

IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE HONGOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS EN INSUMOS DE ALIMENTOS BALANCEADOS PARA AVES- HUACHO 2010

FUNGI IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION AFLATOXINS PRODUCING IN PRODUCTS OF BIRD FEED- HUACHO 2010

Betty M. Palacios Rodríguez¹; Cecilia M. Mejía Domínguez¹; Soledad Llañez Bustamante¹; Maria del Rosario Farromeque Meza¹

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se identificaron y cuantificaron hongos productores de aflatoxinas en insumos de alimentos balanceados para aves que se expendían en la ciudad de Huacho, como maíz molido, harina de pescado, muñuelo, torta de soya y pasta de algodón; determinándose la presencia de hongos de los géneros: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Mucor* y *Geotrichum*. El recuento total de hongos en las muestras analizadas, variaron desde 3 a 20×10^3 UFC/g, siendo mayor en torta de soya con 20×10^3 UFC/g y maíz molido 18×10^3 UFC/g y en menor proporción en pasta de algodón que varió desde 2 a 4×10^3 UFC/g. Siendo de una calidad micológica de regular a bueno. En cuanto a la concentración de aflatoxinas, se encontraron rangos de $0,6$ a $3,4$ ppb, siendo las muestras de maíz molido y muñuelo los más contaminados con $3,3$ y $3,4$ ppb respectivamente, pero representan valores muy por debajo de los límites máximos permisibles.

Palabras claves: Micotoxinas, fumonisina, torta de soya.

ABSTRACT

In the present research were identified and quantified aflatoxins-producing fungi in feed supplies for birds that are sold in the city of Huacho, as maize meal, fish meal, muñuelo, soybean cake and cotton pulp were tested for the presence of fungi of the genres: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Monilia*, *Mucor* and *Geotrichum*. The total count of fungi in the samples analyzed ranged from 3 to 20×10^3 UFC/g was higher in soybean cake with 20×10^3 UFC/g and 18×10^3 UFC/g ground corn and less cotton pulp ratio ranging from 2 to 4×10^3 UFC/g. Being a mycological quality fair to good. As the concentration of aflatoxins were found ranges from $0,6$ to $3,4$ ppb, with samples of ground corn and the most contaminated muñuelo $3,3$ and $3,4$ ppb respectively, but represent values well below maximum permissible limits

Key words: Mycotoxin, fumonisin, soybean cake

¹ Facultad de Bromatología y Nutrición. E-mail: bpalacios@unjfsc.edu.pe

INTRODUCCIÓN

La contaminación de los alimentos y piensos por micotoxinas ha suscitado un gran interés a nivel mundial, debido a sus efectos perjudiciales sobre la salud y la economía. Estas son compuestos de bajo peso molecular y altamente reactivos, producidos por diversos hongos. Los hongos invaden los cultivos en el campo y contaminan los productos agrícolas durante las etapas posteriores a la cosecha, como el almacenamiento, debido a las condiciones que favorecen su proliferación y cuando éstos se multiplican en los alimentos como resultado de su metabolismo.

De los géneros de hongos que crecen en piensos los más estudiados son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicilium*, los que producen toxinas tan agresivas como las Aflatoxinas, Ocratoxinas, Tricotocenos, Oosporeina, Fumonisinias, Esterigmatocistina, Citrinina, Patulina, etc, que afectan al hombre y a los animales.

Los efectos tóxicos de las micotoxinas comúnmente observados en los animales son desde la mala absorción de nutrientes hasta la muerte del animal, los signos comunes por intoxicación con micotoxinas son: Disminución de las ganancias de peso debidas esencialmente a una disminución de la síntesis de proteína y ácidos nucleicos; disminución en el consumo de alimento y por lo tanto de la eficiencia alimenticia; reducción de la respuesta inmune. En aves la disminución en la producción y calidad de los huevos, algunas de las micotoxinas son tumorigénicas, mutagénicas².

Los géneros de hongos que más frecuentemente contaminan al maíz en forma natural son: *Helminthosporium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* y *Aspergillus*. Las especies más importantes de los géneros mencionados son: *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, debido principalmente a su capacidad potencial de producir fumonisinasy aflatoxinas³. De estas dos toxinas, las aflatoxinas son las sustancias más cancerígenas en la naturaleza⁴ y existe una correlación positiva entre casos de cáncer en humanos e ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas⁵.

La presencia de las micotoxinas ha causado un efecto económico negativo considerable en las industrias de cereales, avícola y ganadera. Entre los animales, las aves de corral y el ganado porcino se han visto afectados por micotoxinas como la aflatoxina, la fumonisinina y la zearalenona. El costo directo de las aflatoxinas en Tailandia, Indonesia y Filipinas debido a los efectos de *Aspergillus flavus* y de la contaminación por aflatoxinas del maíz y el maní se ha cifrado recientemente en más de 470 millones de dólares australianos al año. El maíz fue el producto más importante, con un costo del 66% del importe total. El 48% del costo estimado correspondió a Indonesia, que fue el país más afectado. Las pérdidas derivadas del deterioro ascendieron al 24 por ciento (108 millones de dólares australianos) al año⁶.

Una combinación de micotoxinas puede ocasionar pérdidas mayores en la producción que, cada una de esas micotoxinas por separado. Se han asociado a ellas pérdidas económicas a título de reducción de la productividad, como por ejemplo la producción de huevos, efectos reproductivos, y vulnerabilidad e infecciones que ocasionan un aumento de la morbilidad y mortalidad.

El diagnóstico de los trastornos causados por las aflatoxinas sobre la producción de huevos es posible solamente luego de algunos días o semanas. La presencia de folículos preovulatorios, formados antes del consumo de la micotoxina en el tracto reproductivo de las aves, justifica la respuesta tardía. La reducción de la producción de huevos está precedida por el descenso en los niveles sanguíneos, de proteínas y lípidos. Ponedoras que consumen una dieta conteniendo 5 ppm de aflatoxinas durante 4 semanas, pueden presentar reducción en la producción de huevos a partir del octavo día, llegando a una pérdida del orden del 35% una semana luego de la retirada de la micotoxina de la dieta⁷.

Además de la merma en la producción de huevos, la aflatoxicosis también induce a la reducción del tamaño de los huevos, así como el tamaño de las yemas, debido a los daños causados en la síntesis protéica y lipídica. A pesar de ello, la deposición de calcio en la cáscara de los huevos en sí misma no se ve

afectada. La resistencia de la cáscara aumenta cuando las aves consumen aflatoxinas ya que la reducción en la cáscara de esos huevos no tiene la misma proporción que la reducción que ocurre en la clara y en la yema. Este aumento del espesor de la cáscara puede afectar la eclosionabilidad debido a la baja de los intercambios gaseosos entre el embrión y el ambiente².

Se ha demostrado la toxicidad de las aflatoxinas para varias especies animales, el efecto depende del tipo de la misma, de la especie del animal, edad, peso y alimentación. Los animales más jóvenes son más susceptibles a las aflatoxinas que los adultos, y la resistencia varía según la especie, entre los animales de corral los más susceptibles son los patos, seguido de pavos, gansos y pollos.

El objetivo principal de este trabajo fue identificar y conocer los niveles de aflatoxinas en insumos de alimentos balanceados para aves que se comercializan en la ciudad de Huacho, y evaluar los riesgos de exposición de los animales que son alimentados con estos insumos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras: En este estudio, se tomaron muestras representativas de los insumos utilizados en la elaboración de alimentos balanceados, por un proceso de selección aleatoria de los diversos comercios en la localidad. El análisis fue realizado en los insumos: torta de soya, harina de pescado, pasta de algodón y maíz molido.

Obtención de muestras: Se recolectaron las muestras de los puestos que comercializan estos productos, se colocaron en bolsas de polietileno de primer uso, en cantidad de 1 kg codificando las muestras y transportando al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Facultad de Bromatología y Nutrición para los análisis correspondientes.

Métodos

Recuento de hongos y levaduras en placas Petrifilm: Se utilizó medios deshidratados especiales para hongos y levaduras en placas

Petrifilm. Al agregar en la superficie de las placas las muestras a analizar; se hidratan y crean un ambiente adecuado para el desarrollo de los hongos a temperatura de 20 a 25 °C por 3 a 5 días.

Identificación del género y especie de hongos: Las colonias de los hongos que desarrollaron se aislaron en tubos que contenían medio de cultivo para su observación microscópica y se realizó la diferenciación morfológica de aspecto, color y forma de colonias.

Cultivo de Cámara Húmeda: Para el estudio en base a la estructura reproductiva, forma de espora y tipo de hifas, se realizó el cultivo en cámara húmeda, el cual consistió en colocar sobre una placa Petri un papel de filtro humedecido, y un portaobjeto y sobre éste una lámina de agar Sabouraud de 1 cm², en la cual se sembró el microorganismo y luego se cubrió con una lámina cubreobjeto, se cerró la placa e incubó a 25 °C. Las observaciones microscópicas se realizaron a las 24, 48 y 72 horas.

Determinación de Aflatoxinas (Prueba ELISA Veratox)

Preparación de Muestras y Extracción

1. Las muestras fueron molidas y mezcladas completamente antes del procedimiento de extracción, luego almacenadas a una temperatura de 2 a 8°C hasta ser analizadas.
2. Se molió toda la muestra a un tamaño para que por lo menos 75% del material molido pase por un tamiz N° 20.
3. Se mezcló 25 g de la muestra molida con 125 ml de una solución metanol - agua al 70% en una mezcladora de alta velocidad durante 2 minutos.
4. Se filtró a través de papel Whatman N° 1 vertiendo al menos 5 – 15 ml de la solución y recogió el filtrado como muestra.

Cuantificación de Aflatoxinas: Se aplicó la prueba de ELISA-VERATOX con las cuales se obtuvo las cantidades en ppb de aflatoxinas, mediante el uso de un lector de micropozos empleando un filtro de 650 nm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los Hongos aislados de las muestras de maíz molido, harina de pescado, pasta de algodón, torta de soya y muñuelo fueron del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Monilia*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Rhizopus* y *Mucor*. Los cuales se identificaron evaluando el aspecto morfológico, color y forma de las colonias; así como también el estudio de la estructura reproductiva, forma de espora y tipos de hifas.

En la tabla 1 se observa que la muestra más contaminada por hongos fue el maíz molido $17,5 \times 10^3$ UFC/g y la torta de soya $16,5 \times 10^3$ UFC/g, esto principalmente por que contienen mayor porcentaje de nutrientes y las condiciones ambientales que favorecen su crecimiento. Según Gimeno A¹. (1998) califica a estos productos según la calidad micológica como bueno para el maíz molido (0 - 40 000 UFC/g) y en cuanto a la torta de soya se le considera como regular (10 000 a 20 000 UFC/g); y en harina de pescado, los valores hallados indican también una calidad micológica regular (20 00 a 5 000 UFC/g).

Tabla 1. Recuento de Hongos en Insumos de Alimentos Balanceado para Aves (UFC/g)

Muestra	1er Muestreo	2do Muestreo	Promedio
Maíz molido	18×10^3	15×10^3	$16,5 \times 10^3$
Muñuelo	5×10^3	4×10^3	$4,5 \times 10^3$
Harina de pescado	3×10^3	5×10^3	$4,0 \times 10^3$
Pasta de algodón	4×10^3	2×10^3	$3,0 \times 10^3$
Torta de soya	15×10^3	20×10^3	$17,5 \times 10^3$

En la tabla 2 se reportan las concentraciones de aflatoxinas halladas en las diversas muestras analizadas, notándose que existe mayor concentración en muñuelo 3,4 ppb y 3,3 ppb en maíz molido y, en menor concentración la harina de pescado (0,6 ppb), pasta de algodón (1,5 ppb) y torta de soya (1,8 ppb) se puede observar que no hay relación entre la concentración de aflatoxinas y el recuento de hongos encontrados en las muestras correspondientes (4,5; 16,5; 4,0; 3,0; $17,5 \times 10^3$ UFC/g, respectivamente), esto demuestra que la presencia de hongos en el alimento no implica automáticamente la presencia de micotoxinas, pues estas pueden permanecer en un producto en el que no observemos crecimiento fúngico, y más aún una determinada especie de hongo puede producir más de un tipo de micotoxina, con propiedades de difundirse a través de los alimentos, ya que son muy hidrosolubles.

Las concentraciones de aflatoxinas halladas en las muestras no significan ningún riesgo toxicológico para las aves que puedan consumir estos alimentos, ya que se encuentran muy por debajo de los límites máximos tolerables que son de 10 a 20 ppb y, como se dan en países que como Estados Unidos de Norteamérica permite para granos de consumo animal según la especie y etapa productiva, para bovinos de carne 300 ppb, bovinos de leche 20 ppb, cerdos 200 ppb, sementales 100 ppb. Suiza por ejemplo prohíbe el uso de maní y subproductos en la alimentación de bovinos de leche. Para granos de consumo humano la FAO/OMS permite 30 ppb, Canadá 20 ppb, Estados Unidos de Norteamérica 10 ppb, Francia 5 ppb, Suiza 2 ppb y Australia 5 ppb.

Tabla 2. Rango de Aflatoxinas en Insumos de Alimentos Balanceados para Aves (ppb)

Control (ppb)	Absorbancia	Aflatoxinas (ppb)
0	1,377	0,0
5	1,079	4,9
15	0,775	15,2
50	0,417	49,6
M ₁	1,284	0,6
M ₂	1,233	1,5
M ₃	1,24	1,8
M ₄	1,177	3,4
M ₅	1,149	3,3

Lectura 650 nm
 Coeficiente de correlación 0,9997
 Pendiente 2,0735

Muestras

M₁: Harina de pescado

M₂: Pasta de Algodón

M₃: Torta de soya

M₄: Muñuelo

M₅: Maíz molido

Tabla 3. Promedio de Recuento Total de Hongos y Concentración de Aflatoxinas

Muestras	Recuento Total de Hongos (UFC/g)	Concentración aflatoxina (ppb)
Harina de pescado	$4,0 \times 10^3$	0,6
Pasta de algodón	$3,0 \times 10^3$	1,5
Torta de soya	$17,5 \times 10^3$	1,8
Muñuelo	$4,5 \times 10^3$	3,4
Maíz Molido	$16,5 \times 10^3$	3,3

Así mismo existen reportes de micotoxicosis en aves con las concentraciones mucho mayores a los encontrados en las muestras, como por ejemplo, en la India se produjo un brote de micotoxicosis que afectó a 9 700 gallinas ponedoras y ocasionó una mortalidad del 10% y una reducción de la producción de huevos del 20%, debido a la contaminación de los piensos por fumonisinas. Los análisis indicaron niveles de fumonisinas superiores a 8,5 mg/kg y de aflatoxina B₁ superiores a 0,1 mg/kg.

CONCLUSIONES

El recuento total de hongos en las muestras analizadas fueron mayores en torta de soya y maíz molido, obteniendo valores promedios de 17,5 y 16,5 x 10³UFC/g y menores concentraciones en pasta de algodón y harina de pescado con una media de 3,0 y 4,0 x10³ UFC/g,

En cuanto a la calidad micológica se consideran como bueno al maíz molido y pasta de algodón y como regulares a la torta de soya y harina de pescado.

Las concentraciones de aflatoxinas halladas en las muestras analizadas fueron mayores en muñuelo y maíz molido 3,4 y 3,3 ppb respectivamente; las cuales están por debajo de los límites máximos permisibles, indicando una contaminación inferior y por consiguiente sin significación o riesgo toxicológico para los animales que consumen dichos alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gimeno A. Revisión Genérica del problema de los Hongos y de las Micotoxinas en la Alimentación Animal. Consultortécnico de Special Nutrients, INC, Miami, Florida. 1998.
2. Mallmann C, Dilkin P, Zanini G, Rauber, H, Micotoxinas en Ingredientes para Alimento Balanceado de Aves: XX Congreso Latinoamericano de Avicultura Brasil 2007 Porto Alegre del 25 al 28 de septiembre. Universidad Federal Santa María de Brasil.
3. Gelderblom W, Saskiewicz K, Marasas W, Thiel P, Horak R, Vleggaar R. and Kriek N, Fumonosins -novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusariummoniliforme*. *Applied and Environmental Microbiology* 1988; 54:1806-1811
4. IARC. Environmental carcinogens selected methods of analysis. In: H. Egan, L. Stoloff, and I.K. O'Neill (eds.). IARC Publications 44. Lyon, France.1982
5. Wang J, and Groopman J, DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research* 1999; 424:167-181
6. Selim MI, Pependorf W, Ibrahim M, El-Sharkawy S. y El-Kashory E, Aflatoxin B₁ in common Egyptian foods. *J.AOAC, Int.* 1996; 79: 1124-1129.
7. Rosa A P. et al. Desempenho produtivo de matrizes de cortes submetidas a intoxicação por aflatoxinas e deoxinivalenol (DON). *Revista Brasileira de Ciência Avícola.* 2001; Sup. 3, p. 73.