

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE
HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

TESIS DE LICENCIATURA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUMICO FARMACO BIOLOGO

TITULO DE TESIS:

FLORA FUNGICA EN MUESTRAS DE PISTACHOS,
CACAHUATES Y PIMIENTA NEGRA

PRESENTA:

pQFB HUGO ENRIQUE SANCHEZ CHAVEZ

ASESOR:

D.C. VIRGINIA ROBINSON FUENTES

AGOSTO DEL 2007

INDICE

PAGINAS

Índice de figuras	i
Índice de tablas	ii
Resumen	iii
1 Introducción	3
2 Marco teórico	7
2.1.1 Valor nutritivo	9
2.1.2 Contaminación de pistache	10
2.2 Pimienta negra	10
2.3 Cacahuete	14
2.3.1 El cacahuete en México	16
2.3.2 Dificultades de comercialización	17
2.4 Hongos	17
2.4.1 Reproducción de los hongos	22
2.4.1.a Fase sexual y asexual	22
2.4.2 Clasificación de los hongos	31
a. Phylum Chytridiomycota	31
b. Phylum Zygomycota	32
c. Phylum Ascomycota	32
d. Phylum Basidiomycota	33
e. Phylum Deuteromycota	34
e.1 Sinema	36
e.2 Espodoquio	36
e.3 Acervulo	37

e.4 Picnidio	37
2.5 Clasificación de deuteromycota	37
2.5.1 Clase hyphomycetes	38
a. Orden moniliales	38
b. Familia moniliaceae	38
b.1 Aspergillus	39
b.2 Aspergillus fumigatus	40
b.3 Penicillium	43
c. Familia Dematiacea	45
c.1 Cladosporium	45
2.6 Actinomicetes	48
2.6.1 Nocardia	49
2.6.2 Rhodococcus	50
2.6.3 Streptomyces	50
2.7 Micotoxinas	51
2.7.1 Efectos en la salud	51
2.8 Sistema Biolog	52
3 Justificación	53
4 Objetivos	54
5 Materiales y Métodos	55
5.1 Muestras	55
5.2 Medio de cultivo	55
5.3 Aislamiento de muestras	55
5.4 Identificación de colonias	56
5.4.1 Identificación por morfología colonial	56

5.4.2 Identificación por Biolog	56
Utilización de fuentes de carbono mediante el sistema Biolog	56
a Obtención del preinoculo	56
b Preparación de la suspensión	57
c Inoculación e incubación Biolog	67
6 Resultados	59
7 Discusión	72
8 Conclusiones	75
9 Bibliografía	76

INDICE DE TABLAS

TABLA	PAGINAS
Tabla 2.1 Valor nutrimental del Pistacho	9
Tabla 2.2 Valor nutrimental de Pimienta Negra	13
Tabla 2.3 Valor nutrimental del Cacahuete	15
Tabla 6.1 Municipios de los cuales provienen las muestras	59
Tabla 6.2 Contaminación por Hongos y Actinomicetes	60
Tabla 6.3 Resultados de identificación de morfología	70
Tabla 6.4 Resultados obtenidos del Biolog	70
Tabla 6.5 Porcentaje de Hongos y Actinomicetes presentes en las muestras	71
Grafica 6.1 Porcentaje de Hongos y Actinomicetes presentes en las muestras	71

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINAS
Figura 2.1 Fruto dePistacho	7
Figura 2.2 Árbol de Pistacho	8
Figura 2.3 Fruto de Pimienta Negra	10
Figura 2.4 Árbol de Pimienta	11
Figura 2.5 Fruto de Cacahuate	14
Figura 2.6 Planta de Cacahuate	14
Figura 2.7 Ultraestructura de la célula fúngica.	19
Figura 2.8 Quitina(N-acetil-Dglucosamida)	19
Figura 2.9 Tipos de Hifas	21
Figura 2.10 Tipos de esporas sexuales	23
Figura 2.11 Tipos de conidios	27
Figura 2.12 Tipos de conidios según su origen	27
Figura 2.13 Tipos de conidios blasticos	28
Figura 2.14 Tipos de conidios talicos	28
Figura 2.15 Clasificación de los conidios	29
Figura 2.16 Clasificación de los conidioas de acuerdo a su posición	29
Figura 2.17 Clasificación de células conidiogenas	30
Figura 2.18 Tipos especiales de células conidiogenas	31
Figura 2.19 Phylum Crytridiomycota	31
Figura 2.20 Ciclo reproductivo de Ascomicetes	32

Figura 2.21 Ciclo reproductivo de Basidiomicetes	34
Figura 2.22 <i>Aspergillus</i>	39
Figura 2.23 Fialides y conidios de <i>Aspergillus</i>	40
Figura 2.24 Morfología de los conidioforos de <i>Penicillium</i>	44
Figura C.a.1 <i>Cladosporium</i>	46
Figura C.2 Diferencias morfológicas entre Hongo, Bacteria y Actinomicetes	49
Figura 5.1 Fuentes de carbono en microplaca de Biolog	58
Figura 6.1 Mapa de Michoacán	59

RESUMEN

Hoy en día la importancia de la identificación y cuantificación de la flora fúngica en los productos alimenticios es básica para el manejo del control de la calidad así como la prevención de enfermedades producidas por estos mismos.

Este trabajo se elaboró con la finalidad de identificar la flora fúngica presente en cacahuete, pimienta y pistaches. La identificación se realizó basándose en las características micro y macroscópicas de los hongos así como con el sistema Biolog fueron los métodos utilizados para la identificación de estas especies.

Se encontró que la flora fúngica mayoritaria es debida a actinomicetes. El 20% de las muestras de cacahuete presenta contaminación por *Aspergillus*, el 10% de las muestras de pistache presento contaminación por *Cladosporium herbarum* y otro 10% por *Penicillium verrucosum*. La pimienta negra presenta un 10% de contaminación por *Penicillium solitum*, hongo no micotoxigenico. Algunas de las especies presentes son de hongos micotoxigenicos.

1 INTRODUCCIÓN

Los alimentos son la base de la salud humana, estos contienen carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales etc. pero también pueden contener contaminantes naturales como son los hongos y las bacterias.

En este trabajo, el contenido de hongos es importante pues ellos no sólo estropean los alimentos y alteran sus caracteres organolépticos sino que también pueden producir micotoxinas que son sustancias cuya actividad cancerígena está ampliamente probada.

Existen diversos estudios en otros países, enfocados a determinar la diversidad fúngica y contenido de micotoxinas de diversos alimentos incluyendo pistaches y cacahuates. En pimienta sólo se han realizado estudios para conocer su contenido de micotoxinas; sin embargo, en México sólo existe información para maíz forrajero y para consumo humano pero no para los productos que aquí se analizan. El cacahuete y el pistache se han utilizado siempre como alimentos recreativos y la pimienta forma parte de la mayoría de los platillos tradicionales de la cocina Mexicana.

Los cacahuates (*Arachis hypogaea*) y los pistaches (*Pistacia vera*) pueden consumirse directamente o se pueden tostar, salar e incluir en diversas recetas. La producción anual de cacahuete en México es de cerca de 95000 toneladas mientras que el consumo humano es de 93000 toneladas, considerando el mismo periodo. Sin embargo, los cacahuates se convierten en aceite, mantequilla y otros productos, por lo que se requiere de la importación de aproximadamente 96000 toneladas mas. Por otro lado, la producción anual de pistache en México es de 30 toneladas mientras que se consumen 7270 toneladas, por lo que la mayoría del pistache

consumido tiene que ser importado (Food Balance Sheet, 2007). Las leyes mexicanas (NOM-188-SSA1-2002) sólo contemplan la presencia de mohos y aflatoxinas en cereales, por lo que se puede considerar que la importación de este tipo de productos no utiliza parámetros de calidad suficientes. En el caso de la pimienta, se sabe que sólo se consume en México el 2.2% de la producción y el resto se exporta. Aún así, tampoco se cuenta con normas que regulen la calidad micotoxigenica de esta especia.

El Estado de Michoacán se localiza en la región centro-oeste de México, en la costa del Pacífico de país. Su superficie es de 59,864 Km² lo que representa el 3% del área total del Territorio nacional (Gobierno del Estado de Michoacán, 2006). Posee una gran variedad de climas que van de caliente y húmedo hasta semifrío con una temporada de secas en invierno y una temporada de fuertes lluvias en verano (INEGI, 2006). Esta variedad de climas permite que los productos agrícolas puedan contaminarse fácilmente por hongos y que esto pueda ocasionar la presencia de micotoxinas en ellos.

Últimamente se ha registrado un aumento considerable de las enfermedades cardiovasculares y por este motivo, los investigadores se han dado a la tarea de buscar estilos de vida y dietas más sanas. Se ha comprobado que la dieta mediterránea por su alto contenido en fibra, entre otras cosas, es muy útil en la prevención de estos padecimientos (Fidanza, 2002). Esta dieta incluye a los cacahuates y pistaches además de ir sazónada con pimienta negra. De ahí la importancia de asegurarse que los alimentos que se consumen son inocuos o que al menos no contienen hongos micotoxigénicos.

Los trabajos que han analizado la flora fúngica en alimentos basan la identificación de los hongos en base a sus características microscópicas y macroscópicas (Abdel-Gawad and Zohri, 1993; Lozada, 1995; Pacin *et al*, 2002). En algunos otros, se han

llevado a cabo utilizando técnicas de biología molecular (Sanchez-Rangel *et al*, 2005; Jurado *et al*, 2006). La identificación de hongos en base a sus características metabólicas usando el sistema Biolog ha sido muy poco utilizada porque dicho sistema es más bien utilizado en la tipificación de bacterias. Así que en este trabajo se propone el uso del sistema Biolog para identificar la flora fúngica presente en las muestras de pistaches, cacahuete y pimienta negra y de esta manera conocer si tales muestras contienen o no hongos micotoxinigénicos

2 MARCO TEÓRICO

2.1 PISTACHO (*Pistacia vera*)



Figura 2.1 Fruto del Pistacho

El árbol de pistacho pertenece a la familia de las Anacardiáceas y procede de Irán antes Persia. Su domesticación tuvo lugar hace menos de 2000 años y los mercaderes lo introdujeron en todo el oriente medio y en la zona del mediterráneo (Lopez, 2005). El fruto llegó a California en manos de los inmigrantes del medio oriente a finales del siglo XIX. Actualmente las principales zonas productoras se encuentran ubicadas en el oriente medio, América del Norte y Europa. Irán es el mayor productor de pistacho en el mundo así como Alemania es el mayor importador. (FAO/OMSPNUMAS,1999, López, 2005)

El pistacho es un árbol frutal deciduo (todas sus hojas se caen en un determinado periodo). Su fruta es adropada (fruta de hueso) semiseca, que consiste en una única semilla (almendra) y un revestimiento de la semilla (tegumento), encerrado en un endocarpio (cáscara) huesuda y delgada que esta rodeada por el mesocarpio y el epicarpio (corteza). Su recolección es de Septiembre a Noviembre (FAO/OMSPNUMAS,1999).

El árbol de pistache se destaca por la mínima cantidad de agua que requiere, equivalente a la que puede acumularse durante el sereno de la noche, es capaz de sobrevivir y dar fruto en situaciones adversas, intolerables para la mayor parte de los árboles frutales. Tiene un extenso periodo de productividad, que llega a los 200 años en promedio (López, 2005;Vargas 2005).



Figura 2.2 Arbol del Pistacho

Los árboles de pistache no requieren plaguicidas y solo necesitan mantenimiento básico, por lo que sus costos de producción y reproducción son muy bajos (Vidaña, 2003).

Cada árbol de pistache, al tercer año de vida, genera mil 300 litros de oxígeno anuales, lo que contribuye a disminuir el sobrecalentamiento de la tierra.

Actualmente México importa entre 50 mil y 100 mil toneladas anuales de pistacho para satisfacer la demanda nacional (Vidaña, 2003).

El cultivo del pistache también es un fruto de elección debido a los 30 nutrientes y proteínas que contiene, lo que lo hace idóneo para formar parte de la dieta regular de la población. En la india, por ejemplo, se utiliza como sustituto de carne por su alto contenido proteico (Vidaña, 2003).

2.1.1 Valor nutritivo

Es un fruto oleaginoso y de crujiente textura que no contiene colesterol y grasas saturadas, pero si contiene grasas poli saturadas que ayudan al cuerpo a absorber las vitaminas A, D, E y K y reducir los riesgos de infarto. Aparte de ser una buena fuente de energía (López, 2005).

El fruto del pistacho es rico en proteínas, aceite, vitaminas A y B y tienen un alto contenido fibra, potasio, fósforo, calcio y aminoácidos, además de no tener colesterol., como ya se mencionó. El pistache tiene un alto nivel en fibra incluso mayor que el de las pasas y pan de trigo como se puede apreciar en la tabla 2.1.

Kcal. Calorías	642
Grasas(%)	51
Proteínas(%)	17
Carbohidratos(%)	16
Minerales(%)	3
Agua(%)	4
Energía(cal)	64
Fibra(%)	10
Vitamina A (U.I)	230
Vitamina B (mg)	1.4
Vitamina B1(mg)	0.67

Tabla 2.1 Valor Nutricional por 100g de materia seca.

Destaca su contenido en ácido fólico ya que 100 g de pistacho (crudo) aportan el mismo contenido en vitamina B9 (ácido fólico) que 100 g de pan blanco. Los pistachos son el fruto seco con más vitamina A. Su alto nivel proteico es muy

importante. Consumidos en exceso, al igual que los cacahuets o maní, pueden ser indigestos.

2.1.2 Contaminación de pistache.

La rotura de la corteza se denomina “apertura prematura” (de 60 a 20 días antes de la recolección) y es un fenómeno natural que es importante por que en este periodo se puede producir la contaminación por hongos. (MYC-CONF, 1999) Las especies que atacan a los pistachos generalmente son del género *Aspergillus*.

La ruptura expone a la almendra a esporas fúngicas transportadas por el viento o a insectos que pueden acarrear esporas fúngicas con sus cuerpos. (MYC-CONF, 1999).

2.2 PIMIENTA NEGRA (*Peper nigrum*)



Figura 2.3 Fruto Pimienta Negra

Nombre común aplicado a un pequeño árbol de las antillas de la familia de las Mirtáceas, su fruto es una baya llamada pimienta de Jamaica. Alcanza hasta 9 m de altura y tiene hojas aromáticas, lustrosas, de color verde y cimas de flores Esta planta tiene no solo aplicaciones indudablemente culinarias sino que también se utiliza en medicina. Combate eficazmente las hemorragias de las varices o del varicocele, del hígado, vejiga o matriz. Se le atribuyen propiedades vaso – constrictoras. Cura las hemorroides (Nakatani, 1992).



Figura 2.4 Arbol de Pimienta

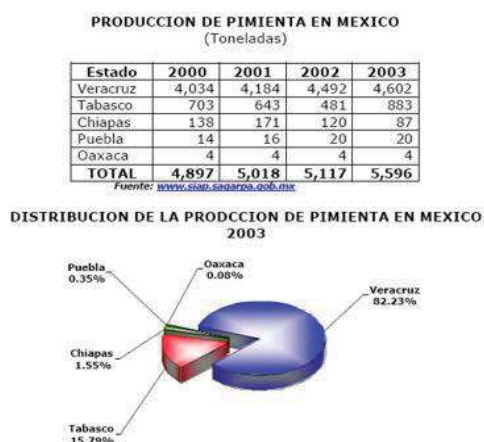
Entre sus componentes figuran aceites esenciales, ericolina, materias nitrogenadas y otras sustancias. Además tiene propiedades como antioxidante natural (Martins *et al*, 1998). También se le han atribuido propiedades beneficiosas frente al cáncer (Concon *et al*, 1979).

La pimienta es una planta perenne, nativa de la India, país que en la actualidad es uno de los mayores productores de esta especia. En América Latina el principal productor es Brasil y el país que más la importa es Estados Unidos.

El mayor productor mundial anual es India, con una producción de 57 mil toneladas, más de la mitad de las cuales se consumen en el mercado interno. Le siguen en importancia Indonesia (más de 52 mil toneladas), Brasil (cerca de 46 mil ton.), Malasia (19 mil ton.), Viet Nam (casi 18 mil ton.) China (17,5 mil ton.) y Sri Lanka.(17 mil ton.).

En México esta especia ya se usaba antes de la llegada de los españoles. En la época prehispánica los pueblos indígenas de México usaban los frutos, a los que llamaban xocoxóchitl, para sazonar sus comidas, en combinación con especias, cultivos y frutas de su tierra natal.(Comisión Nacional Forestal, 2005)

A partir del siglo XIX, los estados de Veracruz, Chiapas y Tabasco se convirtieron en los principales productores y, recientemente, Oaxaca, Campeche y Puebla. (SAGARPA, 2006)



Entre 1990 y 2003 la producción total mexicana de pimienta negra aumentó de 868 a 4980 toneladas. La mayor parte de la producción es exportada a América del Sur, los Estados Unidos, Europa (Holanda, Alemania y Francia) y Medio Oriente, y sólo 2.2 por ciento se consume en México. En el año 2003 el valor total de las exportaciones de pimienta alcanzó los 130 millones de pesos. El consumo de pimienta en el 2006 fue de 39 gramos por habitante (SAGARPA, 2006)

Pimienta	Total por 100gr
Contenido energético	331,6kcal
PROTEINAS	10,9 g
GRASAS	3.2g
CARBOHIDRATOS	64.8g
SODIO	44 mg
POTASIO	1260 mg
VITAMINA C	21 mg
VITAMINA A	25 mcg
CALCIO	437 mg

Tabla 2.2 Valor Nutricional de la Pimienta

La pimienta es un cultivo de la zona tropical húmeda y se adapta a altitudes inferiores a 1.000 msnm; los mejores resultados se obtienen en altitudes inferiores a 600 msnm. Requiere un clima caliente y húmedo, con precipitaciones anuales entre 1.500 a 2.500 mm, bien distribuida durante el año, ya que no soporta períodos prolongados de sequía. La temperatura anual media óptima varía entre 25 y 30°C y la humedad entre 60-93%.

Prefiere los suelos de origen aluvial, sueltos y con buen drenaje, por lo que los suelos arcillosos pesados e impermeables no son recomendados. Se recomienda un pH de 5,5, a 6,5 con buen contenido de materia orgánica. Deben ser suelos de excelente fertilidad natural. La siembra se recomienda realizarla en el inicio de las lluvias (mayo-junio). (Martins *et al*, 1998)

2.3 CACAHUATE

(*Arachis hypogaea*)



Figura 2.5 Fruto cacahuete

Maní, nombre común de una planta anual propia de zonas cálidas y de las semillas que produce. El cacahuete es originario de Sudamérica, probablemente de Brasil. Los pueblos indígenas americanos lo cultivan desde la antigüedad. Se conoce también como cacahuete, voz náhuatl. Esta leguminosa alcanza unos 75 cm. de altura y hasta 1,2 m de extensión. Unos tipos desarrollan un porte erguido y compacto, mientras que otros, llamados rastreros, se extienden sobre el terreno. El cacahuete tiene la peculiaridad de que, una vez fecundada la flor, el receptáculo alargado gira hacia abajo desde la base del pedúnculo floral y entierra el ápice del ovario en el suelo, donde se desarrolla el fruto (Microsoft Encarta, 2005).



Figura 2.6 Planta de Cacahuete

El cacahuete necesita sol, una estación vegetativa cálida de 120 a 140 días y precipitación moderada. Prefiere los suelos arenosos bien drenados; los suelos pardos suelen teñir la cáscara. (Microsoft Encarta, 2005)

El cacahuate es nutritivo y energético como se muestra en la Tabla 2.3. La semilla contiene entre un 40 y un 50% de grasas y entre un 20 y un 30% de proteínas y constituye una fuente excelente de vitaminas del grupo B. Se consume crudo, salado, tostado, en forma de crema y de muchas otras formas. El aceite de cacahuate se considera una grasa vegetal de calidad utilizada para cocinar y aderezar ensaladas. (Microsoft Encarta, 2005, Mazzani, 1994)

Los cacahuates así como la mantequilla de cacahuate tienen alto contenido proteico. Cuando se comparan los cacahuates con algunos otros alimentos, los cacahuates tienen mas proteínas que muchas verduras o nueces. Esto es de especial importancia para los niños, vegetarianos y gente que su dieta es libre de carne (Awad *et al*, 2000).

Kilocalorías	166g
Fibra	2g
Proteína	7g
Grasa	14g
Grasa Saturada	2g
Grasa Insaturada	12g

Tabla 2.3 Valor
nutrimental del
cacahuate

El cacahuate posee una de las semillas más susceptibles a la infección por hongos y a la contaminación con micotoxinas de todas las plantas cultivadas. Su formación dentro de los frutos enterrados hace que permanezca mucho tiempo en contacto con la microflora del suelo por lo que es altamente vulnerable de ser infectado por una o más especies de hongos. (Mazzani, 1994)

La presencia de hongos y micotoxinas en las semillas del cacahuate es conocida desde 1960 hasta tiempos modernos, un serio problema para la producción e

industrialización de esta leguminosa en todas las partes del mundo donde se cultiva. (Mazzani, 1994,Mazzani, 1992)

Los hongos ocasionan cambios profundos de las propiedades organolépticas y nutritivas de granos y semillas, matan su embrión y las contaminan muchas veces con micotoxinas generando además un problema de salud pública. Entre las 200 o más especies de hongos capaces de colonizar semillas de maní, se destacan *Aspergillus flavus* y *Aspergillus terreus*; ambos son contaminantes comunes del cacahuete en México (Diener, 1973, Mazzani, 1994).

El problema de la presencia de hongos y micotoxinas en granos y semillas fue considerado por muchos años como el resultado de un manejo inadecuado de éstos durante la poscosecha, especialmente en el almacenamiento (López, 1995). Sin embargo, ha sido demostrado que el problema se origina durante el desarrollo de la planta en el campo, relacionado directamente con factores como el "stress" por sequía y la susceptibilidad del genotipo sembrado (Mazzani, 1994).

2.3.1 El cacahuete en México

Se cultiva en 26 estados del país, en una superficie de alrededor de 90,000 hectáreas. Se producen anualmente 130,000 toneladas. Destacan por su importancia los estados de Oaxaca, Puebla, Chihuahua, Sinaloa, Chiapas y Guerrero, que contribuyen con más del 80 por ciento de la producción nacional (SAGARPA, 2006).

2.3.2 Dificultades de comercialización

Pese a que la siembra y producción nacional se ha mantenido estable, de 1998 a la fecha muchos estados productores, especialmente los que se encuentran más alejados de los grandes centros de consumo, enfrentan crecientes dificultades para su comercialización. (SAGARPA, 2006)

El precario equilibrio de la balanza producción-consumo de cacahuete fue trastocado por las crecientes importaciones, derrumbando no sólo el precio en el mercado nacional, sino dificultando severamente, y en muchos casos impidiendo, la colocación comercial de las cosechas.(SAGARPA, 2006)

2.4 HONGOS

Los hongos son microorganismos eucarióticos no fotosintéticos que poseen paredes celulares rígidas, incluyen desde organismos unicelulares a organismos pluricelulares macroscópicos (Koneman, 1999). Son organismos muy abundantes y ubicuos en la naturaleza; constituyen uno de los cinco reinos de los seres vivos, el reino Fungi (Eumicotas), cuyo origen es polifilético (Whitaker, 1969), del período Precambriano (1 billón de años atrás) (Cook, 1979) (Awad, 2000). Tal reino está clasificado actualmente en Zigomicetes (clase *Zygomycetes*), Ascomicetes (clase [*Ascomycetes*](#)), Hongos imperfectos (clase *Deuteromycetes*), Basidiomicetes (clase [*Basidiomycetes*](#)) y Quitridiomicetes (clase *Chtridiomycetes*).

Tienen una gran diversidad de formas y tamaños y pueden vivir en los sustratos y condiciones ambientales muy variadas; aprovechan elementos nutritivos muy simples. Son organismos heterótrofos y se alimentan por absorción. Carecen de clorofila, y por eso no son fotosintéticos y por lo tanto requieren una fuente externa de carbono, por lo que son clasificados como **saprofitos** (toman sus nutrientes de materia orgánica muerta o en descomposición), **parásitos** (se nutren de materia viva como plantas, animales y humanos (López *et al*, 1995) y **simbióticos** (unidos a otro vegetal al que micorrizan ampliando la red capilar, lo que le aporta agua y nutrientes). Su fuente primordial de nutrientes es a base de CO_2 - H_2O , sales de nitrógeno y de carbohidratos (glucosa, sacarosa y maltosa). Pueden sintetizar proteínas que le son necesarias para su crecimiento y reproducción. Almacenan ácidos grasos, acilgliceroles y glucógeno en vacuolas. Pueden subsistir en rangos de pH muy amplios, la mayoría viven en medios ligeramente ácidos, entre 6.0 y 6.5. La temperatura más adecuada para su desarrollo es de 25-28° C, sin embargo, algunos se encuentran viables a temperaturas de congelación y otros resisten hasta 55° C. La mayor parte de los hongos son **aerobios**, aunque algunos se desarrollan en tensiones altas de CO_2 . La humedad relativa, también es importante para su desarrollo y fructificación; la humedad relativa de 60-80 % favorece el desarrollo de la mayoría de los hongos filamentosos.

Existen dos tipos de células fúngicas, las *somáticas*, que contienen núcleos muy pequeños y su proceso de división es a base de mitosis ordinaria, el segundo tipo de células son las *reproductoras* con núcleos más grandes y división celular a base de meiosis; la célula puede ser uni o multinucleada (Arauz, 1998). En el citoplasma se encuentran varios organelos como mitocondrias, ribosomas, lisosomas, retículo

endoplásmico, microfibrillas, núcleo, aparato de Golgi, etc. (Figura 1) (Bonifaz, 1998).

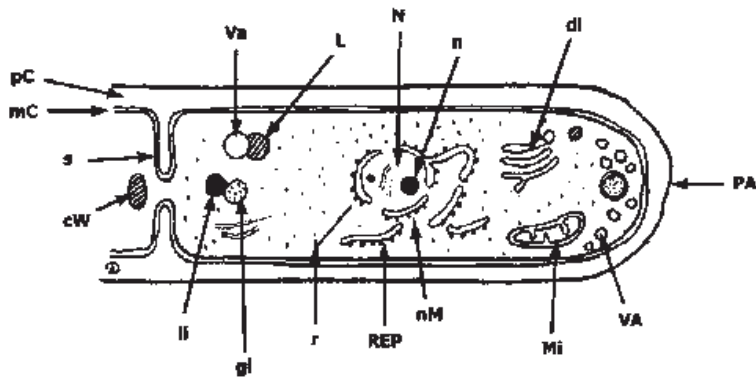


Figura 2.7 Ultraestructura de la célula fúngica.

PA: polo apical; **VA:** vesícula apical; **N:** núcleo; **n:** nucleolo **di:** dictiosomas; **Mi:** mitocondria; **REP:** retículo endoplásmico, **r:** ribosomas; **li:** liposoma; **gl:** pared celular; **mN:** membrana nuclear; **Va:** vacuola; **L:** lisosoma; **pC:** pared celular; **mC:** membrana citoplasmática; **s:** septum; **cW:** cuerpo de Woronin.

Su pared celular y membrana están formadas por varias capas. La pared celular está compuesta de un 80-90% de polisacáridos, siendo el más importante la Quitina (N-acetil-D-glucosamida) (Figura 2), unida por puentes glucosídicos β 1-4.

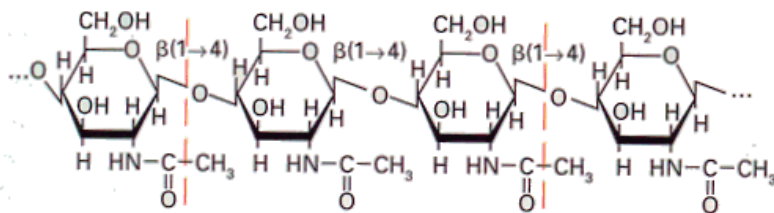


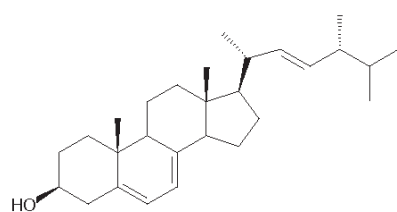
Figura 2.8 Quitina (N-acetil-D-glucosamida)

Es altamente insoluble en agua y en solventes orgánicos debido a los enlaces de hidrógeno que presenta la molécula. La quitina se vuelve soluble en ácidos

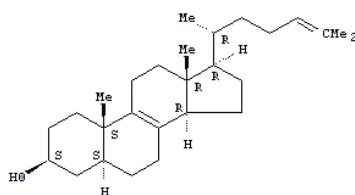
minerales diluidos cuando pierde el acetilo del grupo acetilamino, convirtiéndose en quitosana.

Pueden estar presentes otros polímeros polisacáridos como mananos (polímeros α -1,6 ramificados de manosa), celulosa (polímero β -1,4 de glucosa), galactanos (polímeros de galactosamida) y quitosán en algunos tipos de hongos, además de proteínas, lípidos, polifosfatos así como iones inorgánicos actuando estos como material cementante. Estos compuestos dan rigidez a la pared celular y son de importancia en la taxonomía y propiedades antigénicas (López *et al*, 1995).

La membrana celular basal está bien organizada y tiene gran cantidad de esteroides que son Ergosterol y Zymosterol. El ergosterol es un lípido en el cual actúan la mayor parte de los fármacos antimicóticos, es el esteroide que predomina en las células fúngicas. Da fluidez e integridad a la membrana, permite la función apropiada de muchas enzimas unidas a ellas, favorece la función de la quitina sintetasa, permite el crecimiento y división celular (Arauz, 1998).



Ergosterol



Zymosterol

La unidad microscópica fundamental de un hongo es la estructura filiforme denominada **hifa** (Figura 3). Generalmente miden de 3 a 8 μ m de diámetro y su longitud es variable. Las hifas que están subdivididas en células individuales por paredes transversales o tabiques se denominan tabicadas (septadas) y las que no

tienen paredes son no tabicadas (cenocíticas o aseptadas), estas pueden ser en espiral, nodosas, pectinadas, en candelabro fávico, en raquetas, hifas unicelulares (levaduriformes), pseudhifas y vesiculosas (Bonifaz, 1998).

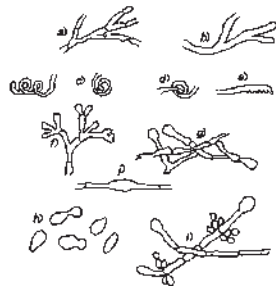


Figura 2.9. Tipos de hifas: a) septadas; b) cenocíticas; c) en espiral; d) nodosas; e) pectinadas; f) en candelabro fávico; g) en raqueta; h) hifas unicelulares; i) pseudhifas; j) vesiculosas. Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

Varias hifas se combinan para formar la masa de desarrollo conocida como **micelio**. Por su función el micelio se clasifica en: **micelio vegetativo** (también llamado de nutrición, se encarga de la absorción y transformación de nutrientes), y **micelio reproductivo o aéreo** (la porción que se proyecta por encima del sustrato, se encarga de soportar las estructuras y formas de reproducción). Por su forma se clasifica en: **filamentoso** (propio de los hongos mohos o filamentos), y **unicelular** (propio de las levaduras). Por el diámetro de las hifas se divide en: **macrosifonado** (diámetro mayor a 1 μm , lo presentan la mayor parte de los hongos filamentosos), y **microsifonado** (diámetro menor a 1 μm , característico de actinomicetos). De acuerdo a la ausencia o presencia de pigmento: **micelio hialino** el cual carece de pigmento, y **micelio pigmentado**, posee pigmento, sobre todo melánico y lo presentan hongos dematiáceos o fuliginosos. De acuerdo a la presencia o ausencia de divisiones o tabiques de las hifas: **septado o cenocítico**.

Al conjunto de micelio organizado y compacto se le conoce como **plectenquima** y se divide en dos grupos: **prosénquima** que es un tejido de hifas paralelas y laxas, del cual existen dos tipos, **estroma**, formado por un tejido similar al de un colchón

que tiene fructificaciones y **esclerocio** o **esclerote**, que se forma cuando hay condiciones adversas, es una estructura de resistencia compuesta por un cuerpo duro que puede pasar largos periodos de tiempo en latencia y germinar hasta que las condiciones sean favorables. El segundo tipo de tejido es el **pseudoprosenquima**, constituido por células compactas, apretadas y bien organizadas (Arauz, 1998).

2.4.1 Reproducción de los hongos

Fase sexual y asexual

A excepción de los Deuteromicetes, los cuales no tienen fase sexual conocida, la mayoría de los hongos poseen una fase asexual y una fase sexual en su ciclo de vida. La fase asexual involucra crecimiento vegetativo y en muchos casos la producción de esporas asexuales (conidias). La fase sexual involucra los procesos de plasmogamia, cariogamia y meiosis, y la formación de esporas sexuales con recombinación de material genético. Existen especies de hongos en las que el micelio es autocompatible, y por tanto pueden llevar a cabo la reproducción sexual con un solo tipo de micelio. Estas especies se denominan **homotálicas**. Por el contrario, las especies **heterotálicas** requieren de la unión de núcleos provenientes de hifas diferentes compatibles (Brock *et al*, 1999).

Los tipos de esporas sexuales (Figura 2.10) son: a) zigosporas, b) oosporas, c) ascosporas y c) basidiosporas.

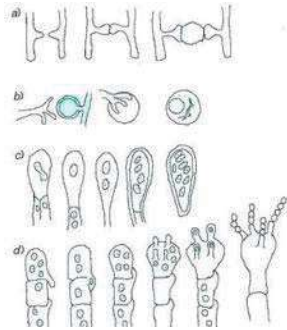


Figura 2.10. Tipos de esporas sexuales. a) zigosporas; b) oosporas; c) ascosporas; d) basidiosporas.
Micología Médica. Procedimientos para el

Zigosporas: Se forman por la unión de dos hifas sexualmente diferenciadas, donadoras (+) y receptoras (-), aunque morfológicamente iguales (homotáticas), una vez que se lleva a cabo la unión se inicia el fenómeno de plasmogonia, de donde se forma un huevo o zigospora, del que posterior a la meiosis nace el nuevo hongo. Reproducción propia de mucorales (*Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*).

Oosporas: Si las células reproductivas fusionantes provienen de dos células diferentes, que suelen ser de segmentos de hifas separados.

Ascosporas: Esporas que resultan de la meiosis y se forman a partir de una bolsa o asca que produce un número determinado y característico de esporas (*Saccharomyces*, *Hansenula*, *Pichia*). Dependiendo de la forma de las ascas o estructuras estromáticas, se dividen en cuatro tipos: ascostromas o ascas desnudas, apotecios, cleistotecios y peritecios.

Basidiosporas: Propias de las setas u hongos macroscópicos, son estructuras unicelulares y haploides, se forman de una bolsa o basidio, contenido en un cuerpo fructífero llamado basidiocarpo, del basidio nacen estigmas que producen las basidiosporas.

La forma sexuada de un hongo se conoce como **teleoforma**, en contraposición al término **anamorfa**, que se refiere a las diferentes formas o estructuras reproductivas asexuadas producidas por los hongos imperfectos (fiálides, anillos, cadenas ramificadas y similares) (López *et al*, 1995).

La reproducción asexual o imperfecta, se presenta un sinnúmero de veces, en un mismo hongo, contrario a la reproducción sexuada, que es una sola vez. Sin embargo las estructuras de reproducción asexual si bien son numerosas, tienen una menor capacidad de adaptación si se comparan con las estructuras sexuales. En la reproducción asexual se reconoce la **reproducción vegetativa** y **reproducción aérea**.

En la reproducción vegetativa existen tres tipos de esporas o conidias que pueden originarse directamente a partir del micelio vegetativo:

Blastoconidias: son formas brotantes características producidas por levaduras. Con frecuencia en el lugar del que se desprende la conidia queda una cicatriz de brotación. Se forman por gemación, pueden ser únicas como en el caso de *C. albicans* o múltiples como *P. brasiliensis*.

Clamidoconidias: se forman a partir de células preexistentes de las hifas, que se engrosan y suelen agrandarse. Pueden encontrarse dentro de las hifas (intercalantes), o a lo largo de sus lados (sésiles) o en su extremo (terminales). Son propias de los hongos mohos. No se consideran formas de reproducción sino de resistencia, por que generalmente nacen en condiciones adversas; y

Arthroconidias: las cuales se forman de la fragmentación de las hifas. Al alcanzar la madurez, estas conidias se liberan por lisis de las células adyacente de la hifa. Este tipo de esporulación es característica de la forma filamentosa del *Coccidioides immitis* y especies de *Geotrichum* (Arauz, 1998).

En la reproducción aérea existen cuerpos de fructificación especializados que se originan de las hifas y se extienden hacia la superficie del micelio, dando origen a una variedad de esporas o conidias. Los cuerpos de fructificación pueden formar sacos cerrados denominados **esporangios**, que son estructuras membranosas en forma de bolsa o saco, en cuyo contenido se albergan y producen esporas denominadas **esporangiosporas**, cuando éstas alcanzan su madurez la membrana se debilita y rompe, por lo que son liberadas (*Mucor*, *Rhizopus*). El segmento especializado de la hifa que sostiene o mantiene al esporangio se denomina **esporangióforo**. Este tipo de esporulación es característico de Zygomycetes. Muchos otros hongos producen cuerpos de fructificación elaborados que dan origen a esporas producidas en la superficie, a los cuales se les aplica el término **conidia** (polvo) (López *et al* 1995), estas estructuras especializadas son esterigmas, vesículas y conidióforos. Los esterigmas son una pequeña ramificación o estructura hifal que puede estar unida al conidióforo; de estas nacen las esporas (*Penicillium*, *Aspergillus*); Los conidióforos son una prolongación del talo que soporta a las conidias. Las vesículas, son una prolongación del conidióforo de forma bulbosa o burbuja.

El conidióforo puede dividirse en segmentos secundarios, productores de esporas, denominados **fiálides**. Una fiálide es una célula conidiógena que produce conidias a

partir de un punto localizado En el extremo, que no aumenta de espesor o longitud durante la conidiogénesis. Esta propiedad de ramificarse en fiálides es característica de los cuerpos de fructificación digitiformes de las especies de *Penicillium*, esta estructura nace del micelio en forma de botella y que internamente produce las esporas asexuales, espulsándolas cuando estas alcanzan su madurez (Arauz, 1998).

Las conidias (Figura 2.11) pueden organizarse en forma aislada, en largas cadenas o en cúmulos densamente unidos. Las conidias pequeñas unicelulares, que en general se originan directamente de los lados de las hifas o están unidas por un conidióforo capilar, se denominan **microconidias**, se presentan de diferentes formas y se encuentran en muchos hongos mohos o filamentosos. Las **macroconidias** son multicelulares, mucho más grandes que las microconidias y adoptan gran variedad de formas y tamaños (*H. capsulaum*, *Fusarium*, *Microsporum* y *Epidermophyton*). Una macroconidia multicelular que está dividida por tabiques transversales y longitudinales que le otorgan un aspecto en mosaico, es un **dictiosporo** (o muriforme, por que recuerda a una pared de piedra). El término **aleurósporo** se refiere a una conidia, generalmente una macroconidia, que por definición está unida a las hifas por medio de una célula de sostén que se fragmenta cuando es liberada (*Microsporum canis*, *Trichophyton*) (López *et al*, 1995).

Cuando las conidias forman cadenas, el proceso por el que se produce por el vértice de una conidia, de tal manera que la célula más antigua se encuentra en la base, se denomina **acrópeto**; la esporulación **basípeta** se refiere al proceso por el cual las nuevas conidias se forman en la base de la cadena, empujando a todas las de la cadena hacia delante, de forma que la más antigua se forma en el extremo.

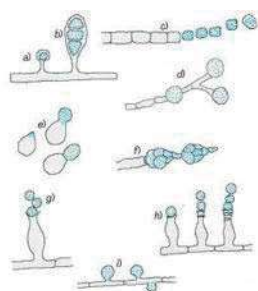


Figura 2.11 Tipos de conidios: a) microconidios; b) macroconidios; c) artroconidios; d) clamidoconidios; e) blastoconidios; f) dictioconidios g) fialoconidios; h) aneloconidios; i) aleurioconidios.
Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

Hay dos tipos de conidias **blásticas y tálicas** (Figura 2.12), en las blásticas hay un proceso de neoformación por síntesis y lisis de material y a partir de una porción de la célula conidiogénica hay un agrandamiento del **primordio**. Posteriormente se forma el **septo** que va a delimitar el nuevo conidio. En la formación de las conidias tálicas, participa la célula conidiógena completa, dándose un proceso de transformación de material.

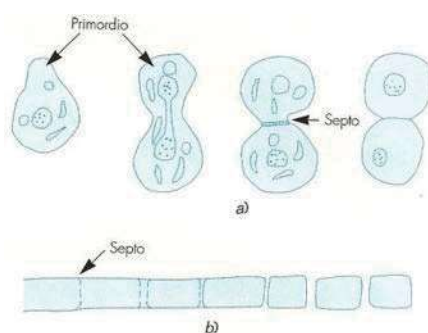


Figura 2.12. Tipos de conidio según su origen. a) conidio blástico; el septo se forma después de iniciado el proceso de conidiogénesis; b) conidio tálico; el septo se forma antes del proceso de conidiogénesis.
Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

El septo se forma antes del proceso de formación y la separación del nuevo conidio se da por **rexólisis** (con referencia a la secesión conidial, ruptura circunstancial de la pared celular por debajo del septo basal de la conidia; la ruptura puede resultar por tensión mecánica, actividad lítica o enzimática), o **esquizólisis** (proceso

enzimático de separación conidial, conidio-célula conidiógena o conidio-conidia a través de la fisión de un septo doble).

Las conidias blásticas (Figura 2.13) pueden ser **holoblásticas** (si en el proceso de formación del conidio participan todas las capas de la pared de la célula conidiógena), o **enteroblásticas** (si solo participa la capa interna de la pared).

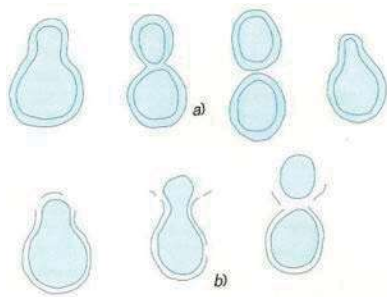


Figura 2.13. Tipos de conidios blásticos. a) conidio holoblástico; en el proceso de formación del nuevo conidio, participan las dos capas de la pared de la célula conidiógena; b) conidio enteroblástico; en el proceso de formación del nuevo conidio participa solamente la capa interna de la pared de la célula conidiógena.
Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

A la vez, las conidias tálicas (Figura 2.14) pueden ser **halotáticas**, **haloártricas** y **enteroártricas**.

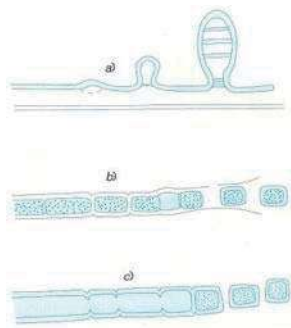


Figura 2.14. Tipos de conidios tálicos. a) conidio holotático; participan las dos capas de la célula conidiógena; b) conidio enteroártrico; solamente participa la capa interna de la pared de la célula conidiógena; los fragmentos se separan, generalmente por rexólisis; c) conidio holoártrico; donde participan las dos capas de la pared de la célula conidiógena y se separan por esquizólisis.
Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

Tomando en cuenta la posición de la conidia (Figura 2.15), respecto a la célula conidiógena, puede ser del tipo **Terminal** (cuando el conidio se origina en el extremo distal de una hifa); **basípeta** (cuando el conidio más joven se localiza en la base de una cadena de conidios); **acrópeta** (cuando el conidio más joven se

localiza en el extremo distal de una cadena de conidios); y **sincronógena** (varios conidios se desarrollan al mismo tiempo a partir de la célula conidiógena).

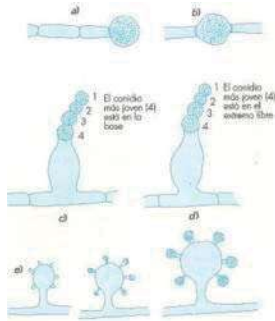


Figura 2.15. Clasificación de los conidios en relación con la célula conidiógena: a) terminal; b) intercalar; c) basípeta; d) acrópeta; e) sincronógena.
Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

Según el orden de distribución del conidio en relación con otros conidios (Figura 2.16) puede ser: **solitario** (se origina de manera aislada), **en cadena** (los conidios están colocados y unidos uno después del otro) y **botrioso** (se originan varios conidios al mismo tiempo a partir de la misma célula conidiógena en diferentes puntos).

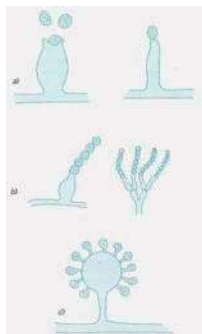


Figura 2.16. Clasificación de los conidios de acuerdo con su posición con respecto a otros conidios. a) solitario; b) catenuado; c) botrioso.
Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

Según las modificaciones de tamaño que sufre la célula conidiogénica (Figura 2.17) en el proceso de la conidiogénesis, esta puede ser **determinada** (el tamaño de la

célula conidiógena no se modifica), **proliferativa** (cuando después de haber producido un conidio, la célula conidiógena sufre un alargamiento antes de originar un nuevo conidio, este proceso puede ser de tipo simpudial, percurrente o basáuxico) y **retrogresiva** (cuando la célula conidiógena sufre una disminución de tamaño después de la producción de cada conidio).

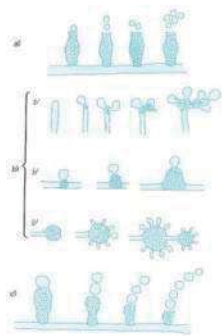


Figura 2.17. Clasificación de las células conidiógenas de acuerdo con la modificación de tamaño o de forma que sufren durante la conidiogénesis. a) determinada; b) proliferativa; b.1) simpodial; b.2) basáuxica; b.3) percurrente; c) retrogresiva.

Microbiología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio

Las células conidiógenas (Figura 2.18) pueden tener ciertas características especiales de tipo morfológico y pueden ser **porógenas** (cuando el punto de origen del nuevo conidio es muy estrecho en comparación con el diámetro del conidio), **fialídicas** (cuando la célula conidiógena presenta una forma de florero o botella y en su extremo distal se puede observar una estructura llamada **callarete**), **anelídicas** (cuando la célula conidiogénica tiene forma tubular y en su extremo distal se observa la formación de una cicatriz en forma de anillo) y **simpodiales** (cuando son el resultado del crecimiento continuo de la célula conidiogénica después de producir cada conidio; este proceso da resultado a una célula de forma y tamaño irregular).

La mayoría de los conidios se forman de manera aislada directamente de la hifa, o bien a partir de un conidióforo, el cual es generalmente una estructura alargada que

se forma por la transformación de la hifa y en cuyo extremo se producen los conidios. Los conidios pueden estar contenidos en una estructura llamada **cuerpos fructíferos**, como son los **picnidios**, **acérvulos**, **esporodoquios** y **synemas** (Bonifaz, 1998).

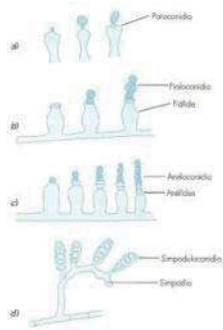


Figura 2.18. Tipos especiales de células conidiógenas. a) porógenas; b) fialídicas; c) anelídicas; d) simpodiales.
Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio.

2.4.2 Clasificación de los hongos

a Phylum Chytridiomycota

Dentro del reino Fungi, los Chytridiomycetes (Figura 2.19) son los únicos que producen células móviles en su ciclo de vida, aunque con un solo flagelo posterior en forma de látigo.

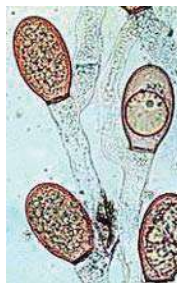


Figura 2.19. Phylum Chytridiomycota.
Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/fungi/fungiclas.htm>

b Phylum Zygomycota

Entre los Zygomycetes quizá los más conocidos sean algunos representantes del orden Mucorales como *Mucor* o *Rhizopus*.

Están caracterizados por un micelio aseptado, cenocítico, con septos en la base de las estructuras reproductoras o septos secundarios. El nombre del grupo proviene de la presencia en parte de su ciclo de una zigospora característica. Pero en todo el grupo también es muy importante la reproducción asexual.

c Phylum Ascomycota

Los Ascomycetes están caracterizados por la presencia en su ciclo de vida (Figura 2.19), de una célula fértil, llamada célula ascógena, denominada asco, que producirá endógenamente 8 ascosporas (típicamente).

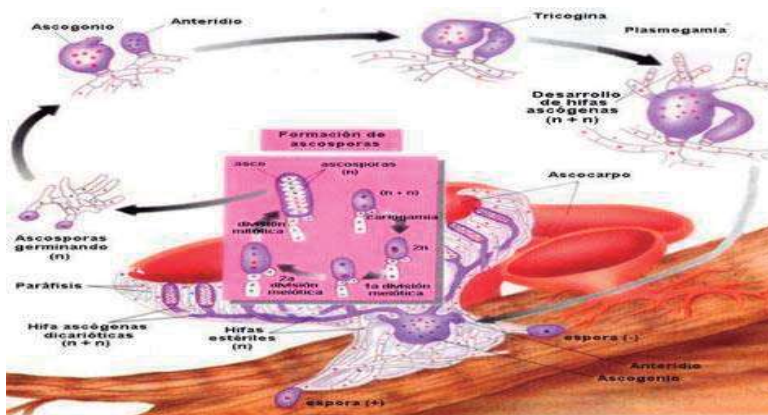


Figura 2.20. Ciclo reproductivo de Ascomycetes.

Fuente: <http://www.biologia.edu.ar/fungi/fungiclas.htm>

Los representantes de este grupo prácticamente se encuentran poblando todo tipo de hábitat, y pueden presentar cualquier tipo de forma de nutrición.

d Phylum Basidiomycota

Incluye a los hongos de mayor complejidad morfológica, entre los que figuran las conocidas setas, yesqueros, cuescos de lobo, hongos gelatinosos, royas, carbones, etc. Su papel en la naturaleza es esencial, ya que degradan la materia orgánica muerta o en descomposición; por ejemplo, entre los yesqueros se encuentran especies capaces de degradar la lignina. Otros, como royas y carbones, son peligrosos fitoparásitos. Por otro lado, el micelio de muchas setas forma ectomicorizas con árboles; su papel para la supervivencia de los bosques es esencial. Finalmente, muchos de estos hongos son cultivados para obtener setas comestibles (*Lactarius indigo*, *Pleurotus ostreatus*), o bien son recolectados en el campo.

La característica común a los basidiomicetos es la presencia de **basidios**, células especializadas que tras la cariogamia y la meiosis producen 4 (a veces más o menos) **basidiósporas** en su parte exterior.

El ciclo vital (Figura 2.20) de un basidiomiceto típico es simple. Aunque hay especies levaduriformes, lo más corriente es que las basidiósporas (haploides) germinen y den lugar a un micelio primario, monocariótico.

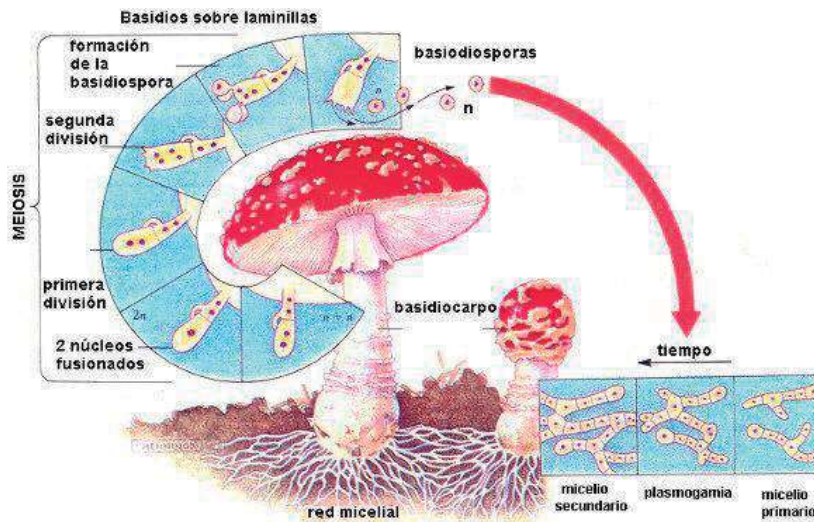


Figura 2.21. Ciclo reproductivo de Basidiomicetos.

Fuente: <http://www.fepade.edu.sv/cra/institutos/infravenz/docs/ciencias/reinofunji.pdf>

Los basidiomicetos producen una amplia gama de productos naturales que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológica hasta agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y aromas; tales componentes son polisacáridos, glicoproteínas y ácidos nucleicos de los que se derivan sesquiterpenos, diterpenos, acetilenos, glicolípidos, policetonas, nucléosidos y sales de diazonio.

Los basidiomicetos Constituyen una clase de hongos, representada por más de 30000 especies, cuyo metabolismo y capacidad de producción ha sido apenas investigada .

e Phylum Deuteromycota

La subdivisión Deuteromycotina comprende una gran cantidad de especies de hongos (unas 1500) en las que la reproducción se realiza solamente por mecanismos asexuales o ara sexuales. Debido a que los deuteromicetes

aparentemente carecen de una fase de reproducción sexual, también llamada “perfecta”, por lo común son denominados “hongos imperfectos” o, técnicamente, “Fungi Imperfecti”. (Constantine, 2004)

La inmensa mayoría de los hongos deuteromicetes es terrestre, aunque hay muchos acuáticos tanto marinos como dulce acuícola. La mayor parte de ellos son saprobios o parásitos débiles en plantas. Muchos son de gran importancia por parasitar y causar enfermedades severas de plantas, animales y seres humanos. Para el hombre son de gran trascendencia las actividades químicas de estos hongos, algunos de los cuales son utilizados en la producción industrial de diversas sustancias, incluyendo los antibióticos. (Teofilo, 1990)

ESTRUCTURAS SOMATICAS

Con la excepción de un talo unicelular o seudomicelial de los organismos incluidos en los Blastomycetes, es decir, las levaduras imperfectas, los Deuteromycotina forma un micelio bien desarrollado, septado y ramificado, con los compartimentos o células generalmente multinucleados. Los septos en las hifas en la mayoría de las especies son con un poro central que permite el paso de núcleos y organelos citoplásmicos de un compartimiento a otro. (Teofilo, 1990)

ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

Se reproducen por medio de esporas especiales conocidas como conidios. Un conidio es una espora asexual, no móvil, usualmente formada en el ápice o en la parte lateral de la célula fértil especializada llamada célula conidiogena.

Dentro de los hongos imperfectos existe una inmensa variedad de tipos de conidios. Estos, que según las especies adoptan casi todas las formas imaginables, pueden

ser esféricos, ovoides, elipsoidales, alongados, cilíndricos, filiformes, espirados, estrellados o de otras formas. Además pueden ser unicelulares u multicelulares, con septos transversales únicamente o con septos longitudinales además de los transversales.

Los conidioforos que también pueden o no ser morfológicamente semejantes a las hifas somáticas, son hifas simples o ramificadas que se originan de las hifas somáticas, pero con una o mas células conidiogenas que tiene la función especial de producir conidios.(Teofilo, 1990)

E.1 SINEMA

También conocido como coremio, consiste en un paquete de conidioforos erectos, generalmente unidos en la base y parte de su longitud. En algunas especies, el crecimiento del sinema es indeterminado y los conidios pueden ser producidos lateralmente a todo lo largo de los conidioforos del sinema, así como también es su parte apical; en otras especies el crecimiento es determinado el ápice del sinema es parte fértil y los conidios se originan de las células conidiogenas localizadas en las puntas de las ramas de los conidioforos. La parte basal de un sinema es generalmente estéril. Dependiendo de la especie los sinemas pueden tener conidios secos o conidios embebidos en mucílago formando una gota en el ápice.(Constantine, 2004)

E.2 ESPORODOQUIO

En un esporodoquio, los conidioforos se originan de un estroma central pulvinado, es decir, en forma de cojín, formando paquetes erectos generalmente mas cortos que los de un sinema. En sustratos naturales los conidioforos generalmente

irrumpen a través de la corteza o de la epidermis, de manera que la parte estromática del esporodoquio, que puede ser escasa o muy extensa, se encuentra inmersa, mientras que la parte fértil está expuesta. (Teofilo, 1990)

E.3 ACERVULO

Es un esporoforo compuesto, típicamente plano o en forma de plato, de donde crecen conidioforos generalmente cortos que producen conidios embebidos en mucílago de diversos colores según la especie. Los conidioforos forman una empalizada y crecen a partir de una masa de hifas más o menos estromática que en condiciones naturales es producida bajo la cutícula o bajo la epidermis de hojas, tallos o frutos de plantas que sirven de hospedantes. (Teofilo, 1990)

E.4 PICNIDIO

Es una fructificación que, según las especies, es globosa o en forma de botella, a veces completamente cerrada, y que al madurar se rompe irregularmente, o puede tener un ostíolo a través del cual liberan las esporas; puede poseer una papila o un cuello largo en la punta del cual se encuentra el ostíolo.

2.5 CLASIFICACION DE DEUTEROMYCOTA

Los fungi imperfecti se dividen en cuatro órdenes:

Moniliales: Conidioforos formados individualmente, o en un esporodoquio o en un sinema, pero nunca en un acervulo o en un picnidio

Malenconiales. Conidioforos producidos en un acervulo.

Sphaeropsidales. Conidioforos producidos en un picnidio.

Mycelia sterilia. Sin conidioforos ni conidios

2.5.1 Clase Hyphomycetes

Es la clase de deuteromycetes con mayor numero de especies, aproximadamente 10 000, y tienen una gran importancia directa e indirecta para el hombre. Los Hyphomycetes producen sus conidios en conidióforos solitarios o en conidióforos agrupados en sinemas o en esporodoquios. (Moore-Landecker,)

a Orden moniliales

Es un grupo muy grande, que comprende mas de 7000 especies de hongos, muchas de ellas de inmensa importancia para el hombre, ya sea como patógenas de plantas, animales y el hombre, como hongos utilizados en la industria , o como participantes de fenómenos biológicos y ecológicos muy interesantes que suceden en el suelo, unos como saprobios y otros como parasitos o depredadores de pequeños animales.

Los Moniliales se dividen en familias Agonomycetaceae, Moniliaceae, Dematiaceae, Stilbellaceae y Tuberculariaceae (de las cuales solo se mencionaran las encontradas en este experimento) Moniliaceae y Dematiaceae.(Herrera, 1990)

b Familia Moniliaceae.

Esta es la familia con mayor número de especies entre los Moniliales. Incluyen todo los hongos imperfectos que producen sus conidios en conidioforos hialianos, o directamente de hifas hialianas no diferenciadas en conidioforos; los conidioforos y conidios son hialinos o de colores claros. La mayoría de las especies son saprobias, pero muchas otras son patógenas del hombre.

b.1. Aspergillus

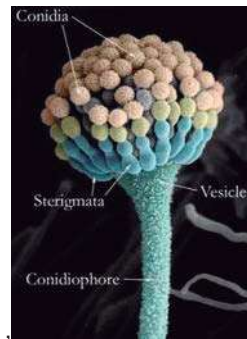


Figura 2.22 estructura
Aspergillus

A esta familia pertenecen las numerosas especies de *Aspergillus*, de gran importancia para el hombre. Del género *Aspergillus* han sido descritas unas 200 especies y una gran cantidad de variedades. Los conioforos de *Aspergillus* terminan en un hinchamiento llamado vesícula, a partir de la cual nace en su superficie una hilera de fialides o una de metulas y sobre estas una hioera de fialides productoras de conidios tipo fialosporas, es decir conidios blasticos generados en sucesión basípeda. A la vesícula junto con las cadenas de conidios se les conoce como cabeza conidial. *A. flavus* es un ejemplo de cabeza conidial biseriada; *A. clavatus* representa una especie con cabeza conidial uniseriada. El genero *Aspergillus* es de las especies que presentan una mayor distribución geográfica, encontrándose desde las regiones árticas hasta el Ecuador. Los aspergilos son de los hongos más omnívoros que existen, capaces de asimilar como alimento una enorme variedad de sustancias. Debido al gran numero de enzimas que pueden producir para degradarlas. (Herrera, 1990, Moore-Landecker)

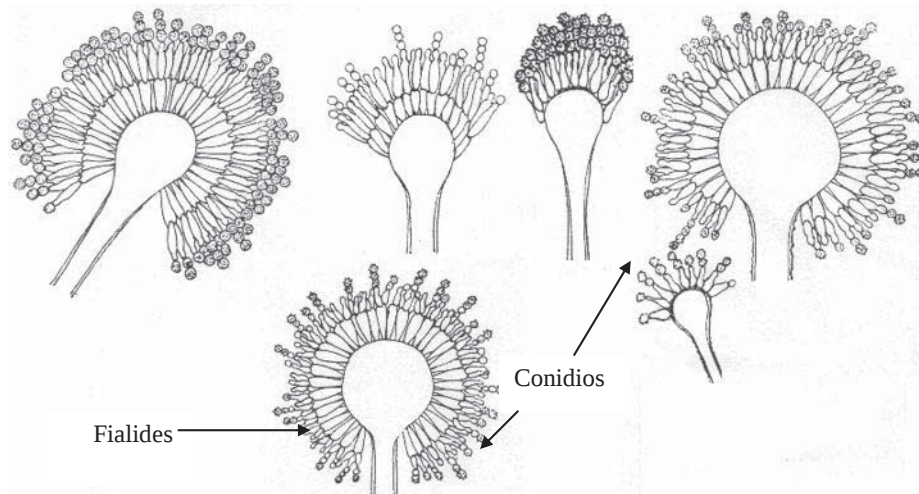


Figura 2.23 Fialides y Conidios de *Aspergillus*

Los dos requisitos principales que deben tener los diferentes sustratos para que se desarrollen estos hongos son la presencia de algún tipo de materia orgánica y un poco de humedad; si ambos factores están presentes, los aspergilos pueden crecer casi en cualquier sustancia. Hay especies de *Aspergillus*, así como *A. clavatus*, *A. repens*, *A. glaucus*, *A. Níger*, *A. flavus*, *A. obhraceus*, *A. candidus*, *A. fumigatus* y *A. restrictus*, entre otras, que comúnmente se desarrollan en granos, semillas y alimentos para humanos provocando su descomposición además de producir sustancias tóxicas, llamadas micotoxinas, que ocasionan diversos trastornos.

Debido a las grandes actividades enzimáticas de los aspergilos, varias especies son utilizadas en diversos procesos industriales para la elaboración comercial de productos que abarcan desde ácidos orgánicos hasta enzimas, antibióticos y alimentos fermentados de varias clases, estos últimos en países orientales (Moore-Landecker,)

b.2 *Aspergillus fumigatus* Fresenius

Posición taxonomica
Phylum: Ascomycota
Clase: Eufungi
Orden: Eurotiiales
Familia: Trichocomaceae

Hongo filamentoso con conidióforos cortos (300 x 3-8 μm), de pared lisa, incoloros o ligeramente verdosos, sin tabicar y sin ramificaciones. Nacen de una célula base del micelio, ensanchado al final en una vesícula amplia, coronada de esterigmas en forma de redoma. Esterigmas de una sola serie que nacen de la zona media de la cúpula vesicular y cubren particularmente la superficie de la vesícula. Conidios verdes oscuros, unicelulares, redondos o pseudo esféricos formando cadenas largas que se ramifican y permanecen unidos formando columnas (200 a 400 μm de longitud).

Colonias de crecimiento rápido, planas, vellosas, compactas, blancas al comienzo, toman rápidamente un color verde grisáceo, de aspecto aterciopelado y consistente. La superficie muestra algunos pliegues y mechones vellosos blancos. Dorso incoloro que, al envejecer, toma tintes amarillos o pardos. Su crecimiento es mas rapido a 37 °C.

Aspergillus fumigatus es un saprobio cosmopolita es saprobio cosmopolita que se ha aislado prácticamente de cualquier tipo de sustrato, especialmente del suelo y materiales orgánicos en descomposición. A pesar de esta amplia distribución, la concentración de esporas en la atmósfera es baja en comparación con otros alergenicos aerotransportados, como *Cladosporium herbarum* o diferentes tipos de polen. El polvo de las casa es un nicho ecológico muy adecuado. La especie es termotolerante y es capaz de crecer entre los 12 y los 57 °C. Es capaz de crecer en

la atmósfera que contenga un 100% de N y tolera atmósferas capnófilas (que requiere de concentraciones elevadas de dióxido de carbono) *in Vitro* (10% de CO₂). También es capaz de soportar una pasteurización a 63°C durante 25 min y provoca un calentamiento del heno y el maíz alterado que alcanza una alta temperatura (50°C). Este hongo produce un importante número de metabolitos específicos que poseen efectos antibióticos y tóxicos, como esfingofúngicas, espinulosina, ferricrocina, festuclavina, filostina, fumagilina, fumiclavina, fumifungina, fumigacina (o ácido helvólico), fumigatina, fumitoxinas, fumitremorgina, fisígeno, gliotoxina, tripacidina, triptoquivalinas, verrucologeno.

Aspergillus fumigatus es un patógeno humano muy importante y puede causar enfermedades invasoras graves en personas inmunosuprimidas. La mortalidad es muy elevada en las aspergilosis pulmonares necrotizantes o en las aspergilosis diseminadas. Entre los factores que contribuyen a esta mortalidad elevada están la gravedad de la enfermedad subyacente (que suele cursar con neutropenia severa), el diagnóstico tardío y difícil de la infección y la variable respuesta al tratamiento antifúngico tradicional que consiste en anfotericina B intravenosa o itraconazol intravenoso u oral.

La alveolitis alérgica (pulmón de granjero), el asma o la rinitis alérgica pueden desarrollarse después de la exposición a conidios de *Aspergillus*, como ocurre cuando se trabaja con heno mohoso o como en los casos de estipatosis por inhalar el polvo de las fibras de paja –*Stipa tenacissima*– que contienen *Aspergillus fumigatus* y actinomicetes termófilos. *Aspergillus fumigatus* es también responsable de muchos casos de aspergilosis broncopulmonar alérgica y aspergiloma, dos condiciones clínicas en las que dicho hongo actúa como colonizador bronquial y no

un invasor tisular. En la aspergilosis broncopulmonar alérgica desencadena una hipersensibilidad de tipo I además de contar con la acción ocupante de espacio del crecimiento fúngico. El aspergiloma es un crecimiento fúngico miceliar en forma de pelota en una caverna preformada dentro del parénquima pulmonar (muchas veces postuberculosa). Ambas entidades clínicas pueden presentar signos radiológicos que ayudan en el diagnóstico.(Hotta, 2002)

b.3 *Penicillium*,

Otro integrante de esta numerosa familia y de importancia en este trabajo son las especies del género *Penicillium*, tan diversas o más que el género *Aspergillus*.

También son de los hongos más abundantes y de mayor distribución geográfica que existen cuando menos 150 especies, muchas de las cuales tienen una morfología muy similar (Pianosi); tan omnívoros como *Aspergillus* los penicilios proliferan en multitud de ambientes y se manifiestan en procesos biológicos que afectan la vida del hombre.

Los conidioforos de *Penicillium* se caracterizan por adoptar un cierto tipo de ramificación, dependiendo de las especies, y producen ramas, metulas y fialides con cadenas de conidios secos; los conidios son de tipo fialoconidios o fialosporas, y son generados blásticamente en sucesión basípeta. La morfología de los conidioforos es importante para diferenciar las especies (figura 2.23); se considera principalmente si los conidioforos son **monoverticilados**, **biverticilados** o **poliverticilados o terverticilados**, y si la ramificación es simétrica o asimétrica entre otras características.(Herrera, 1990)

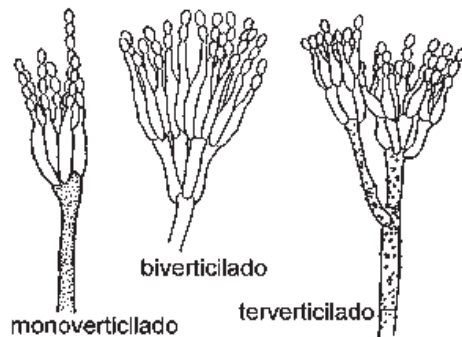


Figura 2.24 Morfología de los conidioforos de *Penicillium*

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

El género *Penicillium* está subdividido en grupos o subgéneros de acuerdo a la morfología de los pinceles aunque también se tiene en cuenta la velocidad de crecimiento.

Otro aspecto en el que los penicilios son muy importantes es, desde luego, la producción industrial de antibióticos. Aunque hay varias especies de *Penicillium* capaces de sintetizar penicilina, el antibiótico mas famoso, con ciertas cepas seleccionadas de *P. notatum* y *P. chrysogenum* son las que de manera eficiente y

controlada son las que se utilizan para la producción industrial de este antibiótico. La griseofulvina es un antibiótico importante, relativamente nuevo, producido por *P. griseofulvum*, que constituye una sustancia efectiva en el tratamiento de varias dermatofitosis, como las tiñas de la cabeza, de las uñas o de los pies. (Moore-Landecker,)

C Familia Dematiacea.

Estos hongos se caracterizan por tener hifas y conidios de color oscuro, aunque hay casos en que solo las hifas o los conidios en cuerpos fructíferos lo tienen. Los hongos dematiáceos, al igual que los moniliáceos tampoco producen sus conidios en cuerpos fructíferos o esporóforos complejos. En cuanto a su modo de vida la mayoría de las especies es saprobia, pero también hay parásitas de plantas, animales y humanos. Los hongos del género *Alternaria* presentan una distribución mundial. Varias de las especies viven como saprobias en una multitud de medios distintos.

Otras especies comunes de Dematiáceos pertenecen a los géneros *Bipolaris*, *Cercospora*, ***Cladosporium***, *Curvularia*, *Drechslera*, *Helminthosporium*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Helminthosporium*, *Humicola*, *Nigrospora*, *Torula* y *Charala*.

c.1 *Cladosporium*

Las especies de ***Cladosporium*** se encuentran entre las más abundantes en la naturaleza. Típicamente producen conidios holoblásticos en cadenas con sucesión acrópeta, generalmente unicelulares, aunque también se forman los llamados ramoconidios, con uno o dos septos; ambos tipos de conidios se reconocen fácilmente por las cicatrices polares(hilos) que aparecen como anillos oscuros, en

vista frontal, o como bandas oscuras, en vista lateral. *C. cladosporioides* es una de las especies de *Cladosporium* más comunes

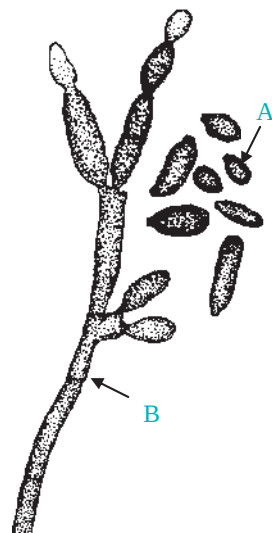


Fig. C.a.1 Cladosporium herbarum, A conidia, B conidioforo

Cladosporium herbarum

Descripción morfológica

Hongo filamentosos con conidioforos (de hasta 250 x 3-6 µm) con cadenas ramificadas de conidios elipsoides o cilíndricos de extremos rodeados (5,5-13 x 3,8-6 µm), formados por gemación sucesiva del conidio anterior. (Aristegui, 2003)

Colonias de crecimiento lento, planas, finamente vellosas, aterciopeladas o lampiñas, de color verde oliva o pardo oliva, reverso negro oliva.

Los conidios de *Cladosporium* se encuentran frecuentemente en el aire libre en las zonas templadas del planeta. Produce abundantes conidios que pueden encontrarse en la atmósfera a lo largo del año, con mayores concentraciones en las últimas semanas de verano y primeras de otoño, especialmente en las zonas boscosas y en el centro de las ciudades. Coloniza frecuentemente hojas y plantas,

especialmente gramíneas, suelo y alimentos. Cuando se corta el césped o se podan los árboles aumenta considerablemente el numero de conidios aerotransportados a larga distancia. Las concentraciones de conidios por metro cúbico son hasta diez veces mayores que las de polen y se han llegado a contar hasta 35000 conidios por metro cúbico. La temperatura optima de crecimiento se sitúa entre 18 y 28 °C pero también puede crecer a temperaturas tan bajas como -6°C. Este hongo se ha aislado en lugares tan diversos como tejados de paja, depósitos de combustible, cremas faciales, pinturas o ropa.

La concentración de conidios en espacios cerrados es un reflejo de la elevada concentración de conidios en el exterior. (Aristegui, 2003)

Las enzimas producidas por *Cladosporium herbarum* han sido utilizadas en la síntesis y transformación de esteroides como la pregnenolona y la progesterona, empleados como fármacos anticonceptivos. También se utiliza su cultivo en gran escala para producir biomasa que sirve de materia prima en la industria farmacéutica para la preparación de extractos alérgicos estandarizados que son útiles en el diagnóstico y tratamiento de las alergias respiratorias. (Kungu, 2005)

ENFERMEDAD HUMANA

Cladosporium herbarum es el hongo que con mas frecuencia se encuentra en el aire, es uno de los hongos alérgicos respiratorios mas importantes y se le ha implicado en casos de asma y fiebre del heno.

La composición antigénica de *Cladosporium herbarum* se ha estudiado en profundidad y se ha observado que es muy variable entre los aislamientos obtenidos de este hongo. Se conocen mas de 60 extractos antigénicos (Aristegui, 2003)

No es un agente infeccioso importante pero, en climas calidos, puede producir infecciones cutáneas, subcutáneas (feohifomicosis o cromomicosis) y queratitis. Estas infecciones tienen un desarrollo lento y su tratamiento incluye la exeresis quirúrgica de los tejidos afectados en combinación con el empleo de anfotericina B. (Kungu, 2005)

POSICION TAXONOMICA

Phylum: Ascomycota

Clase: Euascomycetes

Orden: Dothideales

Familia: Mycosphaerellaceae

2.6 ACTINOMICETES

Son bacterias filamentosas, que se presentan como filamentos muy ramificados, como se muestra en la figura (c.2).

Producen esporas libres o en estructuras especializadas llamadas esporangios, algunas esporas pueden ser móviles por flagelos, otras son inmóviles. La mayoría son aerobias, aunque existen algunas anaerobias facultativas u obligadas. Quimioheterotróficas. Se encuentran libres en diferentes hábitats, algunas son patógenas del hombre, animales o plantas y otras hacen simbiosis con las plantas y fijan nitrógeno. Presentan especies saprófitas

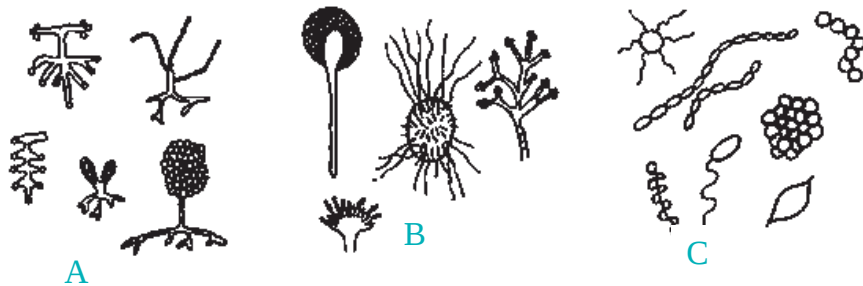


Fig C.2. Diferencia morfológica entre: A Actinomicetes, B Hongos, C Bacterias

GENERO

2.6.1 *Nocardia*

Actinomicetos con hifas aéreas, que pueden formar cadenas cortas de esporas, las hifas sobre sustratos se fragmentan en formas bacilares o cocoides inmóviles, son aerobios, Gram positivos o Gram variables. Quimiorganótrofos. Habitan en el suelo, aguas dulces y marinas y en animales.

***N. hyrocarboxydans*, *N. petroleophila*:** tienen importancia industrial por transformar el petróleo en proteínas.

***N. asteroides*:** causa nocardiosis sistémica o nocardiosis pulmonar y neural en humanos, siendo patógeno oportunista.

***N. brasiliensis*:** causa micetomas en tejidos, patógeno obligado.

***N. otitidiscaviarum*:** infecciones cutáneas y subcutáneas

2.6.2 *Rhodococcus*

Bacilos con ramificaciones, pueden formar micelios vegetativos. Dependiendo del estado de su ciclo de vida, pueden tener forma cocácea, filamentosa o formar hifas.

Son Gram positivos, aerobios.

Ampliamente distribuidos en suelo, algunos saprófitos y algunos patógenos de animales incluyendo el hombre.

R. rhodochrous: especie tipo.

Géneros

Streptomycetaceae

2.6.3 *Streptomyces*

- Producen hifas vegetativas y micelios no fragmentados.
- Producen esporas inmóviles y una gran variedad de pigmentos.
- Productores de antibióticos y moduladores de la actividad de enzimas de células eucariotas.
- Son Gram positivos, aerobios y quimiorganótrofos.
- Reducen nitratos a nitritos, algunas especies pueden ser psicrófilas y otras termófilas.
- Ampliamente distribuidos en el suelo. Algunas especies son patógenas de animales, humanos y plantas.

S. albus: especie tipo. No produce pigmentos. Pueden ser patógenos para el hombre

S. griseus: produce estreptomicina, activo contra muchas especies Gram negativas.

S. rimosus: produce terramicina, activa contra *Aspergillus niger*.

S. venezuelae: produce cloramfenicol que tiene un amplio rango de acción.

***S. antibioticus*, *S. chattanoogensis*:** actividad antimicrobiana contra *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*.

***S. scabies*:** patógeno de vegetales, causa la sarna de la papa.

2.7 MICOTOXINAS

DEFINICION DE MICOTOXINAS

Las micotoxinas son compuestos ubicuos así como metabolitos secundarios tóxicos producidos por ciertos hongos y que en pequeñas cantidades producen afecciones o cambios en plantas, animales y humanos.

La humanidad se ha beneficiado de muchos de estos metabolitos como es el caso de los antibióticos, pero a través de la historia ha sufrido diversas enfermedades por la acción de diversos productos tóxicos de los hongos que contaminan alimentos.

Estas sustancias pueden estar presentes en alimentos, sin que necesariamente esté presente el hongo que las liberó (Dalvi, 1991, Romero, 1999) Difieren mucho en sus propiedades químicas, biológicas y toxicológicas, estas se producen cuando la fase de crecimiento llega a su etapa final y durante la fase estacionaria, estando a menudo asociados con la diferenciación y la esporulación. (Willard, 1995, Gonzalez, 2006).

2.7.1 EFECTOS EN LA SALUD

Las micotoxinas conocidas, que normalmente se manifiestan al poco tiempo de la ingestión de los alimentos contaminados, se originan por el consumo de productos altamente enmohecidos, por la escasez de alimento o por el desconocimiento de las posibles consecuencias. Actualmente las micotoxinas mas peligrosas para el

hombre son producidas por los hongos del genero *Aspergillus* (aflatoxinas). Estas se aislaron por primera vez de los hongos *Apergillus flavus* y *Aspergilus parasiticus* (Gonzalez, 2006).

Estos compuestos se han implicado en la etiología de numerosas enfermedades humanas. Los órganos y sistemas mas afectados incluyen el sistema nervioso central, sistema gastrointestinal, sistema inmune, hígado, riñón y piel (Hsieh, 1988, Willard, 1995).

2.8 SISTEMA BIOLOG

La información codificada del genoma de una célula es reflejada como rasgos celulares o fenotipos, cuyo conocimiento es necesario para identificar los efectos de mutaciones en el genoma y para determinar la función del gen. Una técnica desarrollada para el análisis de rasgos fenotípicos de la célula emplea el sistema Biolog mediante la utilización de microarreglos fentípicos, y se basa en el metabolismo del carbono, del nitrógeno, del fósforo y del azufre por el microorganismo.

El sistema Biolog esta conformado por una microplaca de 95 pocillos que contienen fuentes de carbono diferentes y utiliza violeta de tetrazolio como colorante para detectar la respiración celular; durante el metabolismo de nutrientes. En un organismo existe flujo de electrones desde la fuente de carbono hacia NADH, mediante la cadena de transporte de la célula, el NADH producido cede sus electrones al tetrazolio y entonces se hace evidente la reacción mediante la formación de un color púrpura en el pocillo (Druzhinina y colavoradores, 2006).

3. JUSTIFICACIO

Conocer la flora fúngica presente en alimentos tales como el pistache, el cacahuete y la pimienta, es importante porque son alimentos de alto consumo, cuya contaminación no es monitoreada estrechamente como es el caso de los cereales, incluyendo al maíz.

Los trabajos que han analizado la flora fúngica en alimentos basan la identificación de los hongos en base a sus características microscópicas y macroscópicas (Abdel-Gawad and Zohri, 1993; Lozada, 1995; Pacin *et al*, 2002). En algunos otros, se han llevado a cabo utilizando técnicas de biología molecular (Sanchez-Rangel *et al*, 2005; Jurado *et al*, 2006). La identificación de hongos en base a sus características metabólicas usando el sistema Biolog ha sido muy poco utilizada porque dicho sistema es más bien utilizado en la tipificación de bacterias. Así que en este trabajo se propone el uso del sistema Biolog para identificar la flora fúngica presente en las muestras de pistaches, cacahuete y pimienta negra y de esta manera conocer si tales muestras contienen o no hongos micotoxinigénicos

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar la composición de la flora fúngica presente en pistaches, cacahuates y pimienta negra

4.2 Objetivos Específicos

- Obtener muestras representativas de pistaches, cacahuates y pimienta negra del Estado de Michoacán
- Determinar si existe contaminación fúngica en las muestras recolectadas.
- Aislar e identificar los hongos que logren crecer en las muestras
- Utilizar al menos dos estrategias de identificación de los hongos.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Muestras

Las muestras se recolectaron en diferentes municipios del Estado de Michoacán tal como se muestra en la Tabla 6.1. Se colocaron 100 g dentro de bolsa de cierre hermético y se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento.

5.2 Medio de Cultivo

Se utilizó Agar Papa Dextrosa (PDA por sus siglas en Inglés) con el fin de conservar el micelio de las cepas estudiadas. Se empleó un medio de cultivo comercial (BD BIOXON). El medio fue preparado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.3 Aislamiento de Muestras

Se tomaron tres ejemplares de cada tipo de muestra y se lavaron 3 veces con una solución de hipoclorito de sodio al 1%. Se enjuagaron con agua destilada estéril hasta eliminar el aroma de hipoclorito. Se colocaron en cajas de Petri que contenían medio PDA y se incubaron (LAB-LINE BIOTRONETE PLANT GROWTH CHAMBER) por 15 días a 28°C.

De las muestras que presentaron crecimiento de hongos se hicieron pases para de esta manera aislar las colonias en PDA por otros 15 días a 28°C.

5.4 Identificación de Colonias

5.4.1. Identificación por Morfología Colonial

Se hizo una primera identificación por la morfología colonial y por observación microscópica (Leyca CME) de las estructuras fúngicas.

5.4.2 Identificación por Biolog

Fluido de Inoculación.

Para inocular placas de Biolog^{MR} se utilizó el fluido especificado por el proveedor (FF INOCULATING FLUID, BIOLOG, Hayward, CA 94545), el cual contiene: Tween 40, 0.23% y Gellan Gum (Phytigel). El fluido se preparó al 0.25% siguiendo las especificaciones del proveedor: se hirvió un litro de agua destilada y se añadieron 2.5g de Gellan Gum y 0.3 g de tween 40. La solución se mantuvo en agitación constante hasta que la solución se tornó clara, indicando con eso que los componentes han sido debidamente disueltos.

Posteriormente se dejó que el fluido alcanzara una temperatura de 45°C y el líquido se colocó en tubos de 20 X 50 con tapa de rosca, con un volumen de 16 mL en cada tubo; finalmente, estos se esterizaron a 121°C durante 15 minutos.

Utilización de fuentes de carbono mediante el sistema Biolog.

A. Obtención del preinoculo

Las cepas se dejaron crecer en PDA a 28°C hasta su etapa logarítmica y con el micelio se preparó la suspensión de incubación para las placas Biolog. Se inocularon varios medios por cepa para obtener el micelio suficiente para la posterior preparación de la suspensión.

B. Preparación de la suspensión.

Después de que el hongo ha crecido hasta encontrarse en la etapa logarítmica media se procedió a preparar la suspensión; para este fin se utilizó una espátula de metal estéril con la cual se cosecho el micelio de la placa y se colocó en un mortero previamente esterilizado en el cual se maceró el hongo hasta que el micelio fue pulverizado en pequeñas partículas, agregándole posteriormente 2-3 mL del fluido de inoculación.

Para preparar la suspensión, se debe estandarizar el fluido y ajustarlo a 0% T haciendo esto con un turbidímetro y el estándar específico para hongos filamentosos (FF), con el fluido se ajusta a 0 T y en seguida se coloca el estándar que debe dar una lectura de 75% T y, basándose en ese grado de turbidez, se procede a preparar la suspensión, con un margen de error de $\pm 2\%$. La suspensión del hongo debe ser uniforme para evitar interferencia en la lectura del turbidímetro esto se logra agitando unas cuantas veces.

C. Inoculación e incubación de las microplacas para hongos filamentosos Biolog.

La inoculación de las placas, al igual que las lecturas en el sistema Biolog, se realizó en las condiciones establecidas anteriormente para cada cepa. La suspensión obtenida del micelio del hongo, se vertió sobre el reservorio multicanal estéril; para inocular la microplaca se empleó una micropipeta electrónica, programada previamente para despachar 100 μ L en cada uno de los pocillos de la microplaca. Una vez inoculadas las microplacas se incubaron a 28°C, realizando lecturas a las 24, 48, 72 y 96 h en la Microestación del sistema Biolog.

A1 Water	A2 Protein 90	A3 Hydrolytic O- Glycosaminoglycan	A4 Hydrolytic O- Glycosaminoglycan	A5 Hydrolytic O- Glycosaminoglycan	A6 Aspartic Acid	A7 Arginine	A8 D-Glucose	A9 L-Valine	A10 D-Valine	A11 Protein	A12 D-Glucose
B1 D-Glucose	B2 D-Glucose	B3 D-Glucose	B4 Hydrolytic O- Glycosaminoglycan	B5 D-Fructose	B6 L-Ascorbic Acid	B7 D-Glucose	B8 D-Glucose	B9 D-Glucose	B10 D-Glucose	B11 D-Glucose	B12 D-Glucose
C1 Glucose-1- Phosphate	C2 Glucuronamide	C3 D-Glucose	C4 Glycine	C5 Glycine	C6 m-Inositol	C7 2-Keto-D-Gluconic Acid	C8 m-D-Lactose	C9 Lactose	C10 Maltose	C11 Maltose	C12 Maltose
D1 D-Mannitol	D2 D-Mannose	D3 D-Mannitol	D4 D-Mannitol	D5 D-Mannitol	D6 D-Mannitol	D7 D-Mannitol	D8 D-Mannitol	D9 D-Mannitol	D10 D-Mannitol	D11 D-Mannitol	D12 D-Mannitol
E1 D-Fucose	E2 Fucose	E3 D-Galactose	E4 D-Galactose	E5 L-Galactose	E6 D-Galactose	E7 D-Galactose	E8 D-Galactose	E9 D-Galactose	E10 D-Galactose	E11 D-Galactose	E12 D-Galactose
F1 D-Glucose	F2 D-Glucose	F3 D-Glucose	F4 D-Glucose	F5 D-Glucose	F6 D-Glucose	F7 D-Glucose	F8 D-Glucose	F9 D-Glucose	F10 D-Glucose	F11 D-Glucose	F12 D-Glucose
G1 D-Glucose	G2 D-Glucose	G3 D-Glucose	G4 D-Glucose	G5 D-Glucose	G6 D-Glucose	G7 D-Glucose	G8 D-Glucose	G9 D-Glucose	G10 D-Glucose	G11 D-Glucose	G12 D-Glucose
H1 D-Glucose	H2 D-Glucose	H3 D-Glucose	H4 D-Glucose	H5 D-Glucose	H6 D-Glucose	H7 D-Glucose	H8 D-Glucose	H9 D-Glucose	H10 D-Glucose	H11 D-Glucose	H12 D-Glucose

Figura 5.1 Fuentes de carbono en microplaca para hongos filamentosos (FF)

6. RESULTADOS

Se obtuvieron 30 muestras provenientes de diferentes municipios del Estado de Michoacán, tal y como se muestra en la Tabla 6.1. La localización de dichos municipios puede apreciarse en la Figura 6.1.

HSC1	pistache	Patzcuaro	HSC16	pimienta	Apatzingan
HSC2	pistache	Jiquilpan	HSC17	cacahuete	Tacambaro
HSC3	cacahuete	Jiquilpan	HSC18	pimienta	M independencia
HSC4	pistache	c. abastos	HSC19	cacahuete	Apatzingan
HSC5	pistache	M. San Juan	HSC20	pimienta	Sahuayo
HSC6	cacahuete	santa ana maya	HSC21	pistache	M san juan
HSC7	pistache	c. abastos	HSC22	cacahuete	M auditorio
HSC8	cacahuete	Quiroga	HSC23	pimienta	M abastos
HSC9	cacahuete	M independencia	HSC24	cacahuete	tianguis ocolusen
HSC10	pistache	M independencia	HSC25	cacahuete	Patzcuaro
HSC11	pistache	Huiramba	HSC26	pistache	Zamora
HSC12	pimienta	Huiramba	HSC27	pistache	San Jose de Gracia
HSC13	pimienta	M independencia	HSC28	pimienta	Venustiano Carranza
HSC14	cacahuete	Apatzingan	HSC29	pimienta	Uruapan
HSC15	pimienta	M independencia	HSC30	pimienta	Quiroga

Tabla 6.1
Municipios de donde provienen las muestras de pistache, cacahuete y pimienta estudiadas



Figura 6.1
Mapa de Michoacán
Lugares de donde se obtuvieron algunas muestras

En la Figura 6.1, se puede apreciar que la mayoría de las muestras proviene de la región centro-norte del Estado de Michoacán donde predomina un clima templado todo el año.

Se encontró que las muestras mostraban una mayor contaminación debida a Actinomicetes que por hongos; sin embargo, como se muestra en la Tabla 6.2, algunas muestras presentaron contaminación fúngica por uno o más hongos en algunos casos

Tabla 6.2
Contaminación por hongos y actinomicetes en cada una de las muestras analizadas

MUESTRA	ACTINOMICETES	HONGOS
PIMIENTA		
P1	@	
P2	@	
P3	@	
P4	@	@
P5	@	@
P6	@	
P7	@	
P8	@	
P9	@	
P10	@	
PISTACHE		
P1		
P2	@	@
P3	@	@
P4		@
P5	@	
P6		
P7		"@ @ @
P8	@	
P9	@	
P10	@	@
CACAHUATE		
C1	@	
C2	@	
C3		@
C4	@	
C5	@	
C6	@	
C7	@	@
C8		@
C9	@	
C10	@	

@@ presencia de hongo o actinomicetes

Los hongos que principalmente contaminaban las muestras fueron 5, cuya morfología microscópica y macroscópica se muestra a continuación:

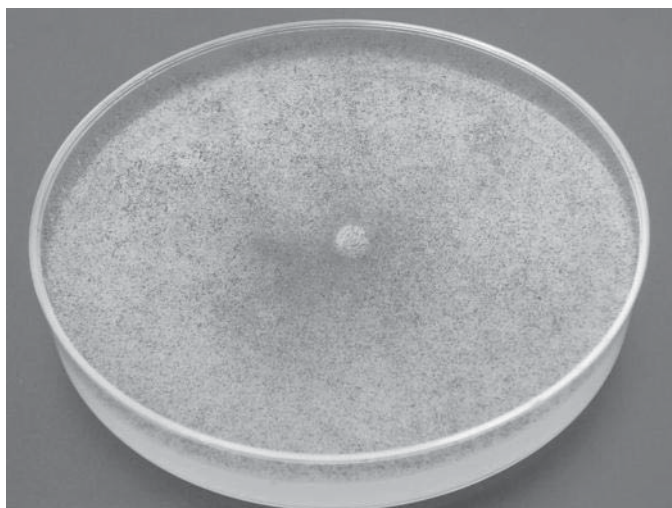


Figura 6.1 Muestra 05
de Pistacho Mercado de
San Juan

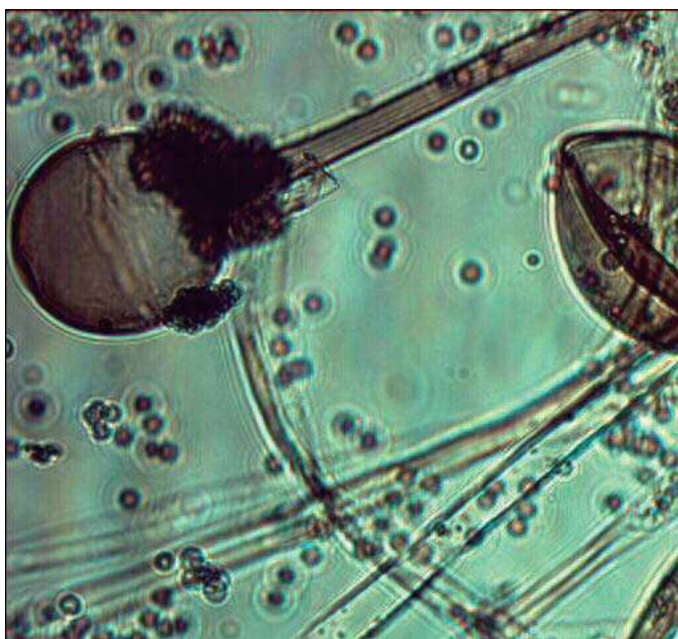


Figura 6.2
Fotografía
microscópica 40X
100μ



Figura 6.3 Muestra
30 Pimienta Quiroga

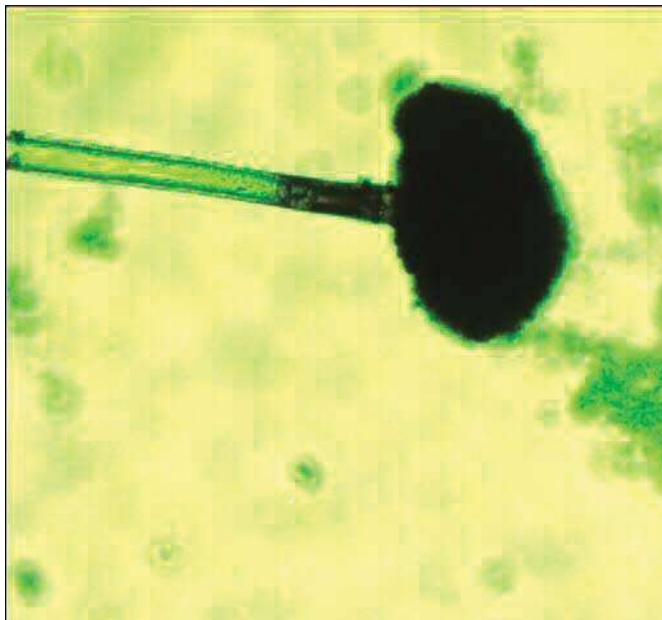


Figura 6.4
Fotografía
microscópica 40X
100 μ



Figura 6.5 Muestra
26 Pitache de

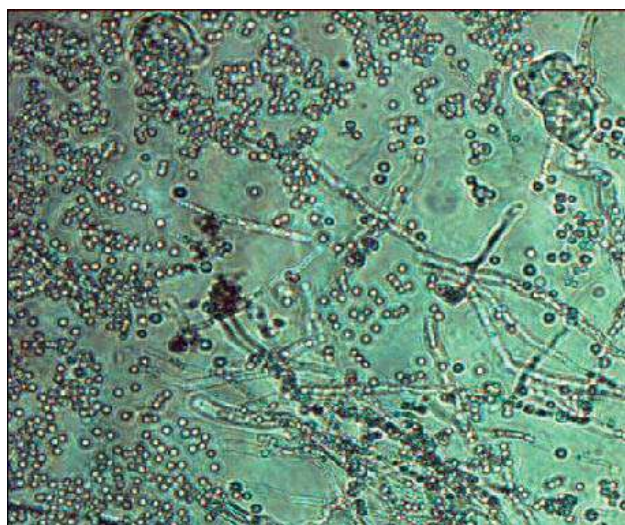


Figura 6.6
Fotografía
microscópica 40X
100μ



Figura 6.7 Muestra
P7B Pistacho Mercado
de San Juan

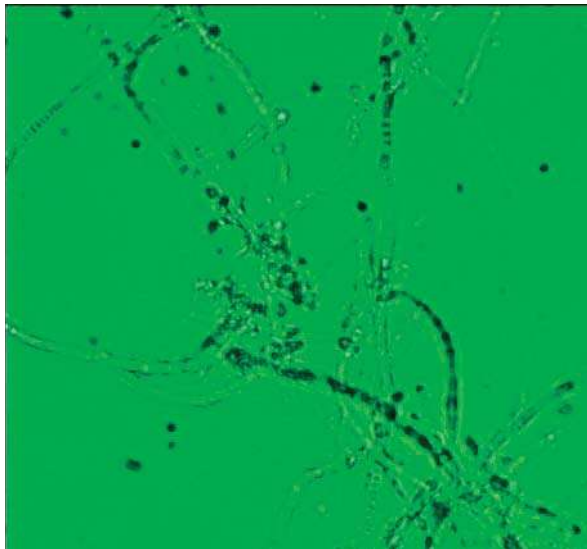


Figura 6.8
Fotografía
microscópica 40X
100μ

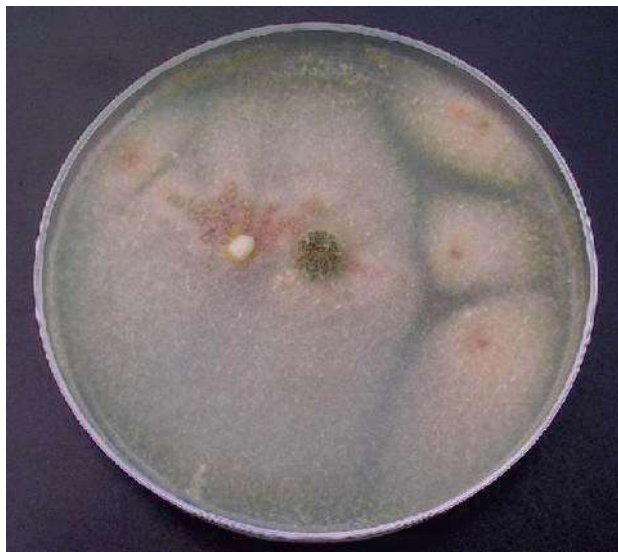


Figura 6.9 Muestra P7A
Pistacho Mercado de
San Juan

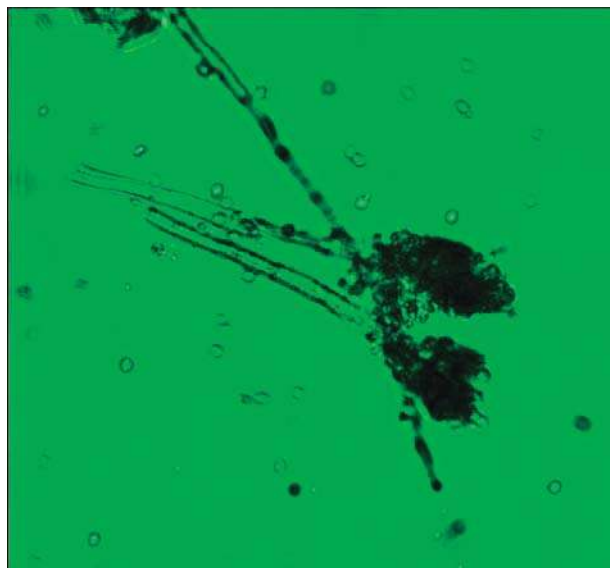


Figura 6.10
Fotografía
microscópica 40X
100μ

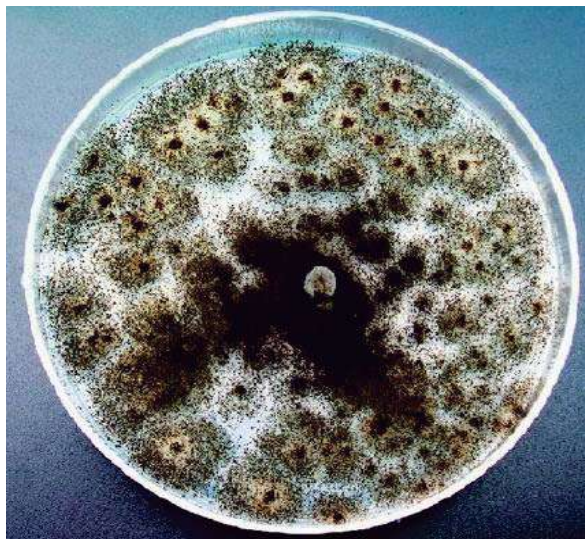


Figura 6.11 Muestra
C8A Cacahuete
Mercado Auditorio

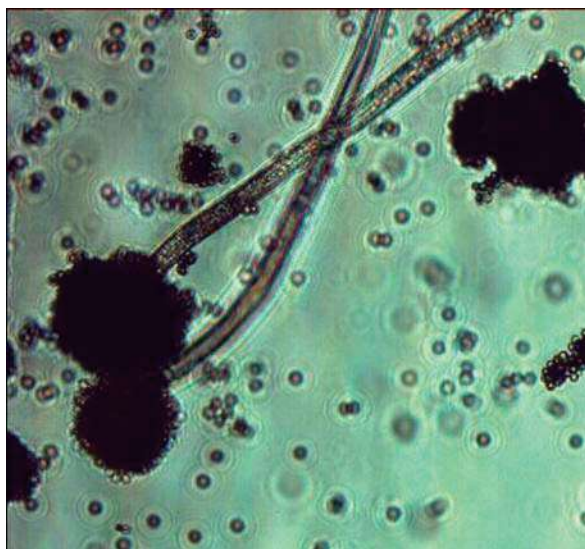


Figura 6.12
Fotografía
microscópica 40X
100μ



Figura 6.13 Muestra
P10A Pistache
líquida



Figura 6.14
Fotografía
microscópica 40X
100μ

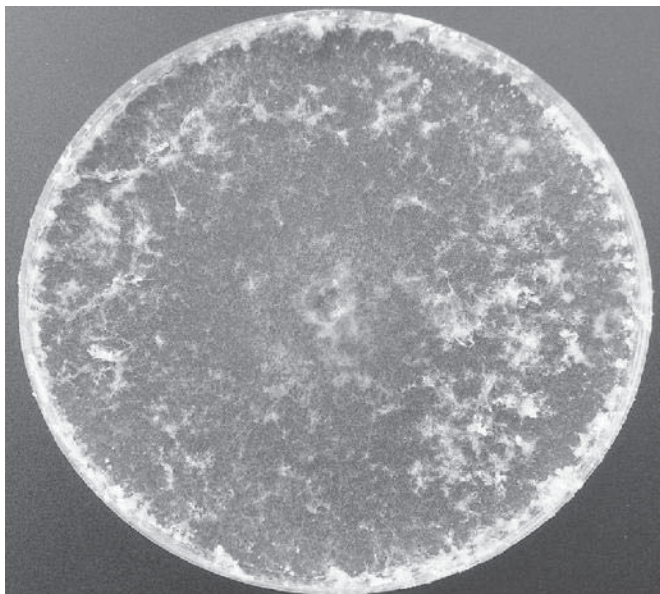


Figura 6.14 Muestra
C3A Cacahuete de
Jiquilpan



Figura 6.15
Fotografía
microscópica 40X
100μ

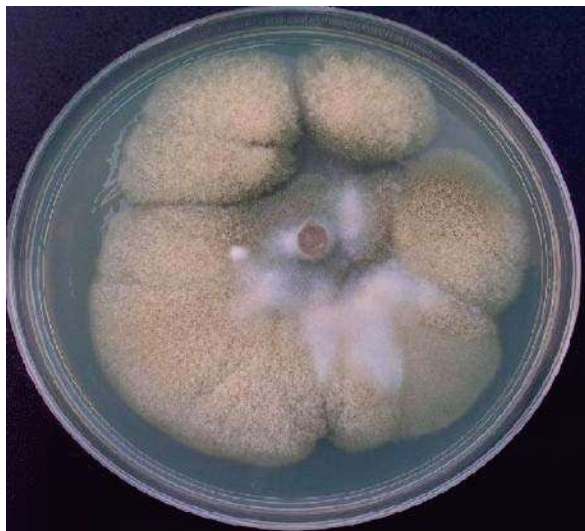


Figura 6.16 Muestra
08 Cacahuete Quiroga

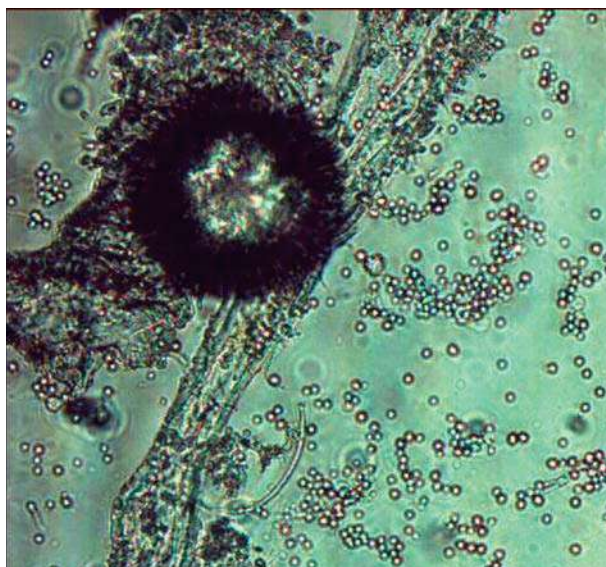


Figura 6.17
Fotografía
microscópica 40X
100μ

Tabla 6.3 Resultados de identificación de morfologías macro y microscópicas

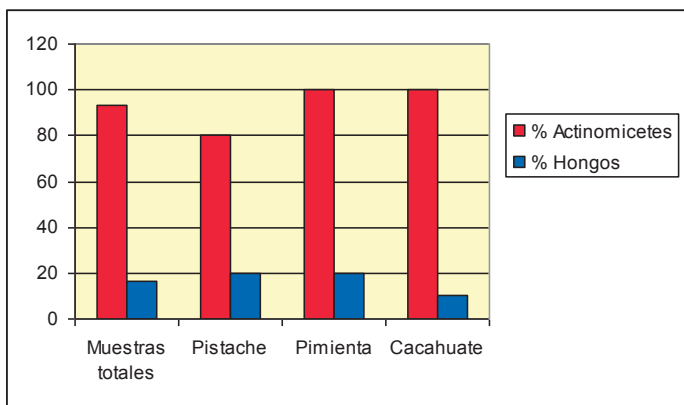
MUESTRA	HONGO
HSC5	<i>A. carbarius</i> , <i>A. aguamori nakasawa</i>
HSC8	<i>A. clavatus</i> , <i>A. parasiticus</i>
HSC22	<i>Apsidia californica</i> , <i>Apsidia gluaca</i>
HSC26	<i>A. clavatus</i> , <i>A. fumigatus</i>
HSC30	<i>A. raperi</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>

Tabla 6.4 resultados obtenidos de Biolog

MUESTRA	HONGO
HSC5	<i>Cladosporium herbarum</i>
HSC8	<i>A. fumigatus</i>
HSC22	<i>A. restrictus</i>
HSC26	<i>Penicillium verrucosum</i>
HSC30	<i>Penicillium solitum</i>

	% Actinomicetes	% Hongos
Muestras totales	93.3	16.6
Pistache	80	20
Pimienta	100	20
Cacahuete	100	10

Tabla 6.5 Porcentaje de hongos y actinomicetes presentes en las muestras



Grafica 6.1 Porcentaje de hongos y actinomicetes presentes en las muestras

7. DISCUSION

Cada vez es mayor el número de personas que sufren de enfermedades cardiovasculares así como de enfermedades relacionadas con el estrés; esto ha llevado a que científicos y médicos busquen dietas mas saludables. Se ha observado que la dieta mediterránea es muy recomendable en estos casos debido a su alto contenido en fibra aunque también incluye el consumo de diferentes tipos de oleaginosas. Las oleaginosas tiene un alto valor nutritivo además de ayudar a prevenir las enfermedades cardiovasculares (Fidanza, 2002). Sin embargo, los nutrientes que contienen las hacen susceptibles de contaminación fúngica por lo que pueden contaminarse además por micotoxinas. Entonces, se debe estar seguro que los alimentos que se consumen son inocuos desde el punto de vista micotoxicológico.

La identificación taxonómica de los hongos se realiza principalmente basándose en sus características morfológicas después de realizar una observación microscópica (Abdel-Gawad and Zohri,1993; Lozada, 1995; Pacin *et al*, 2002) o por sus características genéticas a través de técnicas de biología molecular (Pianzzola et al, 2004; Sanchez-Rangel *et al*, 2005; Jurado *et al*, 2006). El sistema Biolog es una herramienta que ha sido utilizada primordialmente para identificar bacterial aerobias Gram positivas y Gram negativas, a través de la asimilación de diferentes fuentes de carbono (Stager y Davis, 1992). En este caso, se optó por utilizar el sistema Biolog por su simplicidad de manejo y porque la identificación fúngica no requiere de la experiencia que es necesaria para realizar las identificaciones basándose en características morfológicas. El sistema contiene una base de datos denominada FF (de Filamentous Fungi, hongos filamentosos, por sus siglas en inglés) que analiza el

color desarrollado y la turbidez por lo que las identificaciones se realizan con un gran nivel de precisión. Las lecturas se empiezan a tomar 24 h después de la inoculación. Cabe mencionar que el uso de este tipo de sistemas no intenta reemplazar los ya existentes sino servir como una herramienta más en la identificación de especies fúngicas y en la elucidación de sus patrones metabólicos.

Se identificaron 5 especies de hongos en las muestras analizadas: *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium verrucosum*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus restrictus* and *Penicillium solitum*. Estas especies son consideradas cosmopolitas aunque algunas de ellas son patógenos de plantas. *Aspergillus fumigatus* y *Cladosporium herbarum* están relacionadas con micosis en pacientes inmunocomprometidos. Se han publicado varios artículos relacionados con las comunidades fúngicas en diversos alimentos para consumo humano y animal. La variedad de alimentos analizada es grande y en la mayoría se encuentran *Aspergillus* y *Penicillium* como los géneros predominantes especialmente en alimentos que no son cereales. (Gatti *et al*, 2003; Mounjouenpou *et al*, 2007). Pacin *et al* (2002) analizaron soya, arroz y maíz de diversos ranchos en Ecuador y encontraron al *Aspergillus flavus* como el hongo predominante en soya y arroz, mientras que en maíz fueron predominantes diversas especies de *Fusarium*. Abdel-Gawad y Zohri (1993) estudiaron la flora fúngica en almendras, nueces de la India, castañas, avellanas, pistaches y nueces. Aislaron *Aspergillus* de todas las muestras que analizaron y este género representó el 34.5% del total de hongos presentes en pistaches. En este trabajo, *Aspergillus* se encontró en 0%, 20%, 0% de las muestras de Pistache, cacahuete y pimienta negra, respectivamente. *Penicillium verrucosum* se encontró en de las muestras lo que representa un 10%. Se hace una mención especial a estos hongos ya que son hongos micotoxigénicos. En un trabajo paralelo (Jordan, 2007) se analizaron

muestras de pistache, cacahuete y pimienta negra usando dos métodos de extracción de micotoxinas de las muestras con la finalidad de verificar que las muestras estuvieran libres de micotoxinas, en especial de Ocratoxina A, que es la micotoxina que produce el *P. verrucosum*. No se encontraron niveles detectables de la micotoxina.

La Tabla 6.5 y la grafica 6.1 muestran lo porcentajes de muestras contaminadas por actinomicetes y hongos. Prácticamente el 100% de las muestras contienen actinomicetes y solo un pequeño porcentaje presenta contaminación por hongos que como ya se menciono algunos de estos son micotoxigenicos.

Las tablas 6.3 y 6.4 muestran los resultados de identificación de los hongos aislados de las muestras. Para poder realizar una identificación con alto nivel de certidumbre, es indispensable contar con mas de una técnica de identificación de hongos. La tabla 6.3 y la 6.4 no coinciden en todos los casos en géneros y en algunos casos en especie. La identificación de hongos basándose solo es su morfología requiere de un alto nivel de experiencia así que la confirmación mediante el uso de un sistema como el Biolog es ventajoso por su tiempo reducido de análisis y la cantidad de pruebas bioquímicas que incluye, proporcionando una identificación más confiable.

El presente estudio revela que es posible encontrar hongos micotoxigenicos en las muestras estudiadas, principalmente en cacahuates y pistaches. Para medir la dimensión de la contaminación de estos productos será necesario realizar un muestro más riguroso en un periodo de tiempo más prolongado. Sin embargo, con los resultados aquí obtenidos se puede decir que el manejo de los productos aquí analizados debe hacerse con mucha precaución para evitar una contaminación fúngica mayor aun cuando no se hayan detectado niveles de micotoxinas.

8. CONCLUSIONES

La flora predominante de las muestras son los actinomicetes

Las muestras de pimienta negra, pistache y cacahuete aquí analizadas mostraron la presencia de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Algunas especies de estos hongos son micotoxigenicas.

El 20% de las muestras de cacahuete presenta contaminación por *Aspergillus*, aunque solo la mitad de estas es debida a *Aspergillus fumigatus*.

El 10% de las muestras de pistache esta contaminado por *Penicillium verrucosum*, hongo productor de Ocratoxina A.

El uso del sistema Biolog permitió una identificación más confiable de los hongos presentes en las muestras.

9. BIBLIOGRAFIA

Abdel-Gawad, K.M. and A.A. Zohri, (1993). Fungal flora and mycotoxins of six kinds of nut seeds for human consumption in Saudi Arabia. *Mycopathologia* 1993: 55-64.

Arauz Cavallini LF. (1998). Fitopatología: un enfoque agroecológico. Ed. Universidad de C. R.

Awad AB, Chan KC, Downie AC, Fink CS. Peanuts as a source of B-sitosterol, a sterol with anticancer properties. *Nutrition and Cancer*. 2000;36(2):238-241.

Bonifaz Alejandro. (1998). Micología Médica Básica. 3ª reimpresión. Méndez Editores S.A. de C.V.

Brock. Madigan MT, Martinko JM y Parker J. (1999). Biología de los Microorganismos. 8ª Ed. Editorial Prentice Hall Iberia, Madrid. p. 774 – 780.

Carrillo Leonor, (2003), Microbiología Agrícola, Capítulo 6

Christensen CM. En: Food and Beverage Mycology. Beuchat LR, ed. New York, Van Nostrand Reinhold, (1987), cap. 7

Concon, Jose M; Newburg, David S; Swerczek, Thomas W (1979). Black pepper (*Piper nigrum*): Evidence of carcinogenicity. *Nutr Cancer*. Philadelphia, Franklin Institute Press. Spring 1979. v. 1(3) p. 22-26. ill., charts.

Constantine J. Alexopoulos, Charles W. Mims, Introductory Mycology, Third Edition editorial John Wiley and Sons. Paginas 534-572

Dalvi, R.R. (1991). Micellaneus Mycotoxins en: Mycotoxins and Phytoalexins. Sharma R.P. y Salunkhe D.K (Eds) CRC Press Boca Raton, Florida. Pp 437-460

Diener, U.L. (1973). Deterioration of Peanut quality caused by fungi In: Peanuts-culture and uses. Stone Printing Co., Roanoke, Va., pp. 523-557.

Diener, U.L.; R.J. Cole; T.H. Sanders; G.A. Payne; L.S. Lee; M.A. Klich. (1987). Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Ann. Rev. Phytopathol*. 25:249-270.

Druzhinina S. Irina, Schmoll Monika, Seiboth Bernhard, and Christian P. Kubicek(2006). Global Carbon Utilization Profiles of Wild-Type, Mutant, and Transformant Strains of *Hypocreaajecorina*. *Applied And Enviromental Microbiology*. 72:2126-2123

Fidanza, F., (2002). Tree nuts in the Mediterranean Diet Context. II Conferencia Salud y Frutos Secos. Fundación NUCIS. 28, February, Barcelona, Spain.

Food Balance Sheet, 2007. <http://faostat.fao.org/site/340/DesktopDefault.aspx?>

Gatti M.J., M.E. Fraga , C. Magnoli, A.M. Dalcero and C.A. da Rocha Rosa, (2003). Mycological survey for potential aflatoxin and ochratoxin producers and their toxicological properties in harvested Brazilian black pepper. Food Additives and Contaminants. 20:1120-1126.

Gobierno del Estado de Michoacán.
<http://www.michoacan.gob.mx/estado/geografia.php>

Gonzalez L.R.(2006)Revista Iberoamericana de Micología. Aclaraciones terminológicas en el campo de la Micotoxicología. Forum Micologico. Pp: 64-66

Herrera Teófilo, Miguel Ulloa. (1990) El Reyno de los Hongos, micología basica y aplicada primera edición, paginas 173-204

Hsieh, D.P.H (1988). Potential Human Health Hazards of Mycotoxins en: Mycotoxins and Phycotoxins. Natori, S., Hashimoto, K. y Ureno, Y. (Eds) Elsevier Science Publisher. Amsterdam. Pp 69-80.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática) 2006. Información Geográfica. <http://www.inegi.gob.mx/geo/default.asp?t=&e=16&c=124>

Jackson Kung'u (2005). Indoor Mold & Bacteria, A Source of Expert Opinion on Indoor and Bacteria. En: <http://www.moldbacteria.com/myblog/default.html>, Indoor Moulds: Cladosporium herbarum.

Jordán, A. (2007). Determinación de Micotoxinas en Pistaches, Cacahuates y Pimienta Negra. Tesis de Licenciatura en QFB, UMSNH.

Joanna D'Arc A. (2004) Herzog-Soares and Ronald Bastos Friere. Effects of Citrinin and in Association with Aflatoxin B1 on the efectivity and Proliferation f Toxoplasma gondii in vitro. Parasitologic Section, Institute of tropica Pathology and Public Healh, Federal University og Goias, Goias, GO, Brazil. The brazilian Journal of Infectious Diseases;8(1):101-108.

Jurado M, C. Vázquez, S. Marín, V. Sanchis and M.T. González-Jaén, (2006). PCR-based strategy to detect contamination with mycotoxigenic Fusarium species in maize. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 29:681-689.

Koneman EW, Stephen DA, William MJ, Schieckenerger PC y Winn WC. (1999). Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas a color. 5ª Ed. Editorial Médica Panamericana. p. 955 – 1037.

Kuiper-Goodman, T (1995). Mycotoxins: risk assessment and legislation. Elsevier Science Ltd.: Toxicology Letters. 82/83:853-859.

Kunimoto Hotta, Ph.D. (Publication chief of the Atlas) Nov. (2002)
Atlas of Actinomycetes, the Society for Actinomycetes Japan (SAJ) Shinji Miyadoh,
Ph.D. (Editor in chief)

Leiva S.(Rev Med Chile 2004) Antimicrobial activity of actinomycetes isolated from aquatic environment in Southern Chile

López Rubén, (1995). Micología Médica. Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio. Editorial Trillas pp 39, 116-119.

López Lourdes (2005)El pistache, fuente de salud y energía. Be Good to your Heart, comisión del pistache de California. <http://www.pistachios.org>

López Martínez R, Méndez Tovar LJ, Hernández Hernández F y Castañón Olivares R. (1995). Micología Médica. Procesamientos para el diagnóstico de laboratorio. 1ª Ed. Editorial Trillas. p. 11 – 23.

Lozada A.F., 1995. Isolation and identification of mycotoxigenic fungi in selected foods and feeds. Food Additives and Contaminants 12:509-514.

Nakatani, N (1992). Natural antioxidants from spices. ACS symp ser. Washington, DC.: American Chemical Society, 1974. 1992. (507) p. 72-86.

Norma Oficial NOM-188-SSA1-2002. Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones Sanitarias.

Con formato

Mazzani Claudio ¹; **Alfredo Layrisse**² (1994)

¹ Instituto de Química y Tecnología, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Apdo 4579, Maracay 2101 Venezuela.

² Instituto de Genética, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, Apdo 4579, Maracay 2101 Venezuela.

Reacción de ocho genotipos de maní a la inoculación de sus semillas in vitro con cepas locales de Aspergillus flavus y A. terreus

Martins, AP; Salgueiro, L; Vila, R; Tomi, F; Canigüeral, S; Casanova, J; Proença da Cunha, A; Adzet, T. Essential Oil from four Piper species. Phytochemistry Oxford. Oxford: Elsevier Science Ltd. Dec (1998). v. 49(7) p. 2019-2023.

Microsoft® Encarta® "Pimienta (planta)." 2006 [CD]. Microsoft Corporation, (2005)

Microsoft® Encarta "Maní o cacahuate (planta)." ® 2006 [CD]. Microsoft Corporation, (2005)

Marques, A.; C. Mazzani. (1985). Influencia varietal del maní en la colonización de los granos de hongos de almacén. Seminario Nacional de Fitopatología IX. Maracay. Noviembre, Memorias. pp. 30.

Mazzani, C. (1983). Micoflora de granos de maní (*Arachis hypogaea* L.), maíz (*Zea mays* L.) y cacao (*Theobroma cacao* L.) almacenados en Venezuela. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Trabajo de ascenso a la categoría de Profesor Asistente. 95 pp.

Mazzani, C.; A. Layrisse. (1992). Resistencia de campo de genotipos de maní (*Arachis hypogaea* L.) a la infección de sus semillas por *Aspergillus* spp. *Phytopathologia Mediterranea* (Aceptado para publicación).

Mounjouenpou, P., D. Gueule, B. Guyot, P.R. Tondje, A. Fontana-Tachon and J.P. Guiraud, (2007). Incidence of pod integrity on the fungal microflora and Ochratoxin A production in cocoa. XXII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. 21-25 May. Istanbul, Turkey.

Moore-Landecker Elizabeth, *Fundamentals of the Fungi*. Third Edition

MYC-CONF/99/7b

Análisis de riesgos de las micotoxinas por el comité mixto de expertos FAO/OMS sobre aditivos alimentarios.

FAO/OMS/PNUMAS sobre Micotoxinas(JECFA)1999.

Effect of dietary calcium propionate on performance, hepatic enzyme activities and aflatoxin residues in broilers fed a diet containing low levels of aflatoxin B1

a)Bintvihok Anong, b)Kositcharoenkul Suparat.

a)Department of pharmacology, Faculty of Veterinary Science, Chulalong University, Henri Dunant Street Pathumwan, Bangkok 10330, Tailand

b)Department of Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok 10900, Thailand, 18 November 2005.

Pacín A.M., H.H.L. Gonzalez, M. Etcheverry, S.L. Resnik, L. Vivas and S. Espin, (2002). Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador. *Mycopathologia* 156:87-92.

Píanosla, M. J., M. Moscatelli, and S. Vero, (2004). Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on apple in Uruguay. *Plant Dis.* 88:23-28.

Pianzzola, M.J., M. Moscatelli and S. Vero, (2004). Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold in apple in Uruguay. *Plant Disease* 80:23-28

Quevedo JM. *Agronomía* 3 (8-9): 3-36, (1912)

Rosales J A, (2004), TIPIFICACION POLIFASICA DE AISLADOS CLINICOS DE Escherichia coli DIARREAGENICA. Tesis de licenciatura

Romero Raúl(1999). Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas. pp109

SAGARPA (2006)

Sánchez-Rangel D., A. SanJuan-Badillo and J. Plasencia, (2005). Fumonisin production by Fusarium verticillioides strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. Journal of Agriculture and Food Chemistry 53:8565-8571.

Sharma, R.P. y Salunkhe, D.K. (1991). Introduction to Mycotoxins en: Mycotoxins and Phytoalexins. Sharma, R.P. y Salunkhe, D.K. (Eds). Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida. Pp 3-11.

Stager CE & Davis JR 1992. Automated systems for identification of microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 5: 302-327.

Torrenegra R. D.(2004) Grupo de Investigación en Biotransformación (GIBUJ) Departamento de Química, Pontificia Universidad Javeriana
DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS A PARTIR DE UNA CEPA NATIVA DE Penicillium spg 28. AISLADA DEL PARAMO DE GUASCA, DEPARTAMENTO DE CUNDINAMARCA

Prevención y descontaminación de micotoxinas
Estudio monográfico: Prevención de la aflatoxina en el pistacho
TERCERA CONFERENCIA INTERNACIONAL MIXTA FAO/OMS/PNUMAS
SOBRE MICOTOXINAS, Tunez Tunez (1999.)

Prevención y descontaminación de micotoxinas
Estudio monográfico: El maíz',
TERCERA CONFERENCIA INTERNACIONAL MIXTA FAO/OMS/PNUMAS
SOBRE MICOTOXINAS, Tunez Tunez (1999.)

USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 17.
Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp> © The Peanut Institute (2004) All rights reserved.

Vargas I. (2005)Revista Boletín Agrícola “el Arbolar” el pistachero: una alternativa de cultivo. Pp. 16-21, artículos técnicos. Departamento técnico de arboreto

Vázquez Marrufo Gerardo y colaboradores, Manual de practices Diplomado en diagnostico molecular, (2006)

Vidaña Karime(2003). El pistache. Gana mucho con poco. A partir del tercer año de inversion obtendras atrctivas ganancias. Como? Abastecer el mercado nacional y sustituir las importaciones

Willard John(1995). Micologia Medica. Hongos y actinomicetos patogenos. Tercera edicion. McGraw-Hill. Pp:668-670.