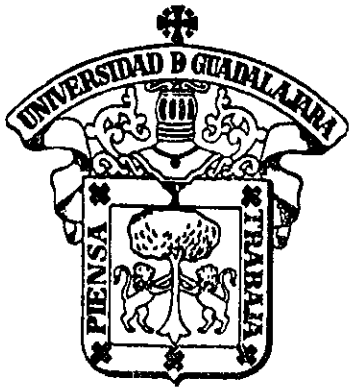
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

COORDINACION GENERAL DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
DEL AREA DE CIENCIAS BIOLOGICAS,
AGROPECUARIAS Y ECOLOGICAS.



DETERMINACION DEL GRADO DE CONTAMINACION DE AFLATOXINAS B1, B2, G1 Y G2 ASI COMO LA IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE HONGOS MICOTOXIGENICOS EN ALIMENTO PARA BOVINO.

TRABAJO QUE CON CARACTER DE :

T E S I S

P R E S E N T A :

RENE SANTIBAÑEZ ESCOBAR

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS DE LA NUTRICION ANIMAL
GUADALAJARA, JALISCO. MAYO 1994.

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

COORDINACION GENERAL DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
DEL AREA DE CIENCIAS BIOLOGICAS, AGROPECUARIAS Y ECOLOGICAS.

DETERMINACION DEL GRADO DE CONTAMINACION DE AFLATOXINAS B1, B2, G1 Y G2 ASI COMO LA IDENTIFICACION Y CUANTIFICACION DE HONGOS MICOTOXIGENICOS EN ALIMENTO PARA BOVINO.

TRABAJO QUE CON CARACTER DE TESIS PRESENTA

RENE SANTIBAÑEZ ESCOBAR

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
DE LA NUTRICION ANIMAL

GUADALAJARA, JALISCO. MAYO 1994

AGRADECIMIENTOS

AL DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. MARGARITA HERNANDEZ GALLARDO

POR SU INVALUABLE AYUDA.

AL ASESOR DE TESIS:

DR. AGUSTIN RAMIREZ ALVAREZ

POR SU GRAN APOYO.

AL C.D. HECTOR ARMANDO MACIAS MARTINEZ

POR SU INCONDICIONAL APOYO.

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

DEDICO ESTE TRABAJO:

A LETY, MI ESPOSA

Y A MIS HIJAS:

MIRIAM, REBECA, PAULINA, Y

A MI HIJO QUE ESTA POR VENIR

I N D I C E .

RESUMEN.....01

INTRODUCCION.....03

PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA.....10

JUSTIFICACION.....11

HIPOTESIS.....14

OBJETIVOS.....15

MATERIAL Y METODOS.....16

RESULTADOS.....26

DISCUSIONES.....31

CONCLUSIONES.....37

BIBLIOGRAFIA.....38

R E S U M E N .

Con el objeto de determinar el grado de contaminación por aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, así como la identificación y cuantificación de cepas fúngicas productoras de dichas aflatoxinas en el alimento para bovinos de la región de Cuidad Guzmán, Jalisco se realizó el presente estudio en el laboratorio de toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara. Se muestrearon un total de treinta explotaciones, obteniendo alimento tanto para vacas lecheras como para ganado de engorda en sus diferentes etapas. Una vez realizado el muestreo, se remitieron al laboratorio para iniciar el proceso de identificación y cuantificación en un plazo no mayor de 48 hrs. para evitar alteraciones de la muestra y obtener así resultados confiables. Para hacer la determinación del tipo de aflatoxinas se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina, en tanto que la cuantificación e identificación de hongos fué por la técnica de vaciado en placa. Los resultados obtenidos fueron los siguientes; del total de las muestras procesadas se obtuvieron recuentos de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) en la siguiente proporción: Recuentos altos (10^6-10^7 U.F.C./g) 56.66%; Recuentos moderados (10^4-10^5 U.F.C./g) 36.66%; Recuentos bajos (10^2-10^3 U.F.C./g) 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 altas concentraciones, además se obtuvo un 46.66% de muestras con fluorescencia positiva que no correspondieron a los estándares de aflatoxinas y 20% de muestras negativas.

I N T R O D U C I O N.

Una de las necesidades fundamentales del hombre a través de su desarrollo evolutivo ha sido el alimento. En los países en vías de desarrollo al rededor del 85% de la alimentación depende de los productos agricolas. En términos generales se considera que la dieta del hombre a nivel mundial, está constituída en un 70% por productos vegetales, principalmente granos, y un 30% de productos de orígen animal (10,22).

Estos granos y sus derivados son invadidos por microorganismos que producen compuestos tóxicos no deseables, reduciendo así la productividad y a la vez su calidad nutricional. Dentro de éstas sustancias tóxicas se encuentran las micotoxinas que han sido objeto de amplias investigaciones en los últimos diez años, especialmente en relación con sus efectos. Una micotoxina se define como un metabolito tóxico secundario producido por un moho. Numerosas micotoxicosis afectan a los animales domésticos, entre las más importantes destaca la aflatoxicosis. En el cuadro No. 1 se presentan algunas micotoxicosis importantes en Medicina Veterinaria (4,7,33,39).

Las aflatoxicosis animales son conocidas en México desde 1932, Ernesto Dantes De La Vega quien describe algunos casos de intoxicación en equinos por el consumo de alimentos contaminados con Aspergillus glaucus; sin embargo no fúe sino hasta 1960 cuando se consideró a las aflatoxinas producidas por hongos del género Aspergillus como causa de procesos de into-

CUADRO No. 1
ALGUNAS MICOTOXICOSIS IMPORTANTES EN MEDICINA VETERINARIA.

TOXINAS	HONGOS	ESP. AFECTADAS	ENF. PRODUCIDA
AFLATOXINAS	Aspergillus flavus	PATOS, PERROS, PAVOS, VACUNO, SUINO	AFLATOXICOSIS, HEPATOTOXICOSIS CARCINOGENESIS, HEMORRAGIAS,
BUTENOLIDA	Fusarium triciuctum	VACUNO	GANGRENA DE LAS EXTREMIDADES.
CITRININA	Penicillum viridicatum	CERDOS, CABALLO, OVEJAS.	NECROSIS DE TUBULOS RENALES, EDEMA PERIRRENA LESIONES HEPATICAS.
DIACETOXISCIRPENOL	Fusarium tricinctum	VACUNO	DIARREA, REDUCCION LECHERA, PERDIDA DE PESO DERMONECROSIS, GANGRENA.
ALCALOIDES DEL CORNEZUELO	Claviceps purpurea	CERDOS, VACUNOS Y AVES	GANGRENA SECA DE LAS EXTREMIDADES, HIPOGALACTIA EN CERDA ATAXIA Y TEMBLORES.
CORNEZUELO, ACIDO LISERGICO	Claviceps paspali	VACUNO, OVEJAS Y CABALLOS	TAMBALEO, ATAXIA TEMBLORES, NERVIOSISMO, CONVULSIONES.
IPOMEARONA	Fusarium solani	VACUNO	HIPERPLASIA
OCHRATOXINA A	Aspergillus ochraceus Penicillum viridicatum	CERDOS, RATAS, RATONES Y COBAYOS	NECROSIS DE TUBULOS RENALES Y HEPATOSIS.
ACIDO OXALICO	Aspergillus niger	CERDOS	NEFRITIS, TIEMPO DE COAGULACION PROLONGADO
RUBRATOXINA	Penicillum rubrum	VACUNO, CERDOS	HEPATOTOXICIDAD HEMORRAGIA GENERAL.

CUADRO No. 1 (Continuación)

TOXINAS	HONGOS	ESP. AFECTADAS	ENF. PRODUCIDA
ESLAFRAMINA	Rhizoctonia leguminicola	VACUNO, OVEJAS	SALIVACION EXCESIVA,LAGRIMEO Y DIARREA.
TRICHOTHECENE TOXINA T-2	Fusarium tricinctum	VACUNOS, CERDOS Y AVES	GASTROENTERITIS HEMORRAGIAS_DIFUNDIDAS,DEPRECION HEMOPOYETICA.
ESPORODESMINA	Pyhtomyces chartarum	OVEJAS Y VACUNO	ECZEMA FACIAL, COLANGIOHEPATITIS Y FOTOSENSIBILIDAD.
TOXINA INDUCTORA DE TEMBLORES	Penicillum cyclopium y P. palitans	OVEJAS, CERDOS Y VACUNOS	TEMBLORES, CONVULSIONES,ATAXI POSIBLE ESTIMULACION DE MUSCULO LISO.
TOXINA DE STACHYBOTRIS	Stachybotris atra	CABALLOS	DEPRESION HEMATOPOYETICA, ESTOMATITIS,DERMATITIS Y MUERTE.
ZEARALENONA (F2)	Fusarium graminearum	CERDOS	VULVOVAGINITIS, CELO PROLONGADO CELO ESPONTANEO TUMEFACCION VULVAR Y ABORTO

(4).

xicación conocidos en Inglaterra como "enfermedad X de los pavos".

Durante algunos años el nombre de Aspergillus flavus se ha-usado para inculpar la producción de aflatoxinas, pero en realidad es un grupo de especies de hóngos los que pueden producir éstos metabolitos. En el cuadro No. 2 se presentan algunas de éstas especies de hóngos productores de aflatoxinas (5,19,20,31,41)

A éstas aflatoxinas se les caracterizó en cuatro compuestos químicos 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 ó adicionar un radical alcohol, hidroxilo, oxidrilo o una doble ligadura lo que da diferentes propiedades a cada uno de los compuestos. La aflatoxina M1 es un metabolito de la B1 que se produce en el hígado de un animal ó persona que ha consumido alimento contaminado. M1 es muy importante porque se acumula en leche y huevo aproximadamente 24 hrs. después de que el alimeto contaminado ha sido consumido (8, 22, 25, 26, 27, 29, 30, 35).

En la figura No. 1 se presenta la estuctura química de las diferentes aflatoxinas. Las aflatoxinas pueden formarse, en productos alimenticios antes y después de la cosecha. Se han

CUADRO No. 2

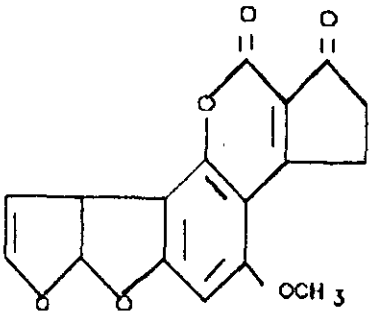
HONGOS PRODUCTORES DE AFLATOXINAS.

HONGO	AFLATOXINA				INVESTIGADOR
	B1	B2	G1	G2	
Aspergillus flavus	X	X	X	X	Sargeant 1961
A. flavus					
var. columnaris		X			Van Walbek 1968
A. oryzae	X	X			Basappa 1967
A. parasiticus					
var. globosus	X	X	X	X	Murakami 1966
A. parasiticus	X	X	X	X	Codner et. al 1963
A. niger	X				Kulik y Holaday 1967
A. wentii	X				mismo autor
A. ruber	X	X			mismo autor
A. ostianus	X				Scott 1967
A. ochraceus	X				Van Walbeek 1968
Penicillum puberanum	X	X	X	X	Hodges et. al. 1964
P. variable	X				Kulik y Holaday 1967
P. frequentaus	X				mismo autor
P. citrinum	X				mismo autor
Rhizopus sp.	X	X			Van Balbeek 1968.

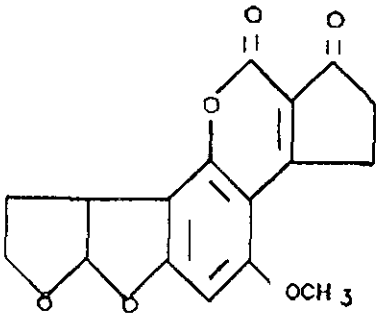
FIGURA No. 1

ESTRUCTURA QUIMICA DE DIFERENTES AFLATOXINAS

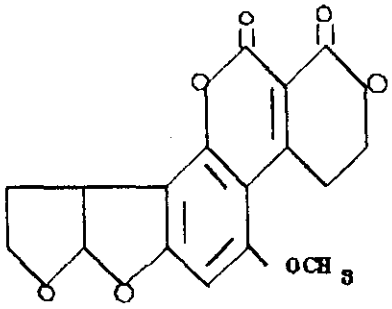
AFLATOXINA B1



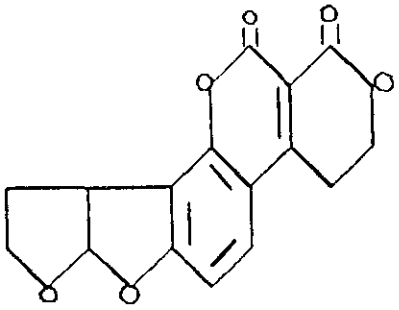
AFLATOXINA B2



AFLATOXINA G1



AFLATOXINA G2



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. La humedad del sustrato es el principal factor que regula el crecimiento fungal y la ulterior formación de aflatoxinas. Otro factor de suma importancia dentro de la producción de aflatoxinas es la temperatura, de las cuales se determina una mínima de 12°C, una máxima de 40 a 42°C y una óptima de 27 a 30°C, aunque algunos Fusaruim pueden ser activos a temperaturas de ó proximas a la congelación, influyendo así mismo el tipo de almacenamiento y el tipo de alimento (4, 9, 30, 31, 34, 41).

Una vez que se establecen los factores ambientales adecuados para la formación de hóngos, éstos producirán sustancias tóxicas en el alimento, alterando sus propiedades nutricionales con las consecuentes pérdidas económicas.

Cuando los animales consumen las aflatoxinas éstas siguen una ruta de distribución en el organismo de los animales.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Cuando el alimento destinado para bovinos se encuentra contaminado con hóngos y aflatoxinas constituye un importante problema, debido a los efectos tóxicos de éstos compuestos en el organismo del animal.

Además ocasionan un serio problema de salud pública al encontrarse sus metabolitos en leche y tejidos.

La necesidad de contar con alimento libre de contaminación por hóngos o sus metabolitos en la alimentación del hombre y los animales, es cada día mayor, por lo que es menester lograr un control adecuado y establecer un sistema de vigilancia para detectar niveles de contaminación.

J U S T I F I C A C I O N .

Cuando las aflatoxinas son consumidas por los animales el compuesto ó sus metabolitos, se difunden por todos los tejidos indicando rápida absorción. Aparecen en la orina, heces fecales y pricipalmenete en la leche, constituyendo así el contaminante de los alimentos que son destinados para el consumo humano, que tiene gran importancia por presentar un serio problema de Salud Pública (20,21,29,34,41).

Los efectos de las aflatoxinas son variados en los animales, ésto depende de factores como: edad, sexo, especie, raza, tiempo y grado de exposición y el tipo de alimento. Los efectos pueden ser del tipo de inducción de tumores para ciertas especies de animales, mutagenicos y teratogenicos. Ademas reducción en la absorción de nutrientes, trastornos en la reproducción, disminuye el consumo de alimento, se deprime el sistema inmunocompetente de los animales y como resultado una alta mortalidad (5,8,21,22,29,33,34,41).

En el ganado productor de leche al ingerir dosis diarias de 2,300 a 4,200 ppb de aflatoxina B1, por un periodo 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 abate. En éste caso, la importancia estriba en que la aflatoxina M1 es un metabolito de la B1 y es eliminada por la leche en proporción de 300 mcg de B1 por Kilogramo de aliemto a 1 mcg de M1 por litro de leche. Sus

efectos tóxicos son similares a los de B1 aunque menos potentes y de los cuales pueden resaltar sus efectos mutagénico, hepatotóxico, inmunosupresivo y carcinogénico. En el cuadro No. 3 se muestra el potencial mutagénico de diferentes aflatoxinas.

Desafortunadamente uno de los mayores grupos consumidores de leche como son los infantes y adolesentes, son tambien los más sensibles a los efectos de M1 (1,11,25,26,27,36).

Además se ha reportado que cuando la aflatoxina B1, es ingerida por bovinos, ésta inhibe las bacterias ruminales, bajando las concentraciones de ácidos grasos volátiles, acetato/propionato y reduciendo la digestibilidad de la celulosa (3).

Dada la poca información que existe en México y la importancia sanitaria que representa éste problema, el presente trabajo tiene el fin de determinar el grado de contaminación con aflatoxinas del alimento para bovino.

CUADRO No. 3

POTECIAL MUTAGENICO DE DIFERENTES AFLATOXINAS

AFLATOXINA	ACTIVIDAD RELATIVA
B1	100 %
G1	3 %
M1	3 %
B2	0.2 %
G2	0.1 %

(26).

BIBLIOTECA CENTRAL

H I P O T E S I S .

Si se reconoce la flora micológica productora de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en alimento para bovino, entonces al aplicar la técnica de cromatografía en capa fina se podrá identificar y cuantificar el grado de contaminación del alimento.

O B J E T I V O S.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar el grado de contaminación por aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 así como la identificación y cuantificación de cepas fúngicas en alimento para bovinos.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1.- Identificar las cepas fúngicas potencialmente productoras de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 que se presentan en alimento para bovinos.

2.- Determinar la carga fúngica del alimento para bovino, mediante recuentos de unidades formadoras de colonias (U.F.C./g).

3.- Cuantificación de aflatoxinas producidas en el alimento para bovinos, por el método analítico de cromatografía en capa fina.

MATERIAL Y METODOS.

Se muestrearón en el Municipio de Cd. Guzman, Jalisco alimento para bovino, obteniendo 30 muestras de alimento elaborado y almacenado en la granja y/o alimento comercial, recolectandolas en bolsas de papel de 2 Kg aproximadamente.

El tiempo que transcurrio del muestreo al análisis para cuantificar e identifiar los hongos así como aflatoxinas no fué mayor de 48 hrs. Las muestras se transportaron al laboratorio de toxicología del Departamento de Medicina y Salud Pública de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para las siguientes determinaciones.

1.- Cuantificación e identificación de hongos, por la técnica de vaciado en placa (diagrama No. 1).

Los criterios que se utilizaron para la identificación de hongos productores de aflatoxinas, se basó en la observación macroscópica de las colonias fúngicas y la preparación de frotis humedos a partir de microcultivos con el fin de determinar la morfología microscopica tomando en cuenta :

a) Morfología.

- Identificación de hifas.
- Identificación de esporas sexuales y asexuales.
- Identificación de estructuras estromaticas.

b) Nutrición y crecimiento.

Para el aislamiento se utilizaron medios de cultivo

tales como; agar sabourad y agar papa dextrosa.

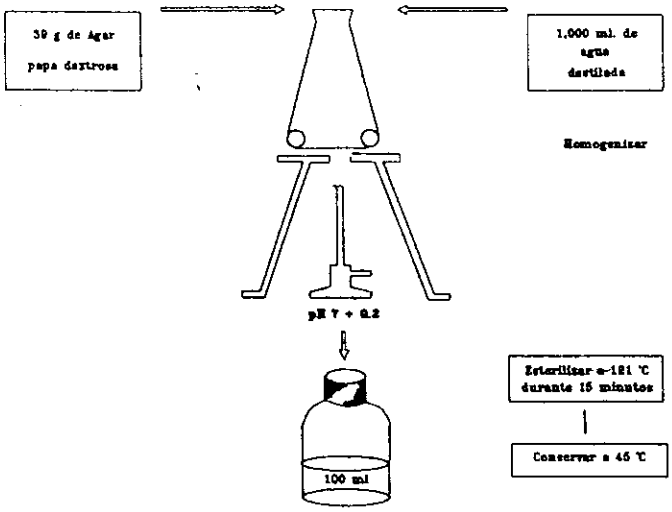
2.- Determinación cualitativa y cuantitativa de aflatoxinas B1, B2, G1 y G2, la cual se realizó por el método de cromatografía en capa fina (diagrama No. 2).

Para la identificación de las cuatro aflatoxinas se baso 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 estandar de referencia, método oficial de la Asiciación Oficial de Químicos Analíticos de los E. U. A. (A.O.A.C.).

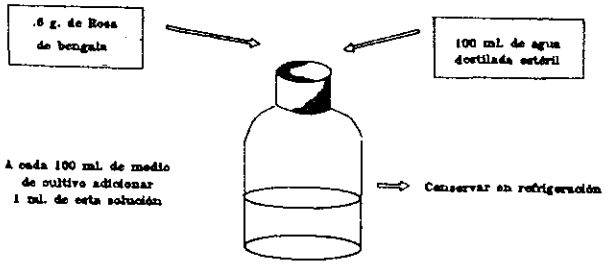
Por las características descriptivas del trabajo no se utilizó un método estadístico específico .
(2,14,15,16,23,24,25,28,32,38,42,43).

1.- CUANTIFICACION E IDENTIFICACION DE HONGOS
POR LA TECNICA DE VACIADO EN PLACA

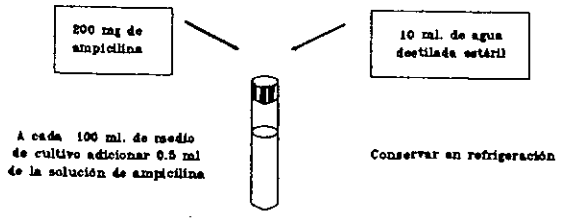
PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO



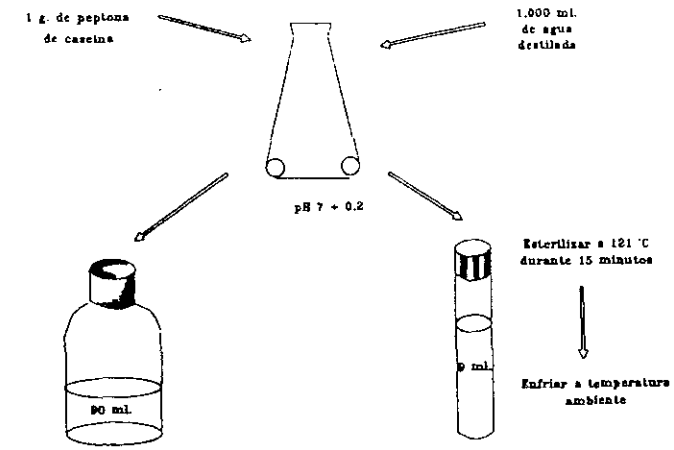
PREPARACION DE LA SOLUCION DE ROSA DE BENGALA



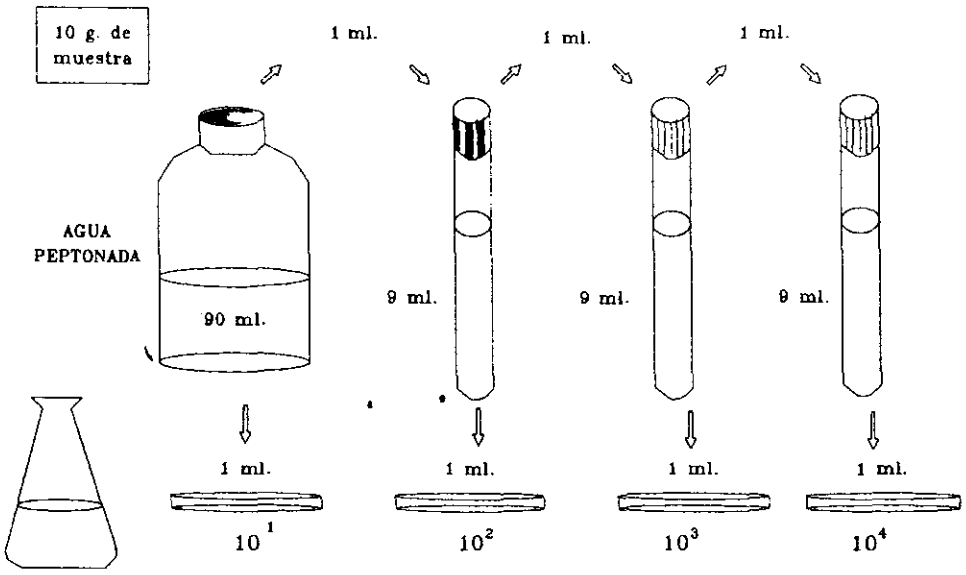
PREPARACION DE LA SOLUCION DE AMPICILINA



PREPARACION DEL DILUENTE DE PEPTONA



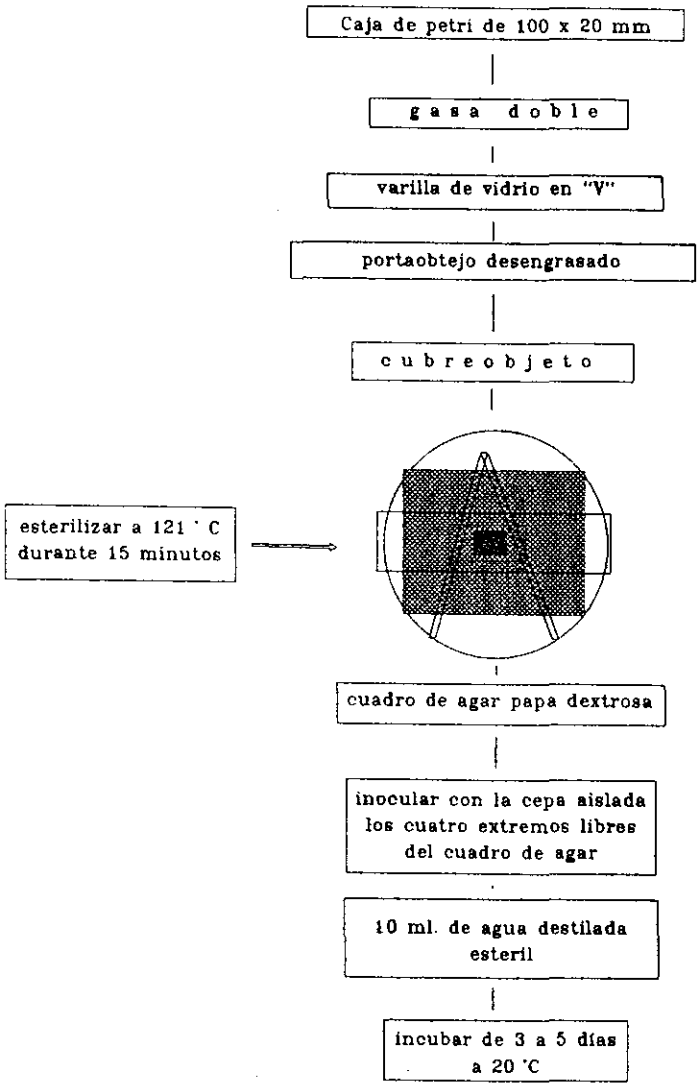
RECUENTO DE HONGOS POR LA TECNICA DE VACIADO EN PLACA



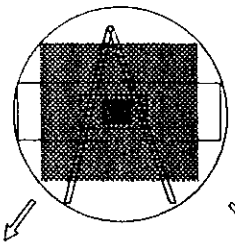
15 ml. de medio de cultivo adicionado de Rosa de Bengala y ampicilina

Incubar de 3 a 5 días a 20°C

M I C R O C U L T I V O



T I N C I O N



Desechar el agar

1.- Retirar el cubreobjeto

2.- Retirar el portaobjeto

Colocar una gota de azul de lactofenol

Colocar una gota de azul de lactofenol

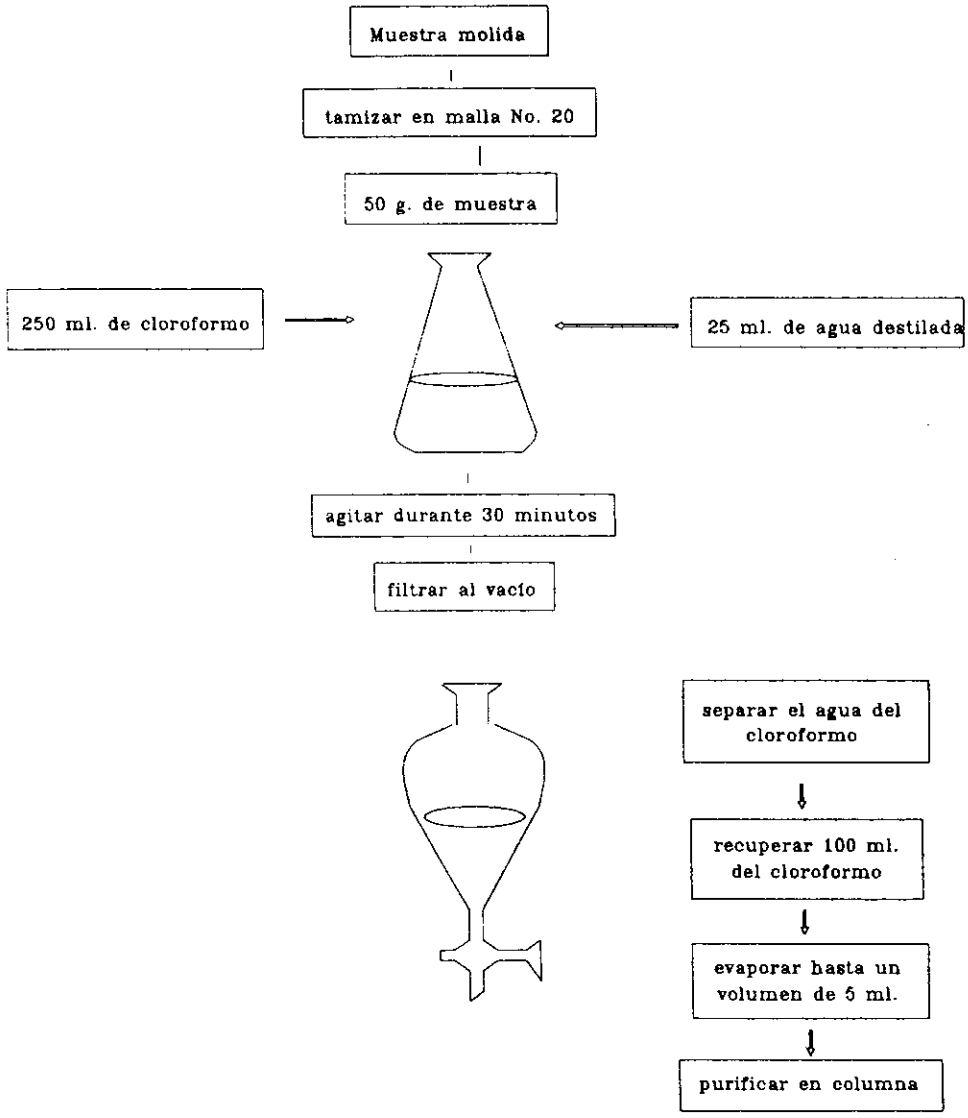
Sobreponerlo en un portaobjeto limpio

Sobre ponerle un cubreobjeto limpio

Observar al microscopio

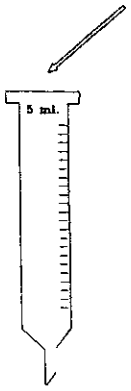
2.- DETERMINACION CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE AFLATOXINA B1, B2, G1 Y G2. POR LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

EXTRACCION



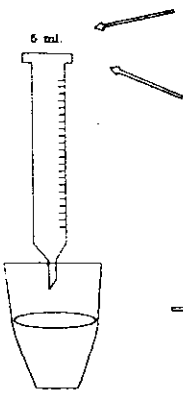
PURIFICACION EN COLUMNA POR LA TECNICA DE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Empaquetamiento de la columna



Algodón
+
0.5 g. de sulfato de sodio anhidro
+
1 g. de sílice gel 60
(70--250 mallas para cromatografía en columna)
+
1.5 g. de sulfato de sodio anhidro

Purificación

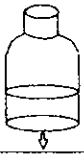


5 ml. del extracto
5 ml. de hexano
5 ml. de éter

desechar

5 ml. de mezcla de cloroformo metanol (97:3)

RECUPERAR

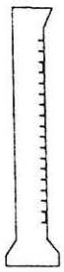


evaporar a sequedad

Recuperar en 500 mcl. de cloroformo al aplicar a la cromatoplaca

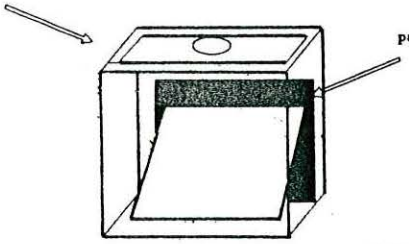
BIBLIOTECA CENTRAL

DESARROLLO DE LA CROMATOPLACA



30 ml. de acetona
+
170 ml. de cloroformo
+
3 ml. de agua destilada

sellar con grasa silicona



papel filtro 20 x 20

Dejar el tiempo necesario para que los solventes alcancen una altura de 15 cm. a partir del punto de aplicacion

⇩

Retirar la cromatoplaca y dejar secar a temperatura ambiente

⇩

Observar a la luz ultravioleta para comprobar fluorescencia de la muestra contra el estándar

⇩

Determinar Rf de la muestra contra el Rf del estándar mediante la fórmula

⇩

$$Rf = \frac{\text{frente del soluto}}{\text{frente del solvente}}$$

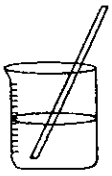
DETERMINACION

PREPARACION DE CROMATOPLACAS

30 g. de sílica gel

⇩

66 ml. de agua destilada

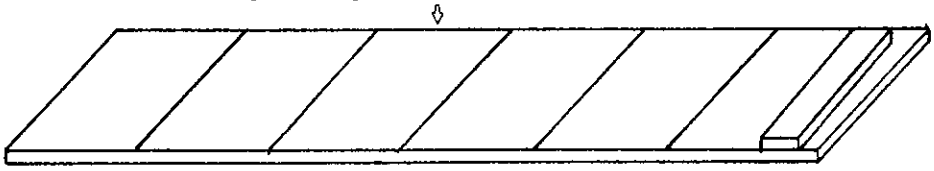


agitar

⇩

aplicacion en placas de cristal 20 x 20 x 0.3 mm.

⇩



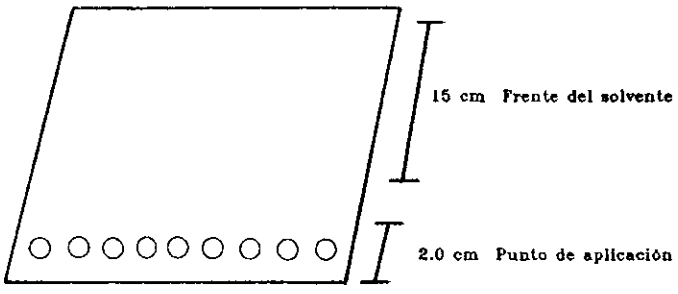
⇩

dejar a temperatura ambiente
durante 30 minutos

⇩

activar en horno a 110 °C
durante 60 minutos

APLICACION DEL EXTRACTO Y ESTANDAR A LA CROMATOPLACA



Muestra 3.5 5 6.5 6.5 mcl

Estándar 5 3.5 5 6.5 5 1

R E S U L T A D O S .

Con base en el proceso experimental, se presentan a continuación los resultados obtenidos en el siguiente orden; Primero los recuentos de unidades formadoras de colonias, obtenidos por la técnica de vaciado en placa; en segundo termino se presentarán los resultados de la identificación de hongos y finalmente se presentara la determinación cualitativa y cuantificación de aflatoxinas.

Del total de las muestras procesadas, se obtuvieron recuentos de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) en la siguiente proporción:

1.- Recuentos altos (10^6 - 10^7 U.F.C./g) 56.66%

2.- Recuentos moderados (10^4 - 10^5 U.F.C./g) 36.66%

3.- Recuentos bajos (10^2 -10^3 U.F.C./g) 6.66%

(Ver grafica No. 1).

Se aislaron un total de 148 cepas correspondiendo a los siguientes géneros: Cladosporium spp. 25.67%, Penicillium spp. 21.62%, Aspergillus spp. 16.89%, Fusarium spp. 9.45%, Absidia spp. 6.08%, Mucor spp. 4.72%, Trichoderma spp. 3.37%, Epicocum spp. 2.02%, Phoma spp. 2.02%, Paecelomices spp. 1.35% y Alternaria spp. 0.67%.

(Ver grafica No. 2).

Se detectaron 33.33% de muestras positivas a aflatoxinas de las cuales correspondieron los siguientes porcentajes a cada aflatoxina en particular:

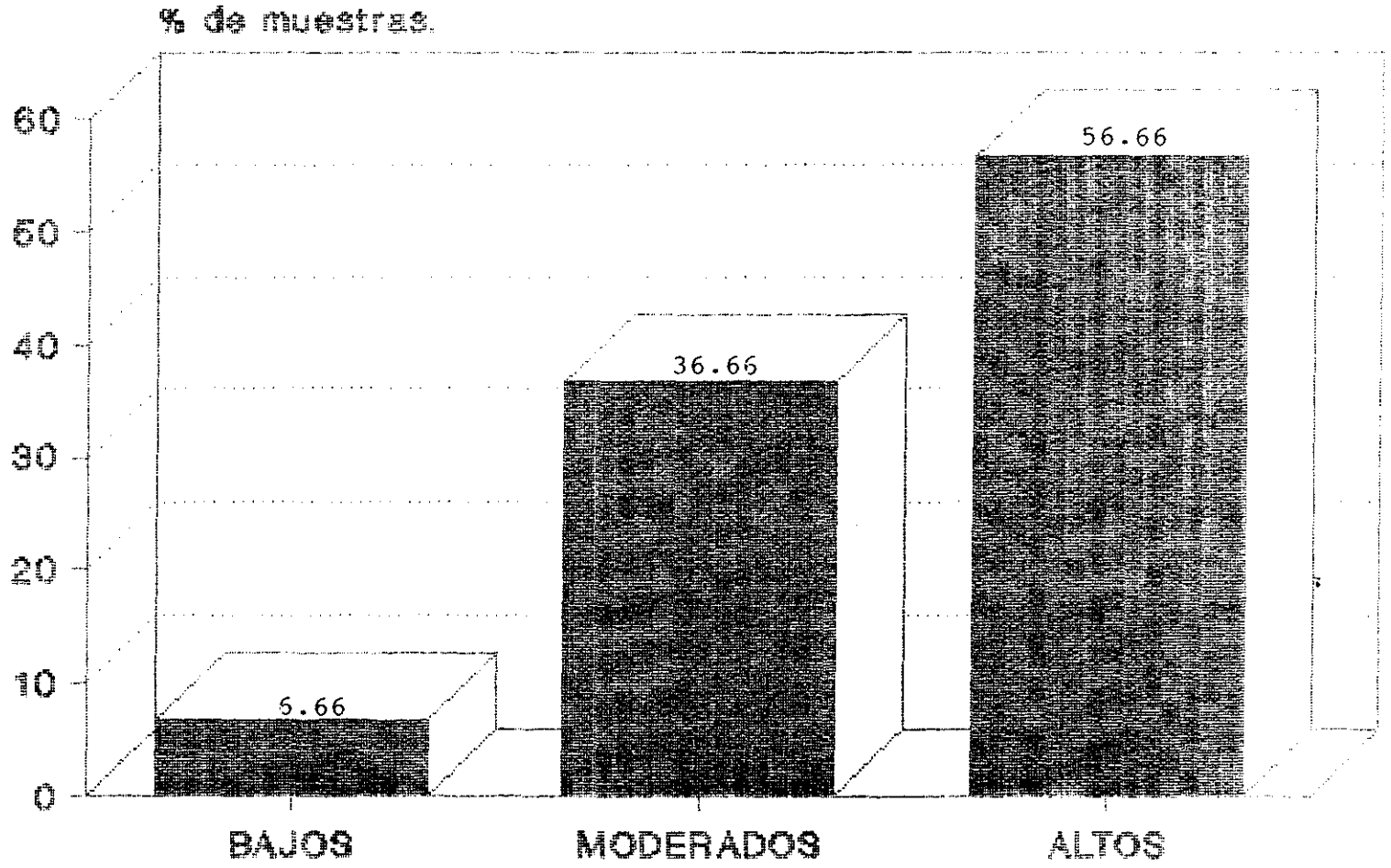
Aflatoxina	
B1	70%
B2	30%
G1	10%
G2	40%

Todas ellas con una concentración de 81 ppb (Ver grafica No. 3).

Además se obtuvo un 46.66% de muestras que dieron lecturas con fluorescencia positiva que no correspondieron a los estandares de aflatoxinas, y un 20% de muestras con lectura negativa.

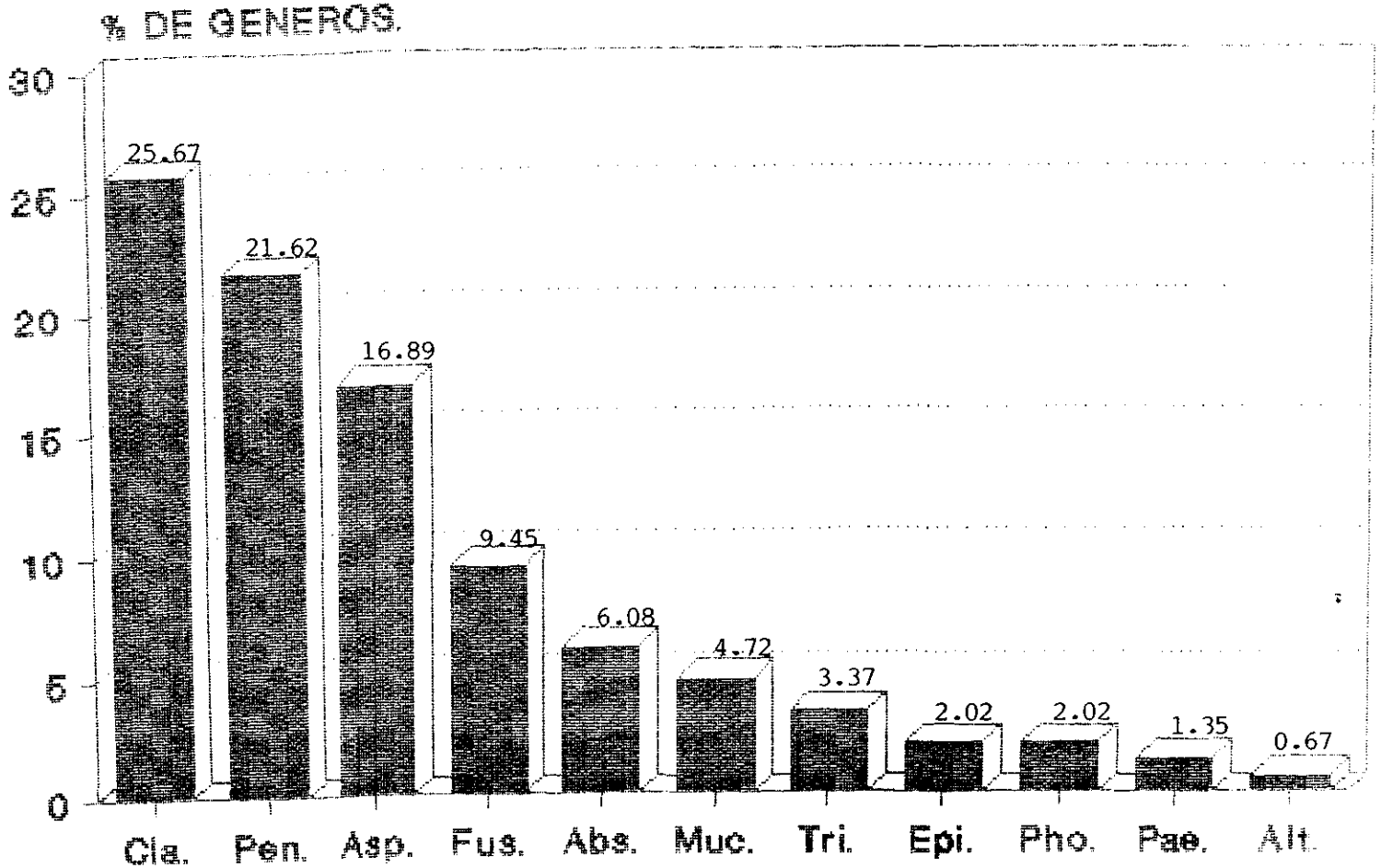
GRAFICA No. 1

RECUENTOS DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS EN ALIMENTO PARA BOVINOS



GRAFICA No. 2

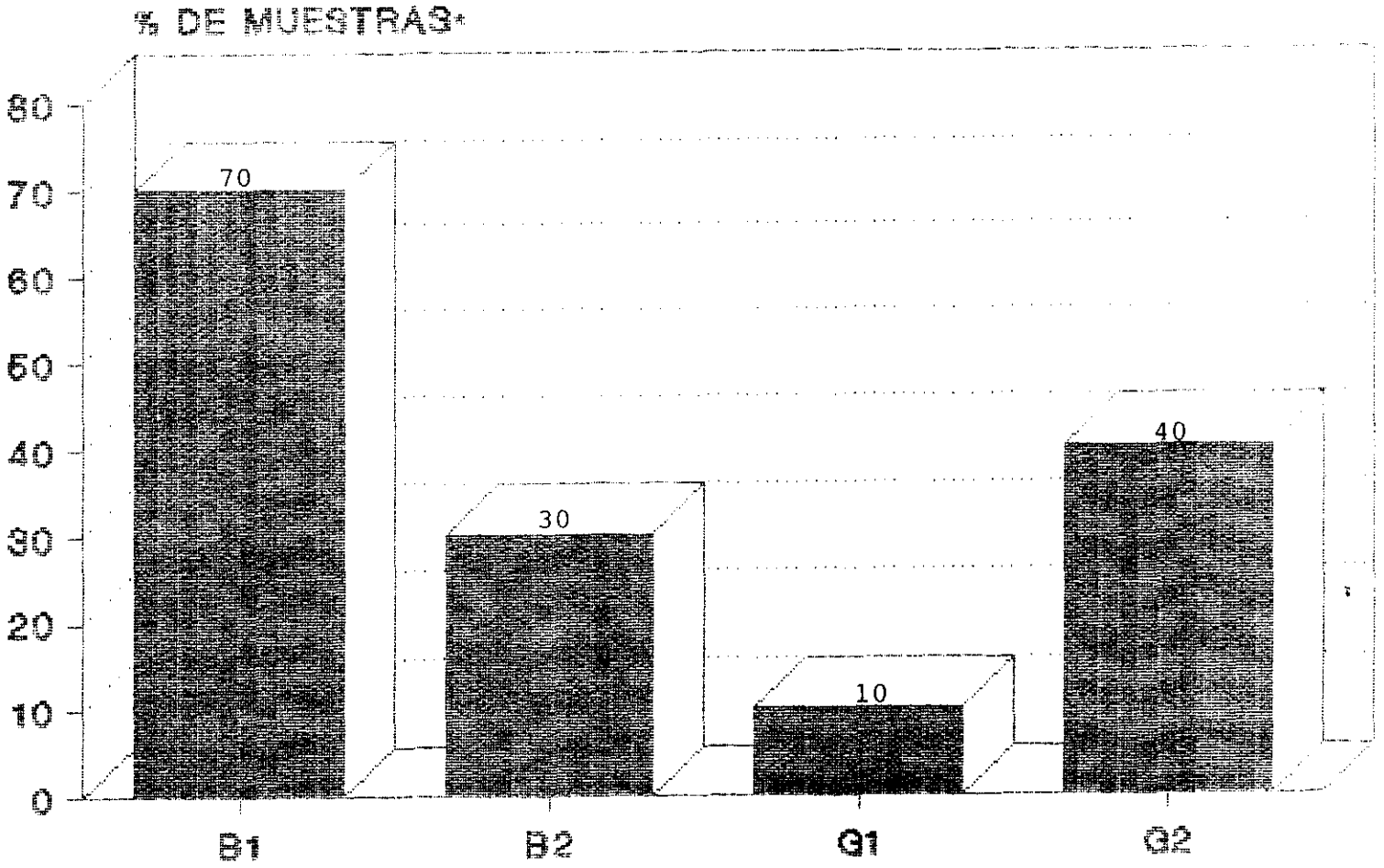
DIFERENTES GENEROS DE HONGOS AISLADOS EN ALIMENTO PARA BOVINO



Cla= Cladosporium Pen= Penicillum Asp= Aspergillus Fus= Fusarium Abs= Absidia Mvc= Mucor Tri= Trichoderma Epi= Epicocum Pho= Phoma Pae= Paecelomyces - - - Alt= Alternaria.

GRAFICA No. 3

PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN ALIMENTO PARA BOVINOS.



* DEL TOTAL DE LAS MUESTRAS POSITIVAS

BIBLIOTECA CENTRAL

D I S C U S I O N E S .

Se conoce que el crecimiento de hóngos en los alimentos, se caracteriza por un aspecto algodonoso ó aterciopelado, o a veces coloreado; generalmente el alimento enmohecido se desecha como inadecuado para su consumo.

Si bien es cierto que algunos hóngos son responsables de la alteración de ciertos alimentos, otros son útiles para la elaboración de diferentes alimentos o de sus ingredientes. El presente trabajo, enfocó su atención en aquellos hongos que producen alteraciones a los alimentos, así como a las aflatoxinas, por ser consideradas las micotoxinas de mayor importancia en la producción animal (1,13,15).

Los terminos "hongo" y "moho", se usan a menudo indistintamente. En el más estricto sentido de la palabra, el termino hongo se refiere a un gran número de seres vivos que pertenecen al reino vegetal. Como ocurre con la mayoría de las plantas, los hongos tienen una pared celular rigida y requieren de oxigeno para su crecimiento; sin embargo, carecen de clorofila y por ende son incapaces de llevar a cabo el proceso de la fotosintesis. Debido a ésta falta de clorofila, los hongos deben obtener sus nutrientes a partir de materia organica del medio ambiente (12,39,40).

Los ingredientes para la elaboración de piensos tales como el maíz, trigo, centeno, cebada, sorgo y el maní entre otros, constituyen excelentes medios de cultivo para el hongo. Estos

hongos microscopicos, son los miembros del grupo que producen problemas en la producción animal. Por ejemplo el Aspergillus fumigatus, Penicillum spp., y Fusarium spp. entre otros, producen micotoxinas en los ingredientes alimenticios (24,39,40).

Dentro de los resultados obtenidos se encontraron los siguientes generos; Cladosporium spp., Penicillum spp., Aspergillus spp., Fusarium spp., Absidia spp., Mucor spp., Trichoderma spp., Epicocum spp., Phoma spp., Paecelomices spp., y Alternaria spp. Se considera que el total de cepas encontradas son productoras de micotoxinas, es importante señalar que el total de muestras examinadas mostró diferente grado de contaminación, y que según el recuento de U.F.C. el 93.32% está entre recuentos moderados y altos, además de acuerdo al numero de cepas identificadas, cada muestra está contaminada en promedio por cinco cepas diferentes de hongos. Estos datos son de suma importancia para el analisis de los resultados obtenidos en la determinación de aflatoxinas.

Las cepas encontradas se pueden clasificar en hongos de campo y hongos de almacen; 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. Por otra parte Cristensen y Khuffmann en 1969 mencionan, que tambien los granos y las semillas son invadidos por hongos cuyo habitat natural no es el campo sino el almacen, la bodega, el silo y las trojes, siendo principalmente

especies de Aspergillus y Penicillum. La principal diferencia entre los hóngos de campo y los hóngos de almacen son los requerimientos de agua para crecer. Los hóngos de campo requieren humedades relativas de 90 a 100%, en cambio los de almacen pueden crecer en humedades relativas de 65 a 90%, condicones de humedad muy frecuentes en el almacenamiento de granos (18,24,37).

El género Cladosporium como ya se mencionó es un hóngo de campo, más sin embargo se le ha encontrado en mazorcas de maíz que se almacenan con altos contenidos de humedad. Tiene la capacidad de crecer a bajas temperaturas aun bajo 0oC, su capacidad toxígena no ha sido claramente definida. El Fusarium para su desarrollo requiere actividad de agua de mas de 0.90%. Este género, tiene una gran variedad de especies de importancia fitopatopatológica. Este es junto con Aspergillus y Penicillum, uno de los géneros más importantes en la producción de micotoxinas que afectan a los animales domésticos. Al género Absidia y Mucor, se le encuentra como habitante del suelo, y en materia orgánica en descomposición. Frecuentemente se aisla de granos, alimentos balanceados y sus ingredientes, esto concuerda con nuestros resultados al encontrarlo como contaminante del alimento para bovinos (24,37,40).

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 principales responsables de acelerar su crecimiento y reproducción (3,24).

Se conoce que el cálculo del grado del crecimiento de hongos en alimentos y granos es una tarea muy difícil, ya que no puede ser medido adecuadamente mediante la determinación directa de ciertos cambios ocurridos en el alimento como resultado de dicho crecimiento. No hay pautas establecidas que indiquen cuál es un recuento normal ó anormal. Algunas granos e ingredientes del alimento tendrán casi siempre altos recuentos comparados con otros, sin embargo, las siguientes son normas aproximadas para la mayoría de los alimentos terminados; 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 del alimento para bovino (2,17).

Pont et. al. en 1985 estima el grado de contaminación de materias primas y alimentos balanceados mediante la cuantificación de esporas;

ALIMENTO	GRADO DE CONTAMINACION U.F.C.		
	NORMAL	ALTA	MUY ALTA
HARINAS DE ORIGEN ANIMAL:			
PESCADO,CARNE,SUBPRODUCTOS	<10,000	<30,000	>30,000
DE CEREALES:			
MAIZ,CEBADA,SORGO,TRIGO,AVENA			
SUBPRODCTOS DE MOLINERIA.	<50,000	<150,000	>150,000
PASTAS DE OLEAGINOSAS:			
SOYA,GIRASOL,CACAHUATE,ALGODON	<20,000	<70,000	>70,000
ALFALFA	<10,000	<25,000	>25,000

SUBPROD. INDUSTRIALES Y AGRICOLAS:			
PULPAS, ORUJOS	<30,000	<70,000	>70,000
ALIMENTOS BALANCEADOS:			
EN HARINA	<20,000	<75,000	>75,000
GRANULADOS	<20,000	<75.000	>75,000

(3).

Aún cuando el 33.33% de las muestras se encontraron positivas a aflatoxinas hay que señalr que es un porcentaje elevado y mas importante aún es, que el 70% de las muestras positivas correspondieron a aflatoxina B1, que es considerada la más importante por su toxicidad tanto en animales como en humanos. La aflatoxina B1 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 mutagenicos, hepatotoxicos, inmunosupresivos y carcinigenicos en quien la consume, por lo que es recomendable establecer un sistema de control y vigilancia estableciendo un limite maximo de concentración de ésta aflatoxina en productos lacteos destinados para consumo humano como de ha establecido en otros países (6,25,27).

De la misma forma, es recomendable establecer un sistema de control sobre los granos e ingredientes utilizados para 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. Asi mismo hay que consi-

derar 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 correspondio a los estandares de aflatoxinas y solo un 20% de las muestras fueron negativas.

C O N C L U S I O N E S .

1.- El 100% de las muestras analizadas, mostró contaminación por hongos, correspondiendo el porcentaje más elevado, a los recuentos altos de Unidaes Formadoras de Colonias.

2.- De las 148 cepas de hongos aisladas se identificó un total de 11 géneros distintos.

3.- Del total de géneros identificados el 73.63% correspondió a Cladosporium spp., Penicillum spp., Aspergillus spp., y Fusarium spp., considerados todos como productores de aflatoxinas y otros tipos diferentes de toxinas.

4.- Se determinó la contaminación en el alimento analizado con aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 correspondiendo el mayor porcentaje a la B1.

5.- Las concentraciones de las aflatoxinas encontradas, son sumamente elevadas y se consideran en su totalidad fuera de norma.

6.- Se hace necesario una reglamentación para el control y vigilancia de la contaminación por hongos y aflatoxinas tanto en el alimento para consumo humano como animal.

B I B L I O G R A F I A .

1.- Abramson R.N., Sinha., J.T. Mills., 1982. "Mycotin formation in moist whweat under controlled temperatures". Mycopathologia No. 79. pag. 88-90.

2.- Avicultura Profesional 1988. "Evaluación cuantitativa del desarrollo de hongos en el alimento y en los granos. El laboratorio avicola. Vol.6 No. 2 pag. 40-42.

3.- Avila G.E., Armando Shimada.,Gerardo Llamas., 1990. "Anabolicos y aditivos en la producción pecuaria". Sistema de educación continua en producción animal en México A.C. pag. 13-20.

4.- Buck William B., 1981. "Toxicología Veterinaria clinica y diagnostica". Ed. Acribia. Pag. 322-323.

5.- Burroughs M.J., 1986. "Aflatoxina y Aflatoxicosis grandes preocupaciones para los fabricantes de alimentos". ASA/México, departamento de ciencias e industria de los granos del estado de Kansas, No. 39, pag. 1-2.

6.- Brinton M.M., Herbert J.L., 1987. "Some views on the law and aflatoxins". Technical report, No. 13 In A Series.

7.- Castillo T.J., 1978. "Micologia General". Ed. Limusa México, pag. 38 - 39.

BIBLIOTECA CENTRAL

8.- Campos N.G.E., 1978. "Aflatoxicosis en los animales domesticos". Memorias de la mesa redonda, llevada a cabo en el auditorio del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias de la S.A.R.H. México-Toluca. Porcirama año 8, Vol. VII - No. 89, pag. 29-30.

9.-Castillo A.A., Sanchez G.J.I., Rosiles M.R., 1983. "Caracterizticas fisicas y niveles de aflatoxina B1 en gallinaza y pollinaza de granjas de Texcoco Estado de México". Veterinaria México 14, pag. 150-152.

10.- Church D.C., W.G. Pond, 1978. "Fundamentos de nutrición y alimentación de los animales". Ed. Limusa.

11.- Cieglera A., Kadis S., 1971. "Microbial toxins". Vol. VI, Academic Press, New York and London.

12.- Garner R.J. 1970. "Aflatoxinas". 3er. Ed. Williamn and Wilkins Baltimore.

13.- Campos N.G. "Problemas ocasionados por hongos y sus toxínas en la reproducción de cerdos". Porcirama año 7, Vol. 7, No. 77, pag. 26.

14.- Fernandez Escartin, 1981. "Microbiología sanitaria agua y alimentos". Vol. I Universidad de Guadalajara, pag. 109-140.

15.- Fraizer W.C., Westhoff D.C., 1993. "Microbiología de los alimentos". Ed. Acribia S.A. Zaragoza España, pag.15-21.

16.- Garcia Aguirre Genoveva, 1989. "Manual de metodos para el analisis de micotoxinas en granos". Universidad Nacional Atonoma de México, pag. 13-64.

17.- Hernandez G.M., 1992. "Determinación de especies fúngicas y aflatoxinas B1,B2,G1 y G2 en alimento para pollo de engorda, en granjas de la periferia de Guadalajara". Tesis de Maestria, pag. 2-9.

18.- Jones F., 1987. "Consequenses of Moulds in Feeds". Feed International, Vol. 8. No. 3, pag. 28-29.

19.- Lieter Peter, Hans-Diafer Munch., 1981."Microbiología de los alimentos vegetales". Ed. Acribia.

20.- Linder E., 1989. "Toxicología de los alimentos". Ed. Acribia Zaragoza España, Pag. 83-85.

21.- Montemayor A., 1993. "Micotoxinas, su importancia en salud humana y producción animal". Agrocultura No. 20, pag. 20-21.

22.- Moreno M.E., 1989. "Hongos y micotoxinas en granos almacenados". Curso de actualización sobre micotoxicosis aviar, Pag 23-24.

23.- Montemayor M.D., 1994. "El muestreo y el analisis en la correcta determinación de su concentración en los granos y alimentos". Agrocultura, pg. 40-41.

24.- Moreno Martinez E., 1988. "Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados". Universidad Nacional Autonoma de México

25.- Miller B.M., 1987. "Aflatoxin-M1". Technical report, No.7 In A Series.

26.- Miller B.M., 1987. "Tipes of Afatoxins". Technical report No. 10 In A Series.

27.- Miller B.M., 1987. "Aflatoxin M1 Revisited". Technical report No. 15 In A Series.

28.- Osuna S.O., 1990. "Problemas encontrados en el diagnostico de micotoxicosis: Muestreo, Métodos analíticos y referencias cientificas". Universidad de Colombia, pag. 18-21.

29.- O.P.S., 1979. "Criterios de salud ambiental II micotoxinas, Organización Panamericana de Salud Publica cientifica". No. 453, pag. 4,11.19,20,35.

30.- Peña D. Silvia, Ma. Del C. Duran De Bazúa, 1990. "Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta". Ciencia y Desarrollo, vol. XVI, No. 94, pag. 61-64.

31.- Peraza C., 1962. "La aflatoxicosis en las aves domesticas". Avicultura Técnica, año XIII, No. 104, Pag 2-5.

32.- Pigja A.C., Roberto Cervantes O., "Manual de micología Veterinaria". U.N.A.M., pag. 1-6.

33.- Romo D.P., 1992. "Resultado de investigación sobre ingredientes, micotoxinas, equipo y enfermedades". Tecnologia avipecuaria, año 5, No. 59, pag. 41-42.

34.- Rosiles M.R., 1981. "Consideraciones generales sobre algunas micotoxinas". Memorias del primer curso de actualización en toxicología". Veterinaria México F.M.V.Z. U.N.A.M., pag. 1-4.

35.- Rosiles M.R., Lopez R., 1977. "Sindrome estrogénico de origen alimenticio en cerdos". Veterinaria México 8, pag. 123-125.

36.- Rosiles M.R., 1978. "Estudio de las aflatoxinas en ensilado de maíz". Vereinaria México 9, pag. 163-165.

37.- Sanchis V., Viñas I., Jimenez M., 1982. "Mycotoxin-Producin fungi isolated form binstored corn". Mycopathologia No. 80, pag. 89-92.

38.- Sigurd Funder, 1968. "Practical micology manual for identificación of fungi". Hifner publishing company inc.

39.- Waytt R.D., 1990. "Importancia de los hongos en la salud aviar". Avicultura profesional, Vol. 8, No. 2, pag. 48-50.

40.- Veltman U.R., 1984. "Reducción de los efectos de las micotxinas mediante la nutrición". Industria avicola, Vol. 31, No. 5, pag. 15-18.

41.- Wagstaff W.R., 1990. "Hongos y micotoxinas en alimentos para cerdos". Tecnología internacional, año 1, No. 2, pag. 16-18.

42.- Williams-Sidney, 1984. "Official Methods of analisis of the associatión of official analytical Chemist". Chapter 26.

43.- Wyatt R.D., 1988. "Comparación de las técnicas de luz ultravioleta y E.L.I.S.A. para contaminación por aflatoxinas en el maíz". Avicultura profesional, Vol. 6, No. 3 pag. 109-110.