



INHIBICIÓN DE *ASPERGILLUS NIGER* EN LA PRODUCCIÓN DE AFLATOXINA B₁

Orlando O. Ruiz¹ y Kenia P. Palma²

¹Universidad de Panamá. Sede Coclé. Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. E-mail: kenyopa2001@yahoo.com

²Universidad Latina de Panamá. Facultad de Medicina.
E-mail: kepripalma@yahoo.com

RESUMEN

Se estudió la inhibición de una toxina fúngica mediante la interacción de hongos del Género *Aspergillus*. La interacción tuvo lugar en medio sólido (Gy – Agar), cuando se agregaron diferentes proporciones de suspensiones conidiales de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* a una misma placa de Petri y se incubó por espacio de una semana. Luego de una semana de incubación en el medio sólido a 28 °C y en oscuridad, *Aspergillus flavus* (productor de aflatoxina B₁) y *Aspergillus niger* mostraron diferentes tasa de crecimiento. Se pudo observar tanto macro como microscópicamente que la tasa de crecimiento de conidiación de *A.niger* fue siempre mayor que la de *A. flavus*. A las placas incubadas con diferentes proporciones conidiales se les determinó la presencia de Aflatoxina B₁ (AFB₁), por cromatografía de capa fina (TLC). Para determinadas relaciones inoculadas, se comprobó la ausencia de la toxina (AFB₁), lo cual nos estaría indicando un mecanismo natural inhibitorio de *Aspergillus niger* sobre cepas de *A. flavus* fuertemente productoras de AFB₁.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son compuestos químicos producidos por hongos. Son contaminantes naturales de una gran variedad de materias primas y alimentos destinados a consumo humano y animal.

Estas toxinas se encuentran en los alimentos como consecuencia de la colonización de hongos toxicogénicos, que en función del medio ambiente son capaces de producir estos metabolitos secundarios.

Los hongos productores son especies biológicas de gran ubicuidad, por lo que son habitualmente saprofitos del suelo, agua y aire.

Cuando varias especies de hongos crecen juntamente en el mismo sustrato, pueden afectarse entre sí de formas diversas. En el caso más sencillo, existe una competencia por conseguir el alimento disponible y el resultado final es que algunas especies inhiben su desarrollo, mientras que otras prosperan.

Los alimentos con alta disponibilidad de hidratos de carbono, como por ejemplo: cereales, forrajes, alimento para animales, constituyen un sustrato ideal para el crecimiento fúngico.

Generalmente suele ocurrir que existe una competencia entre las especies de hongos por invadir el sustrato.

¿Cuáles son los factores que gobiernan esta invasión, y qué factores intervienen para que un hongo prevalezca sobre otro? ¿Acaso la presencia de determinadas especies en un cultivo mixto da lugar a la inhibición en la producción de una toxinas?.

Este trabajo de investigación pone en evidencia la acción inhibitoria de *Aspergillus niger* en la producción de aflatoxina B1 por cepas de *Aspergillus flavus* cuando están presentes en cultivos mixtos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo Experimental

El estudio de cultivos mixtos genera diversidad de interacciones, que para el presente estudio dificultaba la elección de un modelo a seguir. Se pretendía realizar una elección que condujera a una representación lo más natural de convivencia de hongos del mismo género, sin provocar marcadas variaciones del valor del pH y disponibilidad de nutrientes.

El modelo propuesto se estableció mediante lanzada al azar de un dado de juego, con la única restricción, que el valor numérico resultante fuese mayor que uno. El valor obtenido fue 4, por lo que el

modelo resultante a estudiar consistió de 4 matrices con 16 posibilidades de combinación en total.

El modelo experimental resultante fue el siguiente:

$F_1 ; N_1$	$F_2 ; N_1$	$F_3 ; N_1$	$F_4 ; N_1$
$F_1 ; N_2$	$F_2 ; N_2$	$F_3 ; N_2$	$F_4 ; N_2$
$F_1 ; N_3$	$F_2 ; N_3$	$F_3 ; N_3$	$F_4 ; N_3$
$F_1 ; N_4$	$F_2 ; N_4$	$F_3 ; N_4$	$F_4 ; N_4$

F: cantidad de *Aspergillus flavus* inoculada en el cultivo

N: cantidad de *Aspergillus niger* inoculada en el cultivo

Medio de cultivo utilizado

Para el crecimiento de los hongos se utilizó agar extracto de malta (MEA). El medio utilizado para el estudio de la capacidad toxicogénica de *Aspergillus flavus* en los cultivos mixtos fue glucosa extracto de levadura, agar (Gy - Agar). Medio recomendado especialmente para el estudio de hongos productores de toxina. Filtenborg & Frisvad. 1980.

Cepas utilizadas

***Aspergillus flavus*:** aislada de pimienta negra, a la cual se le verificó su alta capacidad de producción de AFB₁.

***Aspergillus niger*:** aislada de pimienta negra.

Preparación de las suspensiones conidiales

1. En tubos de vidrio de 15 cm de largo por 1.5 cm de diámetro se colocó agar extracto de malta (MEA); los tubos fueron esterilizados a 121 °C durante 15 minutos y seguidamente se dejaron solidificar en forma inclinada.
2. En los tubos con el medio MEA, se sembraron las cepas patrones de *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, cada una por separado. Se incubaron a 28 °C por espacio de una semana.
3. Una vez comprobada la conidiación de los hongos en estudio, se les agregó 10 ml de H₂O estéril.

4. Con un asa de ojal se procuró lograr el mayor desprendimiento de los conidios de la superficie del medio sólido, de tal manera de obtener una densa solución conidial de los hongos *A. niger* y *A. flavus*.
5. Las suspensiones conidiales fueron agitadas en un vortex por espacio de 5 minutos.
6. Conocida el área del campo del microscopio se extendió 0.05 ml de muestra de solución conidial de cada hongo y se determinó el número de conidios por ml de muestra.
7. Se realizan diluciones hasta lograr igual concentración de conidios para cada hongo.

Estudio de la capacidad productora de AFB₁ en las placas con los cultivos mixtos.

1. El medio Gy-Agar previamente preparado y esterilizado fue colocado en placas de Petri descartables. El medio se dejó solidificar.
2. De acuerdo al modelo experimental propuesto, se sembraron 0.5 ml de las proporciones conidiales corregidas en las placas de Petri con el medio sólido.
3. Se incubaron las placas por espacio de una semana a 28 °C.
4. El método utilizado para el estudio de la capacidad productora de AFB₁ fue por cromatografía de capa fina (TLC); en general se basa en la producción de la toxina sobre un substrato sólido (Gy-Agar); luego se extrae la toxina con un solvente orgánico, y sin ningún procedimiento de purificación se detecta.
5. Se utilizaron placas cromatográficas de silicagel 60 G de 20 X 20 de la firma Merck.
6. De los cultivos mixtos, con crecimiento fúngico, se extrajo con un instrumento de vidrio de 10 mm de diámetro llamado “sacabocado”, discos de las colonias fúngicas desarrolladas.

7. Los discos extraídos se colocaron directamente sobre la placa cromatográfica, a una distancia de 1.5 cm del borde inferior y de los extremos.

8. Los discos fueron colocados en la placa cromatográfica del lado anverso del medio de cultivo con desarrollo fúngico.

Difusión de la toxina en la placa de TLC

1. Se dejó difundir la micotoxina a la placa de TLC hasta observar un halo líquido alrededor del disco de cultivo fúngico. El halo líquido fue indicativo que había transcurrido el tiempo necesario para la difusión de los metabolitos extracelulares a la placa de TLC.

2. Se retiró el disco de cultivo fúngico con ayuda de una espátula metálica.

3. Junto a la muestra en estudio se inocularon 2 μ l del estándar de referencia de AFB₁.

4. Se secó la placa de TLC con ayuda de un secador de cabello.

Desarrollo de las placas cromatográficas

1. En la detección de la toxina se empleó cromatografía en capa fina o TLC; cuyo límite de detección para esta toxina se estimó en 0.2 μ g/gr. (Filterborg & col. 1980).

2. Se utilizó el método de desarrollo unidimensional ascendente.

3. Las placas se acomodaron en una cuba cromatográfica de vidrio.

4. El borde inferior de la placa se sumergió 1 cm en el solvente; sin que llegará a la línea de siembra.

5. Se dejó ascender el frente del solvente hasta $\frac{3}{4}$ partes de la altura de la placa.

6. El sistema de solvente empleado fue:

a. Cloroformo 6

b. Acetaldehído 3

c. Ácido fórmico 1

(Filterborg & col. 1980)

Detección de AFB₁ y confirmación de la misma

1. Las placas cromatográficas se extrajeron de la cuba, fueron secadas con un secador de cabello.
2. Se observó bajo la luz UV de alta frecuencia las placas cromatográficas. Bajo la luz fluorescente la AFB₁ aparecen como manchas de color azul.
3. La confirmación de la presencia de AFB₁ se realizó depositando una gota de ácido sulfúrico (15 %) sobre las manchas que evidenciaron el color azul. El paso del color azul a amarillo confirmaba la identidad de la AFB₁ (Smith & Mackernan, 1962). El cambio de color debe ser observado bajo luz UV, se produce un cambio de fluorescencia de azul a amarillo únicamente cuando la toxina presente es AFB₁.
4. Las R_f de la muestra y del estándar externo debieron ser coincidentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Después de una semana de incubación a 28 °C y en oscuridad, en el medio Gy-Agar, bajo las mismas condiciones de pH y disponibilidad de nutrientes, los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* mostraron diferentes tasas de crecimiento. Microscópicamente se observó que *A. niger* siempre se encontraba mayormente disperso que *A. flavus* sobre toda la superficie de la placa de Petri.

Transcurrido este tiempo, *A. niger* mostró siempre mayor tasa de crecimiento que *A. flavus*. Después de dos semanas de incubación, *A. niger* mostró una gran invasión de la placa de cultivo, incluso llegando a cubrir a *A. flavus*.

De acuerdo a lo observado, macro y microscópicamente la tasa de maduración de los conidios de *A. niger* fue siempre mayor que *A. flavus*; debemos considerar además, que los conidios de *A. niger* son mucho más pequeños que los de *A. flavus*, lo que aparentemente permitió mayor movilidad y una rápida colonización de la placa de cultivo.

Filterborg & col. 1980, utilizaron sacabocados de 10 mm de diámetro para el estudio de la capacidad toxicogénica de hongos del Género *Aspergillus*. En este estudio se introdujo la variación de utilizar sacabocados con un diámetro de 7 mm. Con estos diámetros pudimos lograr una mejor resolución de las manchas durante el desarrollo de la corrida cromatográfica. Con diámetros de 10 mm y mayores el resultado eran manchas dispersas.

Para verificar que las cepas de *Aspergillus flavus* no habían perdido su capacidad de producir AFB₁, se sembraron 0.5 ml de suspensión conidial de este hongo en placas de Petri y se comprobó su capacidad toxicogénica. Para todos los casos analizados siempre se verificó la producción de la toxina. Las R_f del patrón de *Aspergillus flavus* y del estándar externo siempre fueron coincidentes, (Cuadro N° 1. y Fig. N° 1).

El presente trabajo se dedicó a la detección de la toxina en los cultivos mixtos. No se pretendía evaluar la cantidad de AFB₁ producida. Sin embargo, en algunos casos fue notorio que la intensidad de la mancha producida para algunas relaciones estudiadas (1:3), comparada con la intensidad de las manchas producidas tanto de las cepas patrones como para el patrón externo y las otras relaciones estudiadas, fueron visualmente de menor intensidad, lo que nos hizo pensar una menor producción de la toxina, (Cuadro N° 2).

La capacidad que tiene la toxina de difundir en el medio de cultivo sólido se puso en evidencia al estudiar la periferia de los cultivos mixtos, en donde también se comprobó la presencia de la toxina (Ver Cuadro N° 2 y Fig. N° 3).

Las relaciones estudiadas en este caso, son tan sólo una pequeña aproximación de lo que realmente puede ocurrir naturalmente. Pero ha quedado claro que cuando *Aspergillus niger* se encuentra mayoritariamente no evita el crecimiento de *Aspergillus flavus*, pero sí inhibe la producción de la toxina (AFB₁).

Esto es de suma importancia a nivel de siembra de granos, ya que en el caso hipotético de encontrar un hábitat donde, por alguna razón, *A. niger* predomina sobre *A. flavus*, es de esperar ausencia en la producción de la micotoxina.

Teóricamente se ha pensado tan sólo en la relación de convivencia de dos hongos, lo cual no es cierto a nivel de campo. Tendríamos que estudiar in situ lo que realmente ocurre. De hecho, al existir una población mayoritaria de *A. niger* sobre *A. flavus*, esto se trasladaría a nivel de silo; y de existir proliferación fúngica en las primeras etapas de conservación, se evitaría también el crecimiento de la micotoxina.

Cuadro N° 1. Estudio de la Capacidad Productora de AFB₁ en la cepa patrón de *Aspergillus flavus* aislada de pimienta negra

Número de detecciones realizadas	Resultado de la detección de la toxina
1	(+)
2	(+)
3	(+)
4	(+)
5	(+)

El Cuadro N° 2 muestra todas las relaciones estudiadas de los cultivos mixtos. Se puede observar claramente que para las relaciones **1:4; 2:4** no fue posible la detección de la toxina. Ver Fig. N° 2. Para el caso **1:3**, si bien se detectó la toxina, podemos decir que la intensidad de la mancha obtenida comparada con la intensidad de las otras manchas de las otras relaciones que dieron positivos fue de menor intensidad. Para todos los casos la detección se realizó por cuadruplicado. Puesto que *A. niger* no impide el crecimiento de *A. flavus*; sino que *A. niger* crece mucho más rápido bajo las mismas condiciones de laboratorio, podemos decir que bajo estas condiciones mayoritarias de *A. niger*, *A. flavus* no tiene la capacidad de producir la toxina.

Cuadro N° 2. Detección de AFB₁ en cultivos mixtos de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* después de una semana de incubación en medio Gy-Agar a 28 °C. Resultado de cuatro determinaciones similares.

Relación (<i>A. flavus</i> / <i>A. niger</i>)	Zona de detección de AFB ₁ respecto del cultivo desarrollado	
	Centro	Parte más externa del cultivo
1:1	(+)	(+)
1:2	(+)	(+)
1:3	(T)	(T)
1:4	(-)	(-)
2:1	(+)	(+)
2:2	(+)	(+)
2:3	(+)	(+)
2:4	(-)	(-)
3:1	(+)	(+)
3:2	(+)	(+)
3:3	(+)	(+)
3:4	(+)	(+)
4:1	(+)	(+)
4:2	(+)	(+)
4:3	(+)	(+)
4:4	(+)	(+)

Referencia:

T: indica que se detectó la toxina pero en menor cantidad que las otras relaciones estudiadas

(+): Presencia de la AFB₁

(-): Ausencia de la AFB₁

LÁMINAS FOTOGRÁFICAS

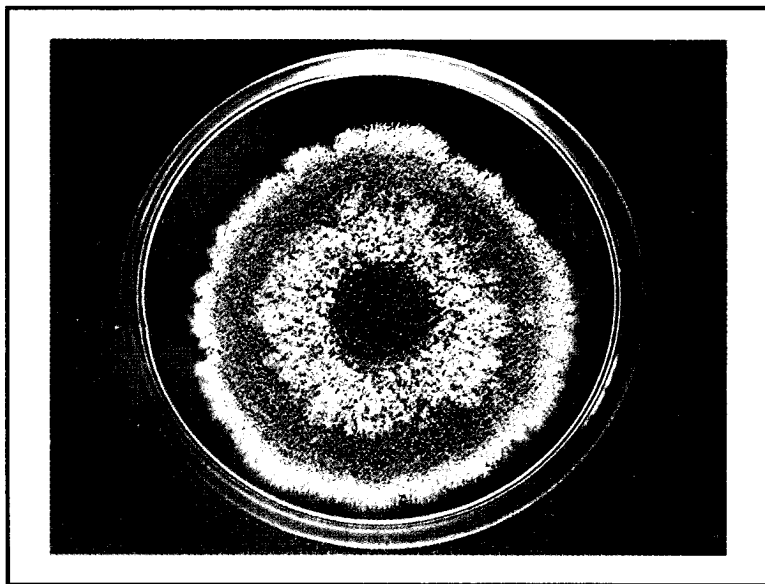


Fig. Nº 1. Cepa patrón de *A. flavus*, aislada de pimienta negra. Siempre se detectó la presencia de la toxina.

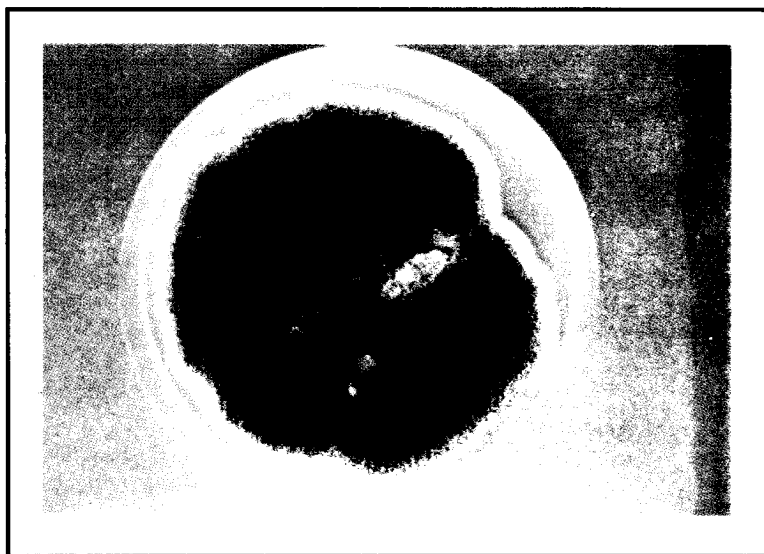


Fig. Nº 2. Relación (1:4). No se detectó AFB₁ en ningún punto estudiado de la placa.

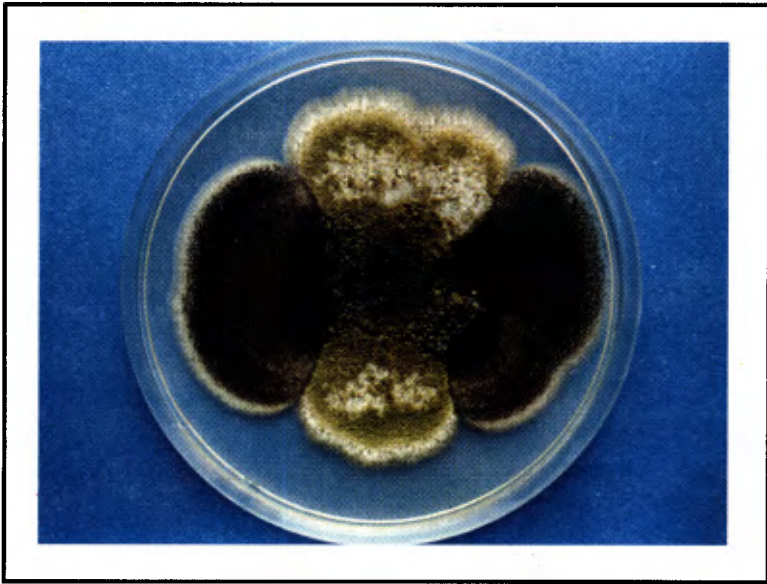


Fig. N° 3. Relación (2:4). Se detectó la presencia de AFB₁. En todos los puntos estudiados de la placa de cultivo.

CONCLUSIONES

La tasa de crecimiento de *Aspergillus niger* es mucho mayor que para *Aspergillus flavus* en el medio Gy- Agar estudiado.

Aspergillus niger creció rápidamente resultando ser muy invasivo en todas las zonas de crecimiento de *Aspergillus flavus*, pudiendo observarse macroscópicamente conidios situados por encima de la estructura micelar de *A. flavus*.

Para las cepas patrones de *Aspergillus flavus*, siempre se confirmó la producción de la toxina; es decir no se pierde a nivel de laboratorio la capacidad de producir la toxina.

Para el Estudio de la Capacidad Toxicogénica, propuesta por Filtenborg & Frisvad (1980), para hongos del género *Aspergillus*, es recomendable utilizar sacabocados de diámetro menor o igual a 7 mm.

Se pudo comprobar la capacidad difusiva de los metabolitos secundarios. Al verificar la presencia de la toxina en las zonas más alejadas de la placa de Petri.

Aspergillus niger no impide el crecimiento de *Aspergillus flavus*, pero cuando se encuentra bajo ciertas relaciones (1:4; 2:4) no es posible detectar la producción de la toxina.

Relaciones 1:3 presentaron manchas tenues de AFB₁ bajo la luz UV, siempre y cuando se tome como referencia el patrón externo sembrado y la cepa patrón productora.

REFERENCIAS

Barnett, H.L., & B. Hunter. 1992. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company USA.

Basílico, J.C. (1995). Micotoxinas en Alimentos. Centro de Publicaciones. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe. Argentina. Jcbasili@fiquis.unl.edu.ar

Briffaud, J., & M. Engasser. 1979. Biotechnol. Vol. 21, Pág. 2083

Brock, Thomas., & M. Madigan. 1991. Microbiología Sexta Edición. Prentice Hall Hispanoamericana S.A.

Calafell de, María, A.M. González, J.C., Basílico, P. Falcon , R. Gómez, & L. Freyre. 1997. Introducción al Estudio de la Micología. Centro de Publicaciones Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Cole, R.J. & R.H. Cox. 1981. Handbook of Toxin Fungal Metabolites. Academic Press.

Fehlhaber, K. & P. Janetschke. 1992. Higiene Veterinaria de los Alimentos. Editorial Acribia.

Frazier, W.C. & D.G. Westhoff. 1993. Microbiología de los Alimentos 3^{era} Edición. Editorial Acribia.

ICMSF. 1980. *Ecología Microbiana de los Alimentos* Vol. 1 y 2. Editorial Acribia.

ICMSF. 1996. *Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens*. Blackie Academic & Professional.

Jay, J.M (1992). *Microbiología Moderna de los Alimentos* 4^{ta} Edición. Editorial Acribia.

Klich, M.A. & J.I. Pitt. 1988^a. *A Laboratory Guide to Common Aspergillus Species and their Teleomorphs*, North Ryde, NSW: CSIRO

Pitt, J.I. & A.D.Hocking. 1997. *Fungi and Spoilage*. Second Edition. Printed in Great Britain at the University Press, Cambridge.

Rauken, M.D.1988. *Manual de Industrias de los Alimentos*. 2^{da} Edición. Editorial Acribia.

Rehm, H., & G. Reed. 1983. *Biotechnology*. Volume 3, Pág. 419 - 451 Verlag Chemie.

Samson, A.R., E. Hockstra, & A.N. Van Oorschot.1984. *Introduction to Food – Borne Fungi*. Second Edition. Contraalbureau Voor Schimmel Cultures.

Smith George. 1963. *Introducción a la Micología Industria*. Editorial Acribia. Zaragoza España.

Wainwright, M. (1995). *An Introduction to Fungal Biotechnology*. Editorial John Wiley & Sons, Ltd.

Recibido marzo del 2002, aceptado julio del 2002.

