



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS



CARRERA DE AGRONOMÍA

TÍTULO DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**“Establecimiento de una colección de hongos con potencial
micotoxigénico en el cultivo *Zea mays* variedad maíz blanco harinoso
tipo chazo”**

**DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO
REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE INGENIERO
AGRÓNOMO**

Autor:

Gabriel Eleazar Solís López

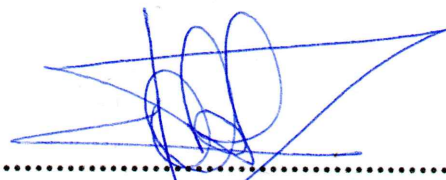
Tutor:

Ing. Jorge Enrique Dobronski Arcos

Cevallos, 2025

“Establecimiento de una colección de hongos con potencial micotoxigénico en el cultivo *Zea mays* variedad maíz blanco harinoso tipo chazo”

REVISADO POR



Ing. Mg. Dobronski Arcos Jorge Enrique

TUTOR

APROBADO POR LOS MIEMBROS DE CALIFICACIÓN

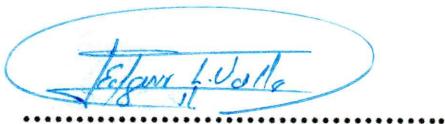


Ing. Pedro Pablo Pomboza, PhD.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

Fecha

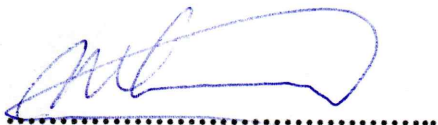
12-02-2025



Ing. Mg. Edgar Luciano Valle Velastegui

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

12-02-2025



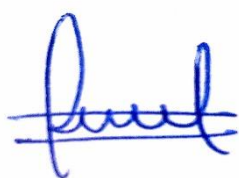
Ing. Michel Leiva Mora, PhD.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

12-02-2025

AUTORIA DE LA INVESTIGACIÓN

El suscrito, GABRIEL ELEAZAR SOLÍS LÓPEZ, portador de cédula de ciudadanía número: 1804381935, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de investigación titulado: **“Establecimiento de una colección de hongos con potencial micotoxigénico en el cultivo *Zea mays* variedad maíz blanco harinoso tipo chazo”** es original, auténtico y personal. En tal virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas.



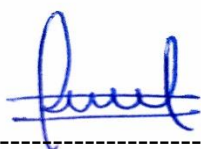
GABRIEL ELEAZAR SOLÍS LÓPEZ

DERECHO DE AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado **“Establecimiento de una colección de hongos con potencial micotoxigénico en el cultivo *Zea mays* variedad maíz blanco harinoso tipo chazo”** como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Ingeniero Agrónomo, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



GABRIEL ELEAZAR SOLÍS LÓPEZ

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis queridas hermanas, quienes han sido y son pilares fundamentales, ya que su amor, apoyo incondicional y motivación me han llevado a continuar en mi camino académico. Su presencia en mi vida me ha inspirado a perseverar y a ir más allá, justo cuando más motivación he necesitado.

A mis padres ya que siempre me han apoyado en cada decisión que tomé en la vida, sin objeciones, más sus consejos me ayudado a llegar hasta estas instancias.

A mis profesores y mentores, que me han guiado y motivado a lo largo de este viaje, gracias por compartir su sabiduría y pasión por el conocimiento.

Y también a quienes hicieron de este proceso una experiencia enriquecedora y memorable.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que han contribuido de alguna manera a la realización de esta tesis.

A יהוה (YHWH), por guiarme y darme la fortaleza necesaria para enfrentar los desafíos que se presentaron en este camino. Su apoyo “espiritual” ha sido un pilar fundamental en mi vida.

A mis padres, por su amor incondicional, su apoyo constante y por siempre motivarme a dar lo mejor de mí. Por siempre confiar en mis capacidades lo que ha sido y es siempre una fuente de inspiración.

A mis hermanas, por estar siempre a mi lado, brindándome su apoyo y aliento en cada etapa de este proceso. Su presencia en mi vida ha sido un regalo invaluable.

A mis profesores y mentores, por guiarme a lo largo de este camino académico, brindándome su conocimiento y apoyo. Sus consejos y enseñanzas han sido invaluableles en cada etapa de este proceso.

A la Dra. Viviana Rodríguez por compartir su experiencia y crear un ambiente de aprendizaje.

A mi familia y amigos, por su paciencia y comprensión durante este viaje. Gracias por estar siempre ahí, alentándome a seguir adelante.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo I 12

Introducción 12

Marco Teórico 13

- 1.1. Antecedentes Investigativos 14
- 1.2. Categorías fundamentales 15
 - 1.2.1. Macromorfología del hongo 15
 - 1.2.2. Micromorfología del hongo 15
- 1.3. Objetivos 16
 - 1.3.1. Objetivo general 16
 - 1.3.2. Objetivos específicos 16

Capítulo II 17

Metodología 17

- 2.1. Ubicación del estudio 17
- 2.2. Caracterización del lugar 17
- 2.3. Equipos y materiales 17
 - 2.3.1. Equipos 17
 - 2.3.2. Materiales 17
 - 2.3.3. Material de oficinas 18
- 2.4. Manejo del Experimento 18
 - 2.4.1. Obtención de la muestra 18
 - 2.4.2. Esterilizar el área de trabajo 18
 - 2.4.3. Preparación del medio PDA + antibiótico (gentamicina) 18
 - Preparación de Medio PDA: 18
 - Determinar la cantidad total de antibiótico necesaria: 19
 - 2.4.4. Siembra de granos de maíz en cajas Petri con PDA 20
 - 2.4.5. Incubación 21
 - 2.4.6. Aislamiento 21
 - 2.4.7. Identificación 22
 - 2.4.8. Conservación 23
- 2.5. Variables Respuesta 24

Capítulo III 25

Resultados y Discusión	25
3.1. Aislamiento de hongos con potencial micotoxigénico en maíz blanco harinoso tipo chazo.	25
3.2. Identificación del género de los hongos aislados con potencial micotoxigénico.	25
3.2.1. Macromorfología	26
Se observaron colonias circulares, de color verde hasta el borde donde se vuelve blanco y textura aterciopelada o velutinoso (<i>Figura 2</i>).....	26
3.2.2. Micromorfología	26
3.3. Conservación de los aislados fúngicos obtenidos	27
 Capítulo IV	 29
Conclusiones y recomendaciones	29
4.1. Conclusiones	29
4.2. Recomendaciones	30
 Bibliografía:	 31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Anverso de uno de los aislados, de color verde y textura velutinosa.	25
Figura 2: Aislados de <i>Penicillium sp.</i>	26
Figura 3: Observación de <i>Penicillium sp.</i> a 40x en microscopio. A). Estructura en forma de pincel con sus ramificaciones. B). Cadenas de conidios con forma esférica.....	27
Figura 4: Observación de <i>Penicillium sp.</i> en el aislado de la segunda siembra.	27
Figura 5: Micelio de los aislados de <i>Penicillium.</i> puestos en tubos Eppendorf con solución de glicerol al 33% para llevar a conservación.	28

RESUMEN

En Ecuador, el maíz (*Zea mays*) es un cultivo de gran importancia económica y social, ampliamente utilizado en la alimentación humana y animal. Este grano es susceptible a ataques de hongos, entre los que destacan especies con potencial micotoxigénico como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Estos hongos producen metabolitos secundarios como aflatoxinas y fumonisinas, compuestos que afectan tanto la calidad y seguridad alimentaria como la salud humana y animal. Ante esta problemática, la identificación y aislamiento de estos hongos resultan cruciales para desarrollar estrategias efectivas de control y prevención de enfermedades asociadas a su presencia. Este estudio se centró en el aislamiento, identificación y conservación de hongos con potencial micotoxigénico presentes en maíz blanco harinoso tipo chazo. A partir de dos siembras e incubaciones de granos de maíz, se obtuvieron colonias con características macromorfológicas y micromorfológicas propias del género *Penicillium sp.* La identificación de los hongos aislados se basó en observaciones macroscópicas y microscópicas, complementadas con el uso de claves taxonómicas para clasificar los aislamientos. Los resultados permitieron determinar que las colonias pertenecen al género *Penicillium sp.*, un grupo conocido por su capacidad para producir micotoxinas, compuestos secundarios que representan riesgos significativos para la calidad alimentaria y la salud pública. Estas características, aunque nos ayudaron a la identificación, no se llevaron a cabo pruebas específicas para confirmar su capacidad micotoxigénica. Sin embargo, estudios previos respaldan la asociación del género *Penicillium* con la producción de metabolitos tóxicos en condiciones favorables. Para garantizar la conservación de los hongos aislados, se diseñó e implementó un protocolo basado en el uso de glicerol como crioprotector. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C en tubos Eppendorf, lo que permite una preservación. Este enfoque asegura la viabilidad de los aislamientos, manteniendo sus propiedades micotoxigénicas y su utilidad para investigaciones futuras.

Palabras clave: aislamiento, conservación fúngica, crioprotector, enfermedades agrícolas, glicerol, hongos micotoxigénicos, identificación, maíz, maíz blanco, medio, micotoxinas, *Penicillium sp.*, prevención, *Zea mays*.

ABSTRACT

In Ecuador, corn (*Zea mays*) is a crop of great economic and social importance, widely used in human and animal food. This grain is susceptible to fungal attacks, notably from species with mycotoxigenic potential such as *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium*. These fungi produce secondary metabolites like aflatoxins and fumonisins, compounds that affect both food quality and safety, as well as human and animal health. Given this issue, the identification and isolation of these fungi are crucial for developing effective strategies for controlling and preventing diseases associated with their presence. This study focused on the isolation, identification, and preservation of mycotoxigenic fungi present in white flour maize of the chazo type. From two sowings and incubations of maize grains, colonies with macromorphological and micromorphological characteristics typical of the genus *Penicillium* sp. were obtained. The identification of the isolated fungi was based on macroscopic and microscopic observations, supplemented with the use of taxonomic keys to classify the isolates. The results indicated that the colonies belong to the genus *Penicillium* sp., a group known for its ability to produce mycotoxins, secondary compounds that pose significant risks to food quality and public health. Although these characteristics aided in identification, specific tests to confirm their mycotoxigenic capacity were not carried out. However, previous studies support the association of the genus *Penicillium* with the production of toxic metabolites under favorable conditions. To ensure the preservation of the isolated fungi, a protocol was designed and implemented using glycerol as a cryoprotectant. The samples were stored at 4 °C in Eppendorf tubes, allowing for preservation. This approach ensures the viability of the isolates, maintaining their mycotoxigenic properties and their utility for future research.

Key words: Corn, agricultural diseases, cryoprotectant, fungal conservation, glycerol, identification, isolation, medium, mycotoxigenic fungi, *Penicillium* sp. mycotoxins, prevention, white corn, *Zea mays*.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En Ecuador, el maíz (*Zea mays*) es un alimento fundamental con gran importancia económica y social. Esta gramínea enfrenta ataques de varios patógenos que perjudican su rendimiento agrícola e industrial, como pueden ser hongos en los cuales poseen potencial micotoxigénico. El conocimiento de cuáles son estos hongos posiblemente micotoxigénicos nos aportan información con la cual se puede llevar a cabo investigaciones de aspecto científico y académico relevantes tanto conocimiento de cuáles pueden ser principales enfermedades del maíz como para un posible avance biotecnológico de instituciones dedicadas a la investigación (Estrada, 2021).

Conocer cuáles son los hongos que tienen potencial micotoxigénico y que se encuentran en el cultivo de maíz (*Zea mays*) es un aspecto crucial en la agricultura y la seguridad alimentaria. El maíz actúa como un medio adecuado para el crecimiento de estos hongos, que pueden contaminar el cultivo tanto en el campo como durante su almacenamiento. Los géneros de hongos más frecuentes que tienen potencial micotoxigénico en el maíz son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, los cuales sintetizan toxinas como aflatoxinas, fumonisinas y deoxinivalenol (DON), entre otras (Villela, Díaz, y Rodas, 2018).

El potencial micotoxigénico que tienen estos hongos del maíz puede afectar de forma adversa la calidad y seguridad de los alimentos. Las micotoxinas pueden representar un riesgo para la salud humana y animal, y su presencia en productos derivados del maíz puede llevar a la contaminación alimentaria. Estos hongos con potencial micotoxigénico pueden penetrar el maíz a través de diversas rutas, como las raíces, el tallo y la mazorca. Una vez dentro de la planta, son capaces de producir toxinas en los tejidos y los granos.

El aislamiento y la identificación de estos hongos potencialmente micotoxigénicos es fundamental, ya que nos proporciona el material necesario para investigar y desarrollar medidas para prevenir y controlar las enfermedades que provocan (Muñoz, Cisterna, y France, 2020).

El objetivo del presente trabajo fue contar con una colección de hongos con potencial micotoxigénico con el cual se pueda llevar a cabo posteriormente investigaciones para conocer el potencial de daño que tienen y mejoramiento de técnicas de manejo y control de los aislados.

MARCO TEÓRICO

Algunas especies de hongos pueden producir metabolitos secundarios tóxicos llamados micotoxinas, cuya formación ocurre en condiciones ecológicas favorables. El interés en los hongos y sus micotoxinas es significativo no solo desde un enfoque científico, sino también económico, debido a los diversos problemas que generan a lo largo de la cadena alimentaria, desde el agricultor hasta el consumidor final. Entre estos problemas se encuentran la disminución en los rendimientos de las cosechas, la baja en los índices productivos en los animales de granja, enfermedades en dichos animales y alteraciones en los alimentos. En los seres humanos, la exposición a las micotoxinas ocurre principalmente a través de los alimentos y, en algunos casos, por vía respiratoria, siendo la alimentación la principal fuente de riesgo.

Aunque la presencia de hongos no implica siempre la producción de micotoxinas, estas pueden persistir incluso cuando los hongos ya no están presentes. La forma más efectiva de evitar la contaminación por aflatoxinas es aplicar medidas preventivas desde el cultivo; sin embargo, controlar factores ambientales como la temperatura y la humedad es complicado en la práctica. Estos hongos suelen invadir tejidos que ya están debilitados o en proceso de deterioro, por lo que mantener el cultivo en buenas condiciones reduce el riesgo de que el micelio se desarrolle y la contaminación ocurra. Además, las buenas prácticas agrícolas disminuyen la probabilidad de estrés severo, que puede llevar a la producción elevada de micotoxinas en algunos hongos (Nesic, Habschied, & Mastanjevic, 2021).

El método seleccionado para conservar una colección de cepas de hongos depende en gran parte de los objetivos establecidos y de los recursos humanos y materiales disponibles. Es importante limitar el número de resiembras para prevenir la contaminación y el envejecimiento natural de las cepas. Asimismo, una identificación precisa de las cepas es fundamental, ya que aporta un valor añadido a la colección (Mata y Salmones, 2022).

El uso de características morfológicas es una herramienta clave para identificar hongos. Las propiedades morfológicas y anatómicas que presentan los hongos son fundamentales para diferenciarlos entre sí. Las características más comunes que se analizan incluyen la forma de la colonia, el color de la superficie, la textura y la producción de pigmentos. La efectividad de este método cualitativo ha sido confirmada mediante técnicas moleculares, las cuales han permitido comprender mejor la estructura, organización y función del genoma de los hongos (Hernández, Martínez, Pérez, Carrera, y García, 2022).

La combinación de varias condiciones climáticas adversas durante una temporada puede aumentar el riesgo de pudrición de las mazorcas y la contaminación por micotoxinas. La pudrición de mazorca de maíz más frecuente es la causada por *Penicillium* que resulta de la acción de diversas especies de *Penicillium*. Los síntomas se manifiestan como un moho polvoriento de color azul verdoso que aparece entre los granos cerca de la punta de la mazorca (Mundo Agropecuario, 2023).

1.1. Antecedentes Investigativos

Se han identificado varios cientos de micotoxinas, pero las más comunes que representan un problema para la salud humana y animal son las aflatoxinas, la ocratoxina A, la patulina, las fumonisinas, la zearalenona, el nivalenol y el desoxinivalenol (DON). Estas micotoxinas aparecen en la cadena alimentaria como resultado de la infección de los cultivos por mohos, ya sea antes o después de la cosecha. La exposición a las micotoxinas puede ocurrir directamente al consumir alimentos contaminados o de forma indirecta a través de animales que han ingerido alimento contaminado, especialmente a través de la leche (OMS, 2023).

No todos los hongos producen micotoxinas, por lo que un grano enmohecido no es necesariamente tóxico. Las micotoxinas pueden ser detectadas incluso en ausencia del hongo productor, ya que este puede haber sido inactivado por procesos químicos o alteraciones en las condiciones ambientales (Antón & Lizaso, 2019).

Para obtener los hongos se coloca, con una pinza estéril, el material vegetal infectado colocando sobre la superficie de una caja Petri que contiene agar papa dextrosa (PDA), y se incuba a una temperatura de 25-28 °C. Para obtener cada aislado se procede a realizar el mismo procedimiento, pero se reemplaza el material vegetal contaminado con una sección de 2 x 2 mm de micelio cada hongo aislado (Herrera et al., 2022).

Después de ser aisladas, las cepas se analizan bajo el microscopio. La identificación a nivel de género se realiza en función de las características morfológicas de sus colonias y de la observación de sus propiedades microscópicas, incluyendo los conidios, conidióforos y el arreglo de los conidios, con base en las claves taxonómicas (De Jesús Romero Fernández et al., 2020).

1.2. Categorías fundamentales

1.2.1. Macromorfología del hongo

Colonias

Desde una perspectiva macroscópica, las colonias de *Penicillium* presentan una forma circular u ovalada, crecen con rapidez y, en sus primeras etapas, son de color blanco. Según la especie y diversos factores, pueden adoptar tonos como verde, verde azulado, gris o rosado, entre otros. Su borde es liso y no presenta fructificaciones, permitiendo ver el color del micelio, que suele ser blanco; sin embargo, en algunas especies puede variar a amarillo, anaranjado, púrpura o marrón claro (Pérez et al., 2020).

Textura

El género *Penicillium* muestra diversidad en texturas y crecimiento, con colonias que pueden ser superficiales, intermedias o profundas, y de densidad variable. Las formas macroscópicas abarcan colonias planas, surcadas, plegadas o zonadas, estas últimas con variaciones de color y textura por cambios de temperatura. Algunas especies presentan un micelio suelto sobre el agar, dándole textura algodonosa, mientras que otras crecen bajo la superficie, con conidióforos de aspecto aterciopelado. Los conidióforos a veces se agrupan en fascículos o funículos, formando estructuras observables en ciertos medios. Varias especies también producen gotas de exudado o pigmentos solubles, cuyo color y presencia ayudan a la identificación taxonómica (Pérez et al., 2020).

1.2.2. Micromorfología del hongo

El género *Penicillium* se caracteriza por la presencia de conidióforos simples, altos y erguidos, que pueden ramificarse de forma simétrica o asimétrica, adoptando una apariencia semejante a la de un pincel o brocha. (estructura denominada penicilo) (DELGADO ARCE y PEREZ IARZA, 1997). Los conidióforos (o estípites) pueden ser individuales o agrupados y presentan distintos tipos de ramificación según la especie: monoverticilado (fiálides en el ápice), divaricado (métulas a distintas alturas), biverticilado (fiálides y métulas), terverticilado (con ramas adicionales), y cuadvverticilado (con ramillas). Estas estructuras hialinas tienen superficies que pueden ser lisas, rugosas o tuberculadas, con conidióforos de hasta 300 μm y métulas entre 8 y 12 μm (Pérez et al., 2020).

Fiálides y conidios

Las fiálides son estructuras conidiógenas donde se forman los conidios y pueden tener forma de botella o ampuliforme, con un cuello cónico y ápices anchos, o bien ser aceradas, casi cilíndricas, con un collar cónico y poros apicales diminutos; sus paredes son siempre lisas y miden entre 7 y 12 μm . Los conidios, organizados en largas y secas cadenas divergentes o en columnas, son del tipo fialoconidios, producidos sucesivamente en dirección basípeta. Estos son unicelulares y de forma esférica, elipsoidal, cilíndrica, fusiforme o piriforme, de color verde, verde azulado, verde oliva o gris en masa, y presentan paredes lisas, rugosas, verrucosas o espinosas, midiendo entre 2,5 y 4 μm , según la especie (Pérez et al., 2020).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Establecer una colección de hongos con potencial micotoxigénico, a partir su aislamiento e identificación en *Zea mays* variedad maíz blanco harinoso tipo chazo.

1.3.2. Objetivos específicos

- Aislar hongos con potencial micotoxigénico en maíz blanco harinoso tipo chazo.
- Identificar el género de los hongos aislados con potencial micotoxigénico.
- Conservar los aislados fúngicos obtenidos.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del estudio

El estudio se realizó en la provincia de Tungurahua en el cantón Cevallos en el Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental de la Universidad Técnica de Ambato en la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Campus Querochaca.

2.2. Caracterización del lugar

El experimento se llevó a cabo en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, en el sector de Querochaca. Este sector se encuentra ubicado a una altitud de 2868 msnm, en las coordenadas 01° 24' 27" S y 78° 35' 00" W, es un área de clima frío, con una temperatura promedio de 15 ° C, donde las lluvias son moderadamente frecuentes, Por lo tanto, el trabajo de es aislar hongos que tengan el potencial para producir micotoxinas, identificar su género y conservarlos. se realizó bajo condiciones control controladas.

2.3. Equipos y materiales

2.3.1. Equipos

- Balanza
- Cámara de flujo laminar
- Microscopio
- Incubadora
- Microondas
- Autoclave

2.3.2. Materiales

- Mazorcas de maíz contaminado
- Medio de cultivo PDA
- Cajas Petri
- Matraz
- Asas micológicas
- Jeringa
- Antibiótico (gentamicina)
- Placas porta objeto

- Agua destilada
- Pinzas
- Pipetas
- Hipoclorito de sodio
- Tubos Eppendorf
- Glicerol

2.3.3. Material de oficinas

- Rotulador
- Cámara fotográfica
- Cinta adhesiva

2.4. Manejo del Experimento

2.4.1. Obtención de la muestra

La primera muestra de mazorcas de maíz se obtuvo con la ayuda del local comercial de productos agropecuarios, GEMIAGRO, de la ciudad de Ambato. La segunda muestra de mazorcas de maíz se obtuvo de la producción de maíz de la familia Guano de Huambalo en el cantón Pelileo.

2.4.2. Esterilizar el área de trabajo

Se realizó la desinfección del área de trabajo y todo el material que se utilizó, con alcohol etílico al 70%, pulverizándolo sobre la superficie.

2.4.3. Preparación del medio PDA + antibiótico (gentamicina)

El agar nutritivo o medio PDA, es un medio de cultivo comúnmente utilizado en el aislamiento de tejidos de hongos. Para preparar el agar, se disuelve en agua destilada y se calienta hasta su completa disolución. Luego, se esteriliza en autoclave y se vierte en las cajas de Petri de 90 mm de diámetro.

Preparación:

- Preparación de Medio PDA:

Se prepararon 400 ml de Medio PDA para 20 cajas Petri las cuales se dispensarán con 20 ml del medio cada una.

Entonces:

Siguiendo las especificaciones del fabricante, se debe usar 39 gr del medio para 1 litro.

Aplicamos una regla de tres:

39 gr ----- 1000 ml

X ----- 400 ml

X = 15.6 gr de medio PDA que se pesaron en una balanza.

- Determinar la cantidad total de antibiótico necesaria:

La concentración recomendada es 50 mg/L. Para una preparación de 400 ml:

Cantidad necesaria = Concentración deseada × Volumen

Cantidad necesaria = 50 mg/L × 0.4 L = **0.20 mg**

Calcular el volumen de la solución stock requerido:

La concentración de la solución stock es:

$$\text{Concentración stock} = \frac{160 \text{ mg}}{2 \text{ ml}} = 80 \text{ mg/ml}$$

Se utilizará la siguiente fórmula para determinar el volumen necesario de la solución stock:

$$\text{Volumen necesario} = \frac{\text{cantidad necesaria}}{\text{concentración stock}} = \frac{20 \text{ mg}}{80 \text{ mg/ml}} = 0.25 \text{ ml}$$

Por lo tanto, se añadieron 0.25 ml de antibiótico en la preparación de medio 400 ml.

Procedimiento:

1. Se pesaron 15.6 gramos de Medio en la balanza analítica y se colocaron en el frasco de 400 ml.
2. Se aforó con agua destilada hasta los 400 ml.
3. Se mezcló hasta homogeneizar la solución.
4. Se añadieron los 0.25 ml de disolución de antibiótico.
5. Se autoclavó para su desinfección.
6. Se dispensaron 20 ml del medio en cada caja Petri antes de que se gelifique (lo aconsejable es ayudarse con una probeta o si se tiene más experiencia solamente una fina capa que llene el fondo de la caja).
7. Se recubrieron, las cajas Petri selladas, con aluminio para llevar a conservar para su posterior uso.

2.4.4. Siembra de granos de maíz en cajas Petri con PDA

La siembra del maíz es de manera directa, es decir, se siembran los granos directamente en contacto con el medio que está en las cajas Petri.

Desinfección de semillas:

Debimos preparar una solución acuosa de hipoclorito de sodio (NaOCl), en una concentración de 2%, a partir del producto que tenemos el cual tiene una concentración de 4% de hipoclorito de sodio.

Para alcanzar una concentración final dentro del rango de 2%, usamos la fórmula de la dilución:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Donde:

- $C1 = 4\%$ (concentración inicial).
- $C2 = 2\%$ (concentración final deseada).
- $V1$ = volumen de hipoclorito que necesitamos.
- $V2$ = volumen total de la solución que vamos.

Vamos a preparar 100 ml de solución al 2%

$$4\% \times V1 = 2\% \times 100 \text{ mL}$$

Despejando V1:

$$V1 = \frac{2\% \times 100 \text{ mL}}{4\%} = \frac{200}{4} = 50 \text{ mL}$$

Volumen de Agua

Ahora, calculamos el volumen de agua necesario:

$$V_{\text{agua}} = V2 - V1 = 100 \text{ mL} - 50 \text{ mL} = 50 \text{ mL}$$

Procedimiento:

1. Se midió 50 ml de hipoclorito al 4%.
2. Se agregó 50 ml de agua destilada.
3. Se mezcló bien la solución.
4. Se sumergieron las semillas durante 1 minuto en la solución al 2%.
5. Se lavaron con agua destilada las semillas durante 1 minuto.
6. Se dejaron secar sobre una toalla de papel absorbente para quitar el exceso de agua o NaOCL.
7. Se colocaron las semillas de manera equidistante, 5 semillas por caja Petri.
8. Se sellaron las cajas con cinta Parafilm®.
9. Se rotuló cada caja con la fecha de siembra.
10. Se cubrió con papel aluminio para llevar a incubación a 25 °C.

2.4.5. Incubación

Las cajas Petri ya sembradas y rotuladas se llevaron a la incubadora donde estuvieron durante 5 días a 25 °C para el desarrollo de los hongos.

2.4.6. Aislamiento

Después de 5 días en incubación a 25 °C se procedió al aislamiento de los hongos que se hayan desarrollado en las cajas Petri.

Simplemente observamos las colonias que se hayan desarrollado para poder tomar una porción del micelio y resembrar en agar fresco.

1. Se observó la forma y color de las colonias.
2. Con un asa micológica tomamos un pedazo del micelio y se colocó en una nueva caja Petri.
3. Se sellaron las cajas Petri con los asilados.
4. Se rotularon las cajas con la fecha y un código para distinguir el aislado.
5. Se cubrieron con papel aluminio las cajas Petri, preferiblemente por separados los aislados que sean diferentes, para llevar a incubación.
6. Se incubó a 25 °C durante 5 días.
7. De ser necesario luego del tiempo de incubación se puede realizar un re-aislamiento para purificar más la muestra.

2.4.7. Identificación

Luego del aislamiento se procedió a la identificación del género de los hongos que poseemos para lo cual seguimos con los siguientes pasos:

1. Preparar el área de trabajo, esterilizar con alcohol y preparar los mecheros.
2. Desinfectar con alcohol placas porta objetos.
3. Colocar una gota de azul de lactofenol en la placa porta objetos.
4. Cortar un pedazo de cinta adhesiva de aproximadamente 2 cm.
5. Topar la parte del micelio sin aplicar mucha presión con el pedazo de cinta adhesiva.
6. Poner la cinta con la muestra del hongo sobre la gota del azul de lactofenol. Este paso se puede realizar el número de veces que se desee realizar las observaciones (depende del número de colonias de hongos que se pueda visualizar).
7. Enfocar en el microscopio a 4x.
8. Observar las estructuras del hongo (Conidióforo, Conidio, forma de septos, etc.) a 40x.
9. Tomar fotografías de las estructuras que sean visibles.
10. Se identificó el género del hongo con ayuda de claves taxonómicas.
11. Se rotuló las cajas Petri de donde se obtuvo la muestra para observación con el nombre del género de los hongos identificados.

2.4.8. Conservación

Para la conservación y establecimiento de la colección de hongos con potencial micotoxigénico se utilizó glicerol y un pedazo del micelio de los aislados, el cual se llevó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml.

Primero se preparó una dilución de glicerol en proporciones de 3/1 v/v.

Para preparar una solución de glicerol para 20 tubos Eppendorf de 1.5 ml, donde cada tubo se dispensó con 1.0 ml de la solución, se procedió con el siguiente cálculo.

Cálculo del volumen total

1. Volumen total necesario:

$$20 \text{ tubos} \times 1.0 \text{ ml/tubo} = 20 \text{ ml}$$

Proporciones de glicerol y diluyente

Para una proporción de 3:1 de glicerol a diluyente:

- **Glicerol:** de 20 ml = 15 ml
- **Agua destilada:** de 20 ml = 5 ml

Preparación

1. Medir los ingredientes:

Medir 15 ml de glicerol.

Medir 5 ml de agua destilada.

2. Mezclar:

Verter el glicerol en un recipiente graduado.

Añadir el agua destilada lentamente mientras se agita suavemente para asegurar una mezcla uniforme.

3. Almacenamiento:

- Se dispensó la solución con una micropipeta de 1000 ml en cada tubo de Eppendorf.
- Se extrajo, con ayuda de un asa micológica, una porción de micelio de los aislados.

- Con cuidado de no maltrata el micelio se colocó cada porción los tubos con la solución de glicerol.
- Se rotuló cada tubo para posterior identificación del contenido.
- Se llevó a almacenamiento a 4 °C los tubos con la muestra de micelio.

2.5. Variables Respuesta

Aislamiento:

1. **Color de las colonias:** color de las colonias formadas por el hongo en el medio de cultivo. Los colores pueden ser clasificados en categorías (por ejemplo, blanco, amarillo, verde, negro) o pueden ser descritos usando códigos de color específicos (Pérez et al., 2020).
2. **Forma de las colonias:** forma general de las colonias, que puede ser redondeada, irregular, filamentosa, entre otras. Se puede clasificar en categorías, por ejemplo, circular, irregular, radial(Pérez et al., 2020).
3. **Textura de las colonias:** refiere a la superficie de las colonias, que puede ser lisa, rugosa, granulosa o velutinoso (Pérez et al., 2020).

Identificación:

1. **Forma del conidióforo:** forma de los conidióforos, que son las estructuras que producen conidios, además de ser las estructuras con las cuales principalmente se pueden identificar los géneros. Las formas pueden incluir características como rectos, curvados, ramificados, etc. (Pérez et al., 2020).
2. **Forma de los conidios:** morfología de los conidios, que puede incluir formas como esférica, cilíndrica, ovalada o alargada (Pérez et al., 2020).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aislamiento de hongos con potencial micotoxigénico en maíz blanco harinoso tipo chazo.

En la primera siembra de granos de maíz blanco harinoso tipo chazo, se lograron aislar colonias fúngicas que presentaron dos colores verde y blanco; y texturas algodonosa y velutinosa (*Figura 1*; **Error! La autoreferencia al marcador no es válida.**), indicando la presencia de especies potencialmente diversas. También el color del reverso de las colonias se pudo observar un color blanco-crema. No se observó presencia de transpiración en las colonias. Estos aislamientos fueron exitosamente transferidos y cultivados en medio PDA, donde su crecimiento permitió su diferenciación y rotulación para procedimientos posteriores. En la segunda siembra, aunque solo un aislamiento mostró crecimiento significativo, ya que se logró obtener solamente y de igual manera el mismo color verde y la misma textura velutinosa, se corroboró la efectividad del protocolo para obtener hongos específicos bajo condiciones controladas.



Figura 1: Anverso de uno de los aislados, de color verde y textura velutinosa.

3.2. Identificación del género de los hongos aislados con potencial micotoxigénico.

Debido a que solamente los hongos aislados de color verde presentaron los cuerpos fructíferos, por eso el color verde en las colonias, estos aislados se clasificaron dentro del

género *Penicillium* sp. género el cual ha sido catalogado, según informes previos, como potencial micotoxigénico debido a su capacidad de producir metabolitos secundarios (micotoxinas).

Para la identificación se recurrió a la observación microscópica de las estructuras de los aislados (**Figura 3**), conjuntamente con las características macroscópicas y en comparación con lo que dijeron Pérez et al. (2020) acerca de las estructuras observadas.

3.2.1. Macromorfología

Se observaron colonias circulares, de color verde hasta el borde donde se vuelve blanco y textura aterciopelada o velutinoso (**Figura 2**).

Tal como dijeron Pérez et al. (2020) que a nivel macroscópico las colonias de *Penicillium* tienen forma circular u ovalada, al inicio presentan un color blanco, pero dependiendo de la especie y otros factores, pueden adquirir tonalidades como verde, entre otros. El borde es liso, carece de fructificaciones y generalmente presenta el micelio de color blanco.



Figura 2: Aislados de *Penicillium* sp.

3.2.2. Micromorfología

Pérez et al. (2020) mencionaron que el género *Penicillium* se caracteriza por formar estructuras como ramas, métulas, fiálides y conidios, en una estructura ramificada semejante a un pincel llamado penicilo.

Mediante el uso del microscopio se pudieron identificar las estructuras del conidióforo con forma de pincel ramificado, así como lo mencionaron Pérez *et al.* (2020). Fiálides: se pudo

observar que las fiálides tienen forma ampuliforme o como de botella (**Figura 3, a**). Conidios: se observaron largas cadenas de los conidios que presentaron forma esférica (**Figura 3, b**).

Se observaron estas estructuras tanto en los asilados de la primera siembra (**Figura 3**) como los aislados de la segunda siembra (**Figura 4**).

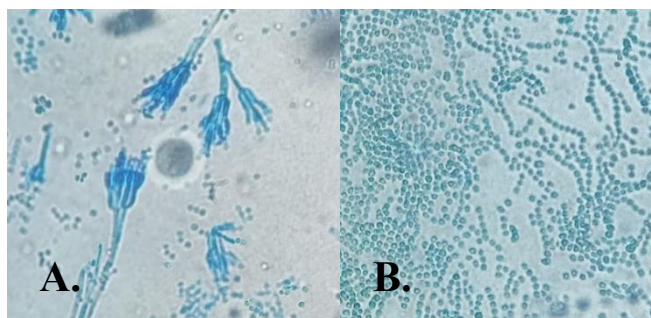


Figura 3: Observación de *Penicillium* sp. a 40x en microscopio. A). Estructura en forma de pincel con sus ramificaciones. B). Cadenas de conidios con forma esférica.

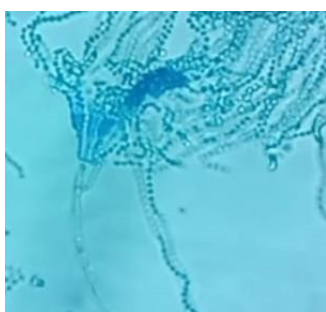


Figura 4: Observación de *Penicillium* sp. en el aislado de la segunda siembra.

3.3. Conservación de los aislados fúngicos obtenidos

Paul *et al.* (2015) indicaron que la preservación de especies fúngicas es crucial para su aplicación prolongada en la industria y en investigaciones científicas. Se ha comprobado que, al emplear diversas concentraciones de glicerol como conservante y almacenarlas a una temperatura de 4 °C en refrigeración, los hongos pueden mantenerse sin contaminarse durante un periodo de 24 a 30 meses.

Por lo cual se recurrió al uso del glicerol como conservante para estos aislados fúngicos que se obtuvieron, los cuales luego de haber identificado se pudieron clasificar como potencial micotoxigénico. Se llevó una pequeña porción del micelio a los tubos Eppendorf con solución de glicerol, los cuales se rotularon para marcar de que caja Petri se tomaron, para luego llevarlos al congelador para su conservación.

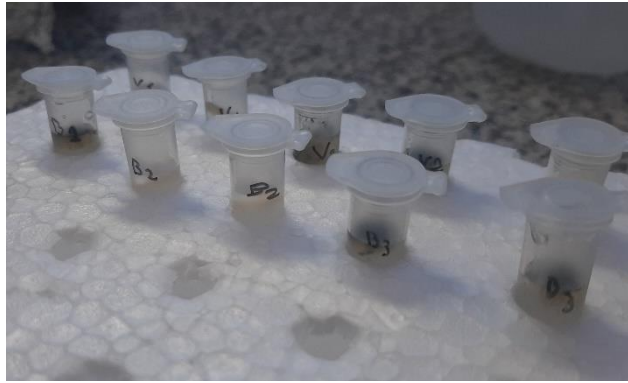


Figura 5: *Micelio de los aislados de Penicillium puestos en tubos Eppendorf con solución de glicerol al 33% para llevar a conservación.*

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

Aislamiento exitoso de hongos con potencial micotoxigénico

Se logró aislar hongos a partir de granos de maíz blanco harinoso tipo chazo, obteniendo colonias con características macroscópicas distintivas en color y textura. La transferencia y cultivo en medio PDA permitieron su desarrollo y diferenciación, validando la efectividad del protocolo aplicado.

Identificación del género de los hongos aislados

Mediante el análisis macroscópico y microscópico, se determinó que los hongos de color verde pertenecen al género *Penicillium* sp. La observación de estructuras características, como conidióforos ramificados en forma de pincel, fiálides ampuliformes y conidios en cadenas, permitió confirmar su clasificación según referencias previas.

Conservación eficiente de los aislados fúngicos

Se implementó con éxito la conservación de los hongos aislados utilizando glicerol como medio de preservación, lo que permitirá mantener su viabilidad a largo plazo sin riesgo de contaminación. La obtención y conservación de estos hongos representa un paso importante en la generación de una colección de cepas con potencial micotoxigénico. Su estudio contribuirá a una mejor comprensión de la presencia de estos organismos en cultivos de maíz y sus implicaciones en la salud pública y la industria agroalimentaria.

4.2. Recomendaciones

- Se sugiere llevar a cabo pruebas específicas para confirmar la capacidad micotoxigénica de las cepas aisladas de *Penicillium* sp. Esto podría incluir la extracción de metabolitos secundarios y la evaluación de su toxicidad en modelos celulares o en animales de laboratorio.
- Considerar la inclusión de otros tipos de maíz y granos en futuros experimentos para determinar si las especies de hongos identificadas tienen un comportamiento similar en diferentes matrices alimenticias. Lo que podría ofrecer una visión más amplia sobre la contaminación fúngica y micotoxigénica.
- Aunque se logró el aislamiento exitoso de hongos, se recomienda optimizar los protocolos utilizados, evaluando diferentes medios de cultivo, temperaturas y condiciones de humedad para mejorar la diversidad y cantidad de aislados.

BIBLIOGRAFÍA:

- Antón, A., & Lizaso, J. (2019). *HONGOS Y MICOTOXINAS*.
https://www.adiveter.com/ftp_public/articulo578.pdf
- de Jesús Romero Fernández, A., Mota, R. M. A., & Mendoza-Villarreal, R. (2020). Aislamiento y selección de hongos de suelo solubilizadores de fósforo nativos del estado de Coahuila, México. *Acta Botanica Mexicana*, 126. <https://doi.org/10.21829/ABM126.2019.1390>
- DELGADO ARCE, R., & PEREZ IARZA, G. (1997). *CARACTERISTICAS BIOLOGICAS DE *Penicillium digitatum*, *P. italicum* Y *P. ulaiense* EN POSTCOSECHA DE CITRUS*.
https://www.researchgate.net/publication/303752626_CARACTERISTICAS_BIOLOGICAS_DE_Penicillium_digitatum_P_italicum_Y_P_ulaiense_EN_POSTCOSECHA_DE_CITRUS
- Díaz, B., Rodas, E., & Villela, S. (2018). *PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN GRANOS DE MAÍZ (*Zea mays* L.) PRODUCIDOS Y CONSUMIDOS POR LAS FAMILIAS DE CUATRO MUNICIPIOS DE LA REGIÓN CH'ORTI'DELCH'ORTI'DEL DEPARTAMENTO DE CHIQUIMULA*.
<https://www.icta.gob.gt/publicaciones/Informes%20Finales%20IICA-CRIA%202020/9%20MAÍZ%20ORIENTE/Micotoxinas-Servio%20Villela-CUNORI/MICOTOXINAS%20EN%20MAÍZ%20REGION%20CHORTÍ.pdf>
- Estrada, M. (2021). *PRINCIPALES ENFERMEDADES DEL MAÍZ (*ZEА MAYS*, L.) EN ECUADOR*.
https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwiJ-_Gy8tmIAxV9SDABHXbcAsYQFnoECBQQAQ&url=https%3A%2F%2Faes.ucf.edu.cu%2Findex.php%2Faes%2Farticle%2Fdownload%2F469%2F446%2F900&usg=AOvVaw0Qurk7CVqHQg4ZJOQLbCOB&opi=89978449
- Herrera, R., de Von Chong, M., Bethancourt, A., Hernández, R., Mejía, F., & Carrasco, I. (2022). *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON CAPACIDAD ENTOMOPATÓGENA EN EL CULTIVO DE YUCA CONTRA EL CHINCHE *Cyrtomenus**

- bergi, *FROESCHNER (CYDNIDAE) EN LAS PROVINCIAS DE COCLÉ Y HERRERA*.
<http://portal.amelica.org/ameli/journal/343/3433504012/>
- Mundo Agropecuario. (2023, July 3). *Mazorcas de maíz y micotoxinas*.
<https://mundoagropecuario.com/mazorcas-de-maiz-y-micotoxinas/>
- Muñoz, V., Cisterna, V., & France, A. (2020). *Aislamiento de microorganismos fitopatógenos*.
<https://biblioteca.inia.cl/server/api/core/bitstreams/bab26591-2dc1-493d-b285-9b5f46f528e1/content#:~:text=El%20aislamiento%20y%20la%20preservación,sus%20mecanismos%20de%20patogenicidad%2C%20etc.>
- Nešić, K., Habschied, K., & Mastanjević, K. (2021). Possibilities for the Biological Control of Mycotoxins in Food and Feed. In *Toxins* (Vol. 13, Issue 3). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/TOXINS13030198>
- OMS. (2023, October 2). *Micotoxinas*.
- Paul, J. S., Tiwari, K. L., & Jadhav, S. K. (2015). Long term preservation of commercial important fungi in glycerol at 4°C. *International Journal of Biological Chemistry*, 9(2), 79–85. <https://doi.org/10.3923/ijbc.2015.79.85>
- Pérez, M., Sánchez, G., Martínez, R., Garza, J., & Espinosa, J. (2020a). *Mohos productores de micotoxinas*.
- Pérez, M., Sánchez, G., Martínez, R., Garza, J., & Espinosa, J. (2020b). *Mohos productores de micotoxinas*.
https://masam.cuautitlan.unam.mx/mohos_toxigenos_unigras/penicillium.html
- Rubio-Godoy Director General Víctor Manuel Bandala Muñoz Secretario Académico Mario Enrique Favila Castillo, M., Alberto Rísquez Valdepeña Secretario Técnico Lic Rubey Baza Román Director de Administración, M., Mata, G., & Salmenes Editores, D. (2022). *INSTITUTO DE ECOLOGÍA, A.C. CENTRO PÚBLICO DE INVESTIGACIÓN CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA*.
<https://www.uv.mx/personal/elsanmartin/files/2022/06/Hongos-Endofitos-Tecnicas-de-Aislamiento-Cultivos-y-Conservacion-de-Cepas-de-Hongos.pdf>