

## DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS Y ENZIMÁTICAS ENTRE CEPAS DE ASPERGILLUS FLAVUS PRODUCTORAS Y NO PRODUCTORAS DE AFLATOXINAS

Sanchís, V., Viñas, I., Jiménez, M. y Hernández, E. \*

### RESUMEN

Las especies del grupo **A. Flavus** son, cuantitativamente, las mayores productoras de aflatoxinas. Se investigan las principales capacidades enzimáticas y características morfológicas de 137 cepas de **A. flavus**, con el fin de determinar la existencia de alguna propiedad que permita diferenciar las cepas toxigénicas de las que no lo son.

Las cepas toxigénicas presentan una incidencia de esclerocios y actividad proteolítica mayor que las no toxigénicas. Pero en términos generales, las actividades medias de ambos grupos son semejantes, sin apenas diferencias significativas. Tan solo la actividad ureásica es la que difiere significativamente entre los dos grandes grupos. No se conoce ninguna referencia bibliográfica que pueda explicar la importancia que tiene esta actividad, pero quizás pueda ser debida a algún tipo de regulación metabólica en la vía de síntesis de la aflatoxina.

### SUMMARY

**Morphological and enzymatic differences between strains of *Aspergillus flavus*, producer and no producer of aflatoxins.**

***Aspergillus flavus*** species are, quantitatively, the highest aflatoxin producer strains known. The morphological characteristics and enzymatic capability of 137 strains of **A. flavus** are being investigated in order to determine the existence of any attribute leading to the differentiation of the toxigenic strains from the non toxigenic ones.

Toxigenic strains present a higher amount of sclerotia and proteolytic activity greater than the non toxigenic strains. However, the activity of both groups of strains are generally similar without significant differences between them. Only the urease activity differs significantly in these groups. There is no bibliographical reference that could explain the importance of that activity, but it could be attributed to some type of metabolic regulation in the biosynthesis pathway of the aflatoxin.

\* Cátedras de Microbiología de las E.T.S.I. Agrónomos de Valencia y Lérida.

## INTRODUCCION

Los enzimas producidos por hongos son importantes en la infección del huésped, alteración de alimentos y degradación de la materia orgánica. La detección y comparación de los enzimas producidos por varios hongos consumen mucho tiempo si los hongos deben ser obtenidos en cultivos puros y los enzimas aislados. Normalmente se ensayaba la producción de enzimas por hongos, triturando el micelio para actividades enzimáticas (STEVENS 1974). BERKENKAMP (1973) fue el primero que usó el medio sólido para ensayos directos, en concreto para testar ribonucleasa en patógenos de plantas.

El uso de medio sólido permite la lectura de una gran población de hongos con el fin de investigar la presencia o ausencia de enzimas específicos.

Puede ser usado también para diferenciar hongos taxonómicamente diferentes por medios químicos (HANKIN y ANAGNOSTAKIS 1975).

El *A. flavus*, está considerado como una especie cosmopolita y tiene además la propiedad de producir aflatoxina, que es una micotoxina cancerígena muy tóxica para los seres vivos.

En el presente trabajo se analizan las principales capacidades enzimáticas y morfológicas de 137 cepas de *A. flavus*, con vista a notar alguna característica que pueda diferenciarlos a las cepas productoras y no productoras de aflatoxina.

## MATERIAL Y METODOS.

Se entiende el término producción de enzimas, como la capacidad de síntesis por el hongo y su actividad en el medio después que son producidas.

La técnica del medio sólido se ha empleado en el estudio de la capacidad productora de los enzimas: ureasa, proteasa, amilasa, DNAasa y lipasa (HANKIN y ANAGNOSTAKIS 1975 y MALIK 1980). La siembra de las cepas en los medios APA y Agar a base de coco, más la configuración por cromatografía en capa fina frente a standars, es la metodología seguida para

detectar la capacidad productora de aflatoxinas.

Los tests realizados en placa petri se siembran en tres puntos equidistantes, a partir de una suspensión de esporas en agua destilada y tween 80, procedente de cultivos crecidos en PDA. Las placas se incuban durante períodos de 4 días a 28-30°C, tras el cual se determina la actividad enzimática, que se toma como la media de las tres réplicas.

Todos los medios contienen suficiente sustrato, además del que se desea testar para dar un buen crecimiento del hongo. Los resultados obtenidos, se someten a un análisis estadístico utilizando paquetes estadísticos del BMDP de la Universidad de California, Los Angeles.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Características Generales

### Actividades Enzimáticas

En general se observa una gran variación con respecto a la producción de determinados enzimas entre las distintas cepas ensayadas. DAS y cols. (1979) encuentran que diversas especies de *Gloeophyllum striatum* y *Polyporus sanguineus* producen cantidades diferentes de enzimas.

### Actividad Proteolítica

La actividad proteolítica de las cepas ensayadas de *A. flavus* es en general muy elevada, siendo mayor a la de muchos hongos superiores, patógenos de plantas, como especies del género *Phytophthora* (DAS y cols. 1979) e incluso saprofitos como *Trichoderma viride* y otras especies de *Aspergillus* (HANKIN y ANAGNOSTAKIS 1975). Esta gran actividad enzimática que presentan estas especies, era desde hace mucho tiempo conocida, como lo demuestra su utilización en la fermentación de bebidas orientales.

### Actividad Amilolítica

En principio se creía que todos los hongos presentaban la capacidad de producir este tipo de enzimas (COCHRANE 1958)

pero investigaciones posteriores nos han demostrado que existe una gran variabilidad, incluso que muchas cepas de algunas especies son incapaces de producirlas. Las cepas de *A. flavus* ensayadas son buenas productoras de enzimas amilolíticas, y todas ellas en más o menos cantidad, fueron capaces de producirlas. A pesar que este género junto a *Penicillium* y *Mucor* siempre han sido teóricamente los mayores productores de estas enzimas, algunas de sus especies han dado resultados negativos (HANKIN y ANAGNOSTAKIS 1975).

#### Actividad Lipolítica

Todas las cepas ensayadas han presentado en mayor o menor cantidad la capacidad de producir lipasas. Generalmente la gran mayoría de los hongos presenta esta capacidad (COCHRANE 1958; TRIGIANO y FERGUS 1979).

#### Actividad Celulolítica

La celulosa es un carbohidrato abundantemente aprovechable como sustrato, tanto por los microorganismos saprófitos como fitopatógenos. Por las capacidades celulolíticas de las cepas ensayadas, se obtuvo una pérdida media de peso del 3.9%, ver tabla. Resultados muy similares al 4.16% obtenidos en otras cepas de la misma especie (MALIK y cols. 1980).

Se ha observado en las cepas estudiadas gran variabilidad, oscilando entre casi no utilizar el sustrato con una pérdida de peso del 0.61% hasta que esta sea del 9.1%, esto también sucede en otras especies de *Pyricularia* (SING y KUNENE 1980), *Helminthosporium* y *Ophiobolus* (GARRET 1966), *Verticillium* (DOMSH y GAMS 1972).

Parece ser que la habilidad de una cepa en producir celulasas decrece con el tiempo que se ha almacenado.

#### Actividad DNAásica

Todas las cepas ensayadas han presentado capacidad productora de estas enzimas.

#### Actividad Ureásica

La capacidad ureásica ha sido muy variable. En líneas generales el grado de actividad no es muy elevado.

#### Formación de esclerocios y exudado por *A. Flavus*

Han sido capaces de producir esclerocios en mayor o menor cantidad 107 de las 137 cepas ensayadas, y el 39% de éstas fue capaz de producir exudado.

Los esclerocios suelen distribuirse en la colonia de modo uniforme si su número no es muy elevado, unos 50. Si el número es mayor por ejemplo 200 lo hacen con una aglomeración en el centro.

Su producción se ha investigado en medios Czapeck, Agar Glucosa, Agar Extracto de Malta y Agar Patata Glucosada, con el fin de poder abarcar un número de sustratos variados por sus propiedades nutritivas. De todos estos medios el Agar Czapeck resultó el más óptimo para la producción de esclerocios. Resultados similares han obtenido en *A. flavus* (ARMBRECH y cols. 1963, BENNET y col. 1978, 1979 y 1980).

#### *Diferencias entre cepas productoras y no productoras de aflatoxina*

De las 137 cepas ensayadas, solo 37 han dado el test de aflatoxina positivo, porcentaje que entra dentro de los resultados normalmente encontrados en otros estudios de características similares (FLANNIGAN y HUY 1976).

A continuación se trata cada una de las características enzimáticas y morfológicas estudiadas.

#### Actividad Lipolítica

Tanto las cepas productoras de toxina, como las que no lo son presentan actividades similares, que se puede comprobar tras la observación de la Fig. 1. Los resultados de que las cepas toxigénicas presentan dos veces más actividad lipolítica que las no toxigénicas (TRIGIANO y FERGUS 1979), no parecen cumplirse en nuestro trabajo.

#### Actividad Amilolítica

Las cepas no toxigénicas son las que presentan más altos valores de actividad amilolítica. En términos generales las actividades medias de ambos grupos, son se-

mejantes sin apenas diferencias significativas.

#### Actividad Proteolítica

Es una de las pocas propiedades que junto con la producción de esclerocios, las cepas toxigénicas presentan valores superiores a las no productoras de toxina, las diferencias son pequeñas y por tanto no significativas. El 74% de las cepas toxigénicas son máximo productoras frente al 9% de las no productoras.

#### Actividad Ureásica

Las cepas productoras de aflatoxina presentan mayor actividad ureásica que las no toxigénicas. Además el 18% de las toxigénicas presentan la máxima actividad frente al 9% de las no toxigénicas.

Esta actividad es la única de las estudiadas en que las diferencias obtenidas a favor de las cepas toxigénicas muestran un nivel de significación del 99%.

#### Actividad Celulolítica

Al igual que la mayor parte de las características estudiadas, los valores de los dos grupos son muy similares.

La distribución de las cepas según esta actividad se puede observar en la Figura 1.

#### Capacidad de crecimiento sobre material celulolítico

El 81% de las cepas no toxigénicas son capaces de crecer perfectamente en un medio pobre, carente de fuentes de carbono, frente al 78% de las cepas toxigénicas. Como se puede ver son resultados muy similares.

#### Formación de esclerocios y exudado

Las cepas toxigénicas presentan una incidencia de esclerocios mayor que las no productoras de toxina. Las diferencias encontradas son suficientemente significativas para afirmar categóricamente que la producción de aflatoxina está unida intrínsecamente a la presencia de esclerocios.

En algunos estudios sobre los caracteres morfológicos y culturales de las cepas de *A. flavus* se anotó una posible correlación entre la producción de aflatoxina y de es-

clerocios. (MAGGON y cols. 1969; MEHAN y COHAN 1973 y MURAKAMI y cols 1968).

Es decir parece que existe una tendencia de las cepas aflatoxigénicas en producir esclerocios. BENNET y cols. (1979 y 1980) y los resultados obtenidos vienen a probar que no existe esta correlación.

Posiblemente la producción simultánea de aflatoxina y esclerocios se debe a que necesita condiciones ecológicas similares. Tanto la formación de esclerocios como la producción de metabolitos secundarios se produce cuando el período vegetativo ha cesado.

Es importante saber que según WILSON (1971), los esclerocios contienen una toxina tremorgénica, todavía no caracterizada químicamente, pero diferente de las aflatoxinas.

Los *A. flavus* no productores de aflatoxina presentan un mayor porcentaje de cepas con exudado, 41% frente al 35% de las toxigénicas.

Se ha presentado cierta correlación (0.40) entre la producción de exudado y la producción de esclerocios por las cepas. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores (BENNET y col. 1978).

## BIBLIOGRAFIA

- ARMBRECHT, B.H., F.A. HODGES; M.R. SMITH y A.A. NELSON (1963). Mycotoxins. I. Studies on aflatoxins derived from contaminated peanut meal and certain strains of *A. flavus*. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 46: 805-817.
- BENNET, J.W., F.A. FERNHOLZ y L.S. LEE. (1978). Effect of light on aflatoxins, anthraquinones, and sclerotia in *A. flavus* and *A. parasiticus*. *Mycologia*, 70: 104-115.
- BENNET, J.W., P.C. HOROWITZ y L.S. LEE. (1979). Production of sclerotia by aflatoxigenic and non aflatoxigenic strains of *A. flavus* and *A. parasiticus*. *Mycologia*, 71: 415-422.
- BENNET, J.W., P.L. RUBIN, L.S. LEE y P.N. CHEN. (1980). Influence of trace elements and nitrogen sources on versicolorin production by a mutant strain of *A. parasiticus*. *Mycopatologia*. 63,3: 161-166.
- BERKENKAMP, B. (1973). Qualitative assays of ribonuclease produced by plant pathogenic fungi. *Can. Jour. Microbiology* 19: 1431-1434.
- COCHRANE, V.W. (1958). *Physiology of fungi*. John Wiley and Sons, Inc., New York. 588 p.
- DAS, A.M., M. CATTERJEE y A. ROY. (1979). Enzymes of some higher fungi. *Mycologia*. 71: 530-536.

- DOMSCH, K.H. y W. GAMS. (1972). *Fungi in agricultural soils*. Long man. Group limited. London. 290 pp.
- FLANIGAN, B. y S.C. HUY. (1976). The occurrence of aflatoxin-producing strains of *A. flavus* in the mould floras and ground speces. *Jour of General Microbiology*. 411-418.
- GARRETT, S.D. (1966). Cellulose decomposing ability of some cereal foot-rot fungi in relation to their saprophytic survival. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 49: 57-68.
- HANKIN, L. y S.L. ANAGNOSTAKIS. (1975). The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*. 67: 597.
- MAGGON, K.K., L. VISWANATHAN y T.A. VENKITASUBRAMANIAN. (1969). Aflatoxin production by some indian strains of *A. flavus* Link ex Fries. *J. Gen. Microbiol.* 59: 119-124.
- MALIK, K.A., F. KAUSER y F. AZAM (1980). Effect to sodium chloride on the cellulolytic ability of some *Aspergilli*. *Mycologia*. 72: 322-327.
- MEHAN, V.K. y J.S. COHAN. (1973). Relative performance of selected toxigenic and non toxigenic isolats of *A. flavus* Link Fries on diferent culture media. *Ind. J. Exp. Biol.* 11: 191-193.
- MURAKAMI, H., H. SAGAWA y S. TAKASE. (1968). Non-productivity of aflatoxin by Japanesse industrial strains of the *Aspergillus*. III. Common characteristics of the aflatoxin-producing strains. *J. Gen. Appl. Microbiology*. 14: 251-262.
- SINGH, N. y I.S. KUNENE. (1980). Cellulose decomposition by four isolates of *Pyricularia oryzae*. *Mycologia*. 72: 182-190.
- STEVENS, R.B. (1974). *Mycology guidebook*. Univ. of Wash. Press, Saettle, Wash, pg. 364-366.
- TRIGIANO, R.N. y C.L. FERGUS. (1979). Extracellular enzymes of some fungi associated with mushroom culture. *Mycologia*, 71: 908-917.
- WILSON, B.J. (1971). *Miscellaneous Aspergilli toxins*. Pp 208-295. In «Microbial Toxins» vol. VI. Fungal toxins. A. Ciegler, S. Kadis y J. Ajl (eds.) Academic press. New York.

TABLA  
RELACION DE LA CAPACIDAD DE PRODUCIR AFLATOXINAS POR LAS  
CEPAS DE *A.flavus* Y OTROS FACTORES

		CEPAS <i>A. flavus</i>			
		Prod. Aflat.	No Prd. Afl	GLOBAL	
N.º Cepas		37	100	137	
ACTIVIDADES ENZIMATICAS	A. Lipolítica <sup>a</sup>	1.25	1.28	1.27	NS <sup>g</sup>
	A. Amilolít. <sup>a</sup>	1.28	1.30	1.29	NS
	A. Proteolít. <sup>b</sup>	54.0	50.8	51.7	NS
	A. Ureásica <sup>c</sup>	1.56	1.03	1.42	MS
	A. Celulolít. <sup>d</sup>	3.61	4.03	3.92	NS
	A. DNAsa <sup>e</sup>	100	100	100	NS
C MORFOLOGICOS	Esclerocios <sup>f</sup>	1.81	1.52	1.60	NS
	Exudado <sup>e</sup>	35.1	41.0	39.4	NS
	Crecimiento Mat. Celulol. <sup>e</sup>	78.4	81.0	80.3	NS

a.-Razón entre diámetro del halo y el de la colonia.

b.-Medida en mm. de la profundidad de la licuefacción del medio.

c.-Rapidez en producir el viraje de color: 3 = media hora; 2 = 1 hora; 1 = entre 1 y 2 horas; 0 = no se produce.

d.-Pérdida en peso (%) de los papeles de filtro Whatman.

e.-Resultado expresado en porcentaje de cepas con la prueba positiva.

f.-Número de esclerocios: 3 = > 100; 2 = 50-100; 1 = < 50.

g.-Significación de los resultados: Muy significativo, MS (> 99%); Significativa, S (95-98%); No significativa, NS (< 95%).

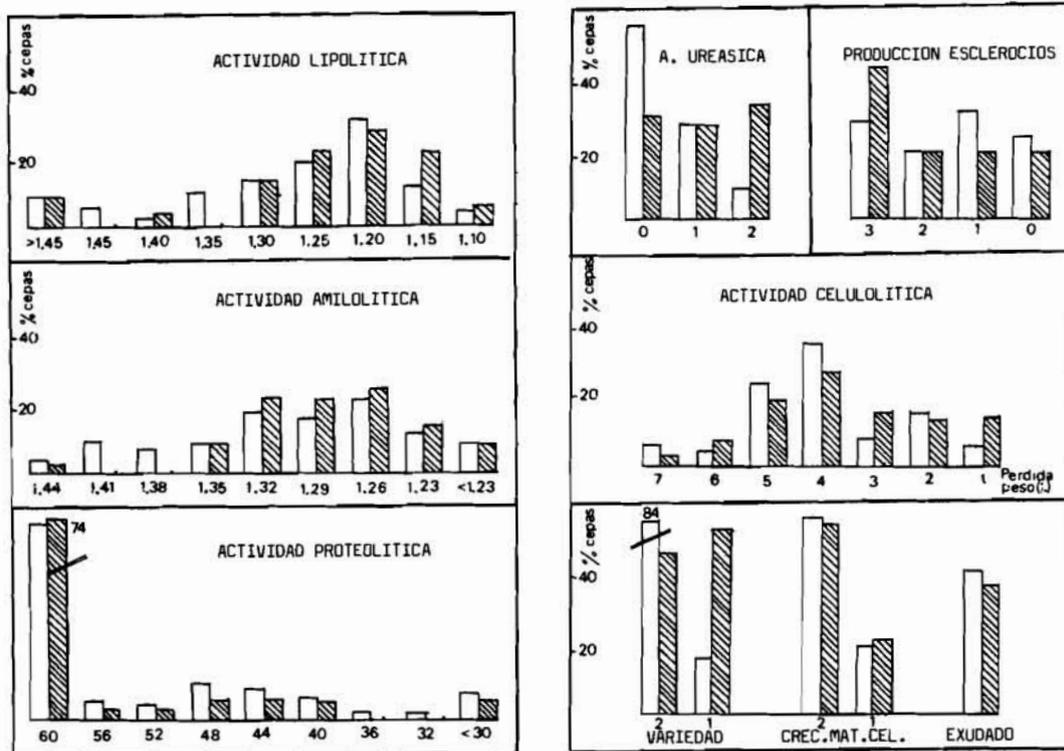


FIGURA 1.-Histograma de tablas de frecuencia de la Producción de aflatoxinas por cepas de *A. flavus*: □ No productoras; ▨ Productoras.