

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HONGOS MICOTOXIGÉNICOS EN ALIMENTO PARA BOVINOS

René Santibáñez Escobar¹, Margarita Hernández Gallardo², ^o Oziel Dante Montañez Valdez¹, José María Tapia González¹, José Alejandro Martínez Ibarra¹, Juan Humberto Avellaneda Cevallos^{3,4},

¹Departamento de Desarrollo Regional, Centro Universitario del Sur, Universidad de Guadalajara, Av. Prolongación Colón s/n Km 1 Ciudad Guzmán-Guadalajara Ciudad Guzmán Jalisco. ^o montanez77@hotmail.com

²Departamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Km 15.5 carretera a Nogales, Predio Las Agujas, Zapopan Jalisco

³Unidad de Investigación Científica y Tecnológica, Universidad Técnica Estatal de Quevedo, km 7 vía Quevedo - El Empalme, C. P. 73. Mocache, Los Ríos, Ecuador

⁴Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, Ecuador

RESUMEN

Se identificó y cuantificó cepas fúngicas productoras de micotoxinas y grado de contaminación por aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, en alimento para bovinos en el municipio de Zapotlán, El Grande Jalisco, México. Se tomaron muestras de alimento para vacas lecheras y ganado de engorda de 30 unidades productoras. La identificación de las cepas fúngicas productoras de micotoxinas se realizó mediante caracterización macroscópica de colonias cultivadas bajo la técnica de vaciado en placa, y la identificación posterior de la morfología microscópica del hongo, para la cual se aislaron las cepas identificadas mediante la técnica de microcultivo. La cuantificación de cepas fúngicas se realizó mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y clasificadas bajo el criterio de tres escalas; a) Recuentos bajos (10²-10³); b) Recuentos moderados (10⁴ - 10⁵) y c) Recuentos altos (10⁶ - 10⁷). Para la identificación del tipo de aflatoxinas se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina. De las muestras procesadas se obtuvieron recuentos de UFC en la siguiente proporción: Recuentos altos (10⁶-10⁷ UFC g⁻¹) 56.66%, recuentos moderados: (10⁴-10⁵ UFC g⁻¹) 36.66%, recuentos bajos: (10²-10³ UFC g⁻¹) 6.66%. Se aislaron un total de 148 cepas fúngicas, correspondiendo los porcentajes más altos a los siguientes géneros: *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. Se detectaron 33.33% de muestras positivas a aflatoxinas, dentro de las cuales se identificaron B₁, B₂, G₁ y G₂, todas en alta concentración, con 46.66% de muestras con fluorescencia positiva que no correspondieron a los estándares de aflatoxinas y 20% de muestras negativas.

Palabras claves: Bovinos, Alimento, Aflatoxinas

ABSTRACT

Identified and quantified Mycotoxin-producing fungal strains was identified and quantified, and the degree of contamination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, in the cattle food in the town of Zapotlán El Grande Jalisco, México was determined. Samples were fed to dairy cows and beef cattle 30 production units. The identification of mycotoxin-producing fungal strains was performed by characterizing macroscopic colonies grown under the plate casting technique, and the subsequent identification of the microscopic morphology of the fungus, for which isolated the strains identified by the technique microculture. Quantification of fungal strains was performed by counting colony forming units (CFU) and classified under the criteria of three scales: a) low counts (10²-10³), b) moderate counts (10⁴ - 10⁵) and c) high counts (10⁶-10⁷). To identify the type of aflatoxin used the technique of thin layer chromatography. Of the samples were obtained CFU counts in the following proportions: high counts (10⁶-10⁷ CFU g⁻¹) 56.66%, moderate counts (10⁴-10⁵ CFU g⁻¹) 36.66% and low counts (10²-10³ CFU g⁻¹) 6.66%. A total of 148 fungal strains were isolated, the highest percentages correspond to the following genera: *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp. and *Aspergillus* spp. 33.33% were detected aflatoxin positive samples, among which were identified B₁, B₂, G₁ and G₂, all in high concentrations, also was obtained 46.66% of samples with positive fluorescence did not correspond to the standards of aflatoxins and 20% of negative samples.

Key words: Bovine, Feedstuff, aflatoxins.

Recibido: 8-Junio-2011. Recibido en forma corregida: 23-junio-2011.

Aceptado: 23-Junio-2011.

Publicado como ARTÍCULO en Ciencia y Tecnología 4(1): 19-23, 2011

INTRODUCCIÓN

La contaminación por hongos del alimento para bovino, causa serios problemas, dado que los tóxicos que producen, disminuyen la calidad del alimento y al mismo tiempo, la respuesta animal causando con ello una baja producción. Dentro de las sustancias tóxicas, se encuentran las micotoxinas, definidas como un metabolito tóxico secundario producido por un moho, entre las que destacan las aflatoxinas, las cuales han sido objeto de amplias investigaciones en los últimos años, especialmente en relación con sus efectos. Durante muchos años el nombre de *Aspergillus flavus* ha sido considerado como el único productor de aflatoxinas, pero en realidad es un grupo de especies de hongos los que pueden producir estos metabolitos (Flores *et. al.*, 2006). Las aflatoxinas pueden formarse, en productos alimenticios antes y después de la cosecha, se han encontrado cada vez con mayor frecuencia en alimentos que se guardan en condiciones de humedad y temperaturas favorables a su desarrollo y en condiciones inadecuadas de almacenamiento. Las aflatoxinas han sido caracterizadas en cuatro grupos de distinto compuesto químico interrelacionados a los que se les llamó B (blue) y G (green) y los subíndices 1 y 2 para cada molécula química relativa a su movilidad cromatográfica. Estos compuestos pueden separar o adicionar un radical alcohol, hidroxilo, oxidrilo o una doble ligadura lo que da diferentes propiedades a cada uno de los compuestos (Peña y Duran 1990; Montemayor, 1993; Reyes *et. al.*, 2009).

En el ganado productor de leche al ingerir dosis diarias de 2,300 a 4,200 ppb de aflatoxina B₁, por un período de tres semanas a un mes producen un deterioro marcado en la salud y a la vez una reducción en el consumo de alimento, por lo que la producción de leche se disminuye. Además se ha reportado que cuando la aflatoxina B₁, es ingerida por bovinos, ésta inhibe las bacterias ruminales, reduce la digestibilidad de la celulosa y baja la concentración de ácidos grasos volátiles y la relación acético: propiónico (Hussein y Brasel, 2001; Masoero *et al.*, 2007). La aflatoxina M₁, es un metabolito de la B₁ que se produce en el hígado de un animal o persona que ha consumido alimento contaminado. La M₁ es muy importante porque se acumula en leche, tejidos y huevo aproximadamente 24 h después del consumo de alimento, eliminándose en leche en una proporción de 300 µg de B₁ kg⁻¹ alimento a 1 µg de M₁ L⁻¹ de leche (Fernández, *et. al.*, 1997; Montaña *et al.*, 2007), sus efectos tóxicos son similares a los de B₁, sobresaliendo los mutagénicos, hepatotóxicos, inmunosupresivos y carcinogénicos, por lo que ocasionan un serio problema de salud pública. Desafortunadamente uno de los mayores grupos consumidores de leche como son los

infantes y adolescentes, son también los más sensibles a los efectos de la M₁. Por lo anterior el objetivo de este trabajo es determinar y cuantificar la cantidad de hongos micotoxigénicos presentes en el alimento usado en las explotaciones bovinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en treinta unidades de producción bovina en el municipio de Zapotlán, El Grande Jalisco, México, en las que se colectaron 30 muestras de dos kg de alimento comercial o alimento elaborado y almacenado en la granja. Las muestras fueron enviadas para su procesamiento al Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara. El tiempo que transcurrió del muestreo al análisis para cuantificar e identificar los hongos así como las aflatoxinas no fue mayor a 36 h, para las siguientes determinaciones:

Identificación de hongos mediante la técnica de cultivo de vaciado en placa.

Preparación del medio de cultivo estéril utilizando 30 g de agar papa dextrosa en 1 L de agua. A cada 100 mL del medio se adiciona 1 mL de solución rosa de bengala al 0.6% y 0.5 mL de una solución de antibiótico, en este caso ampicilina de 200 mg del antibiótico en 10 mL de agua destilada estéril. a) Vaciado de las placas. Se preparan las placas de cultivo estériles adicionando 15 mL del medio de cultivo. b) Se prepara una solución estéril de peptona de caseína al 0.1% con un pH ajustado a 7 para hacer la dilución de las muestras de alimento recolectadas. c) Dilución de la muestra. Se diluyen 10 g de la muestra de alimento en 90 mL del agua peptonada (1 g de peptona, 8.5 g de cloruro de sodio en un litro de agua ajustada a un pH 7 con cloruro de sodio 1N) y de ésta se hacen diluciones de 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴ inoculando 1 mL de cada dilución en las placas de cultivo. d) Incubación. Se llevan a la estufa de incubación a una temperatura de 20° C por un periodo de 72 a 120 horas. e) Microcultivo. De las cepas aisladas del crecimiento fúngico se inoculan en microcultivos de agar papa dextrosa y se incuban por un periodo de 72 a 120 horas para la identificación microscópica del hongo. f) Identificación de las cepas fúngicas. Los criterios que se utilizaron para la identificación de hongos productores de aflatoxinas, se basó en la caracterización macroscópica de las colonias fúngicas y la preparación de fróntis húmedos a partir de microcultivos con el fin de determinar la morfología microscópica tomando en cuenta: identificación de

hifas, identificación de esporas sexuales y asexuales, identificación de estructuras estromáticas, nutrición y crecimiento.

Cuantificación de cepas fúngicas.

La norma utilizada como criterio para clasificar la concentración de hongos en la mayoría de los alimentos terminados es la siguiente: $10^2 - 10^3$ recuentos bajos, $10^4 - 10^5$ recuentos moderados, $10^6 - 10^7$ recuentos altos. Estas interpretaciones se utilizaron para determinar los factores de propagación de las toxinas en el alimento para bovino.

Determinación cualitativa y cuantitativa de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂,

Se realizó por el método de cromatografía en capa fina. Para la identificación de las cuatro aflatoxinas se basó en la observación de fluorescencia azul-verde bajo la luz ultravioleta de onda corta (260 nm) y onda larga (360 nm) tomando como patrón el estándar de referencia de la AOAC (1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de cepas fúngicas.

El 100% de las muestras analizadas mostró contaminación por hongos, de las cuales se aislaron un total de 148 cepas. Las cepas encontradas se pueden clasificar en hongos de campo y hongos de almacén, entre los hongos de campo encontramos: *Cladosporium*, *Fusarium* y *Alternaria*, que causan problemas a las plantas y que son transmitidos de un ciclo a otro por las semillas. La principal diferencia entre los hongos de campo y los hongos de almacén son los requerimientos de agua para crecer. Los hongos de campo requieren humedades relativas de 90 a 100%, en cambio los de almacén pueden crecer en humedades relativas de 65 a 90%, condiciones de humedad muy frecuentes en el almacenamiento de granos (Carrillo, 2003). El presente trabajo enfocó su atención en aquellos hongos que producen alteraciones en los alimentos, así como las aflatoxinas, por ser consideradas las micotoxinas de mayor importancia en la producción animal. De las cepas aisladas se identificaron un total de 11 géneros distintos (Cuadro 1), de los cuales el 73.63% correspondió a *Cladosporium spp.*, *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.* y *Fusarium spp.*, considerados todos como productores de aflatoxinas y otros tipos diferentes de aflatoxinas.

El género *Cladosporium* es un hongo de campo, sin embargo se le ha encontrado en mazorcas de maíz que se almacenan con altos contenidos

Cuadro 1. Géneros identificados y porcentaje encontrado

GENERO	%
<i>Cladosporium</i> spp.	25.67
<i>Penicillium</i> spp.	21.62
<i>Aspergillus</i> spp.	16.89
<i>Fusarium</i> spp.	9.45
<i>Absidia</i> spp.	6.08
<i>Mucor</i> spp.	4.72
<i>Tricoderma</i> spp.	3.37
<i>Epicocum</i> spp.	2.02
<i>Paecelomices</i> spp	2.01
<i>Alternaria</i> spp	1.90
<i>Phoma</i> spp.	0.67
Otros	5.50

de humedad. Tiene la capacidad de crecer a bajas temperaturas, aún bajo 0°C, su capacidad toxígena no ha sido claramente definida. El *Fusarium*, para su desarrollo requiere actividad de agua de más de 0.9, además, tiene una gran variedad de especies de importancia fisiopatológica (Martins and Martins, 2000). Este es junto con *Aspergillus* y *Penicillium*, uno de los géneros más importantes en la producción de micotoxinas que afectan a los animales domésticos (Hussein and Brasel, 2001). Al género *Absidia* y *Mucor*, se les encuentra como habitantes del suelo, y en materia orgánica en descomposición. Frecuentemente se aísla de granos, alimentos balanceados y sus ingredientes, esto concuerda con resultados obtenidos en este estudio al encontrarlo como contaminante del alimento para bovinos. Dado que los alimentos para animales tienen los nutrientes para cubrir las necesidades de los hongos, los factores ambientales de humedad y temperatura, son los responsables de acelerar su crecimiento y reproducción.

Recuentos de unidades formadoras de colonias.

El 100% de las muestras analizadas, mostró contaminación por hongos, correspondiendo el 56.66% de los recuentos altos de 10^6-10^7 g⁻¹ unidades formadoras de colonias (UFC) recuentos moderados de 10^4-10^5 UFC g⁻¹ en un 36.66%, recuentos bajos de 10^2-10^3 UFC g⁻¹ en un 6.66%; además de acuerdo al número de cepas identificadas, cada muestra está contaminada en promedio por cinco cepas diferentes de hongos. Estos datos son de suma importancia para el análisis de los resultados obtenidos en la determinación de aflatoxinas.

Determinación cualitativa y cuantitativa de aflatoxinas.

Se detectaron 33.33% de muestras positivas a aflatoxinas, encontrando en su mayoría la B₁ en un 70%, la B₂ en 30%, la G₂ y G₁ en un 40 y 10%, todas ellas con una concentración de 81 ppb. Además, se obtuvo un 46.66% de muestras que dieron lecturas con fluorescencia positiva que no correspondieron a los estándares de aflatoxinas y un 20% de muestras con lectura negativa. Aún cuando el 33.33% de las muestras se encontraron positivas a aflatoxinas hay que señalar que es un porcentaje elevado y más importante aún es que el 70% de las muestras positivas correspondieron a aflatoxina B₁, que es metabolizada por los bovinos y eliminada con la leche en forma de aflatoxina M₁, lo cual constituye un problema de salud pública ya que tiene efectos mutagénicos, hepatotóxicos, inmunosupresivos y carcinogénicos en quien la consume (Bazua, 2007), por lo que es recomendable establecer un sistema de control y vigilancia estableciendo un límite máximo de concentración de ésta aflatoxina en productos lácteos destinados para consumo humano como se ha establecido en otros países. De la misma forma, es recomendable establecer un sistema de control sobre los granos e ingredientes utilizados en la elaboración de alimento para animales y su almacenamiento ya que las concentraciones de aflatoxinas encontradas representan no solo un grave riesgo para la salud animal sino una considerable baja en la producción. Así mismo hay que considerar el potencial productor de aflatoxinas de las cepas encontradas como peligroso, ya que el 93.32% de las muestras mostraron alta y moderada contaminación por hongos. De igual forma se sugiere continuar las investigaciones en la identificación de otros tipos de micotoxinas considerando que un 46.66% de las muestras procesadas, mostraron fluorescencia positiva que no correspondió a los estándares de aflatoxinas y solo un 20% de las muestras fueron negativas. Actualmente se desarrollan nuevos métodos para la identificación y evaluación cuantitativa de las aflatoxinas en los tejidos animales tales como la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) para la determinación de aflatoxinas en alimentos para humanos y animales lo que ha representado un avance significativo sobre otros métodos de análisis, por su sensibilidad y precisión en la detección de diversos compuestos (Bermúdez *et al.*, 2002).

CONCLUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos podemos concluir que el total de las muestras analizadas mostró contaminación por hongos, con recuentos de

unidades formadoras de colonias (UFC) de 56.6%, encontrando principalmente el género *Cladosporium spp.*, seguido del *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.* y *Fusarium spp.* encontrando concentraciones de las aflatoxinas sumamente elevadas, y totalmente fuera de los parámetros permitidos, por lo que es necesario la aplicación del reglamento para el control y vigilancia de la contaminación por hongos y aflatoxinas tanto en el alimento para consumo humano como animal.

LITERATURA CITADA

- AOAC, 1997. Official Methods of Analysis, 16th ed. Assoc. Offic. Anal. Chem. Arlington, VA, USA.
- Bazua, R. 2007. Las micotoxinas, una amenaza constante en la alimentación animal. In: 1. Criterios de calidad de alimentos y su implicancia en la salud animal y humana. IX Encuentro de Nutrición y Producción en Animales Monogástricos, Montevideo, Uruguay. 21-28p.
- Bermúdez, A. M., Espinosa P.A., Valenzuela Q. A. I. y Vázquez M.L. 2002. Extracción y determinación de aflatoxinas en muestras de hígado y músculo de cerdos Revista Científica, FCV-LUZ / 12(1) 53-59.
- Carrillo, L. Microbiología Agrícola. 2003. Universidad Nacional de Salta. (en línea). Consultado 30 May. 2011. Disponible en <http://www.unsa.edu.ar/matbib>
- Fernández, A., Belio, R., Ramos, J. J, Sanz, M. C. and Saez, T. 1997. Aflatoxins and their metabolites in the tissues, faeces and urine from lambs feeding on an aflatoxin-contaminated diet. J. Sci. Food Agric. 74:161-168.
- Flores, O. C. M., Hernández, P. L. B. y Vázquez M. J. 2006. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el año 2003. Tec Pec. Méx 44:2247-256.
- Hussein, S. H. and Brasel, J. M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Review. Toxicology 167:101-134.
- Martins, M. L. and Martins, H. M. 2000. Aflatoxin M1 in raw and ultrahigh temperature – treated milk commercialized. Food Addit Contam 17:871-874.
- Masoero F, Galloa, A, Moschinia, M., Pivaa, G. and Diaza, D. 2007. Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. Animal 2007 1:1344-1350.
- Montaño, P. B. V., Chirico, M. I. y Gemio R. 2007. Estudio toxicológico de presencia de aflatoxina M1 en leche bovina recolectada del municipio de Achacachi. Rev. Bol. Quim 24:90-94.

- Montemayor A. 1993. Micotoxinas, su importancia en salud humana y producción animal. *Agrocultura* 20: 20-21.
- Peña, D. S. y Durán, B. 1990. Efecto toxico de las aflatoxinas en la dieta. *Ciencia y Desarrollo* 16:61-64.
- Reyes, V. W., Martínez S.P, Espinoza, V. H. I., Nathalm V. M. A, De Lucas P. E. y Rojo, F. 2009. Aflatoxinas totales en raciones de bovinos y AFM1 en leche cruda obtenida en establos del estado de Jalisco, México. *Tec Pecu. Méx.* 47:223-230.