NORMATIVO A

A. De los límites permitidos para consumo animal. Los cereales con una concentración mayor de 20 µg/kg de aflatoxinas y que se destinen para consumo directo o como parte de alimentos procesados, deberán ajustarse a lo dispuesto en la siguiente tabla.

Especie/etapa de producción Límite máximo**µg/kg**

Aves (excepto pollos de engorda) 100 Cerdos en engorda: Entre 25 y 45 kg 100 Mayores de 45 kg 200 Maduros destinados a reproducción 100 Rumiantes: Maduros destinados a reproducción 100 De engorda en etapa de finalización 300

APENDICE NORMATIVO B**B.1** Del etiquetado de muestras.**B.1.1** Para muestras de bodega.

Tipo de producto _____

Centro: _____

Ubicación: _____

Bodega No.: _____ Sección: _____

Fecha toma de muestra: _____ Hora: _____

Observaciones: _____

Identificación de la muestra: _____

B.1.2 Para muestras durante la movilización.

Tipo de producto: _____

Centro de envío: _____

Ubicación: _____

Centro de destino: _____

Ubicación: _____

Nombre o Cía.: _____

Fecha y hora de la toma de muestra: _____

Datos del vehículo: _____

Identificación de la muestra: _____

B.2 Reporte de laboratorio.

Identificación de la muestra: _____

Centro: _____

Ubicación: _____

Martes 15 de octubre de 2002 DIARIO OFICIAL (Primera Sección) 33

Tipo de producto: _____

Nombre de bodegas muestreadas: _____

Número de muestras compuestas por bodega: _____

Concentración en cada muestra compuesta: _____

Concentración promedio de AF en cada bodega: _____

Identificación de la muestra: _____

Fecha de realización del análisis: _____

Vehículo muestreado: _____

Centro de origen: _____

Centro de destino: _____

Concentración de AF: _____

En caso de resultar la concentración de AF mayor o igual a 20 µg/kg reportar a: _____

Fecha de realización del análisis: _____

APENDICE INFORMATIVO A**A.** De las prácticas de campo.**A.1** Para disminuir el riesgo de contaminación de los cereales con AF, se recomienda lo siguiente:

- Durante la siembra, evitar que la densidad de población sea tan elevada que provoque competencia por los nutrientes entre las plantas. En caso de existir, seleccionar las variedades de semillas que sean menos susceptibles a la colonización por *Aspergillus spp.*

- Tener especial cuidado en el control de las plagas durante las etapas tardías de desarrollo.

- Cosechar cuando la humedad del grano se encuentre entre 20 y 25%. En caso de utilizar trilla mecánica ajustarla de manera que no provoque un elevado porcentaje de grano dañado. Una vez cosechado, enviarlo en unidades de transporte limpias y que no permitan el sobrecalentamiento del grano.

- Enviar el grano a almacenadoras cercanas o cuyo proceso de recepción sea rápido.