

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**“ VALORACION DE LA CAPACIDAD PRODUCTIVA DE
FUMONISINAS POR CEPAS DE *Fusarium moniliforme* AISLADAS
EN HUEJOTITAN, MUNICIPIO DE JOCOTEPEC, JALISCO ”**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO
VETERINARIO Y ZOOTECNISTA PRESENTA:**

P.M.V.Z. JOSE DE JESUS DIAZ MORALES

DIRECTOR DE TESIS:

M.C. WALDINA PATRICIA REYES VELAZQUEZ.

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. Diciembre de 1998.

Dedicatoria

Gracias a la Universidad de Guadalajara, de quién recibí más que una carrera, una formación profesional.

Con respeto y admiración a mis maestros, por el esfuerzo que implica la dedicación constante.

A mi esposa Marcela y a mis hijos Jesús Alberto, Alejandra y Rodolfo en agradecimiento a su comprensión y como muestra de mi amor.

A mis padres que me han brindado apoyo y comprensión.

A Waldina, directora de Tesis, por su gran apoyo y profesionalismo en la realización de esta Tesis.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	x
INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
JUSTIFICACION	11
HIPOTESIS	12
OBJETIVOS	13
MATERIAL Y METODO	14
RESULTADOS	17
DISCUSION	19
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFIA	23

RESUMEN

Fusarium moniliforme es un hongo de distribución mundial y de frecuente presentación en cereales como el maíz, aunque se considera un hongo de campo puede desarrollarse bajo condiciones inadecuadas de almacenamiento. Se caracteriza por la producción de diversos metabolitos, entre los que se encuentran la fumonisinas, micotoxinas responsables de la leucoencefalomalacia equina y del edema pulmonar porcino, además existe estrecha relación con el cáncer esofágico humano en Sudáfrica y China. El grado de infección del hongo y la producción de micotoxinas en el maíz depende de la heterocigocidad del hongo, de la variedad del maíz y de las condiciones ambientales, por lo que los niveles de contaminación pueden variar dependiendo de la localización del área geográfica, por lo que el propósito del presente estudio fue evaluar la capacidad productiva de fumonisinas por las cepas aisladas en Huejotitán, mpio. de Jocotepec, Jalisco, zona considerada de alta producción agrícola. Para el desarrollo de la investigación previamente se aisló e indentificó a la especie de *F. moniliforme* a partir de maíz. Para el análisis de las cepas aisladas, se procedió a la recuperación del micelio para la inoculación en maíz estéril y posterior incubación a 25 °C en la oscuridad durante 30 días, al término del cual se cuantificó la producción de fumonisinas mediante el sistema de Cromatografía de Afinidad Inmunológica con detección Fluorométrica y se realizó confirmación mediante Cromatografía de capa fina. Los resultados reportaron capacidad productiva en el 93.8% de las cepas de *F. moniliforme* aisladas, con rango de producción de 700 a 2,280 ppm, siendo el 80% de las cepas de alta capacidad productiva de fumonisinas (> de 1000 ppm). Se concluye que el maíz cosechado en dicha zona presenta algo grado de contaminación por *F. moniliforme*, siendo las cepas aisladas potencialmente productivas de fumonisinas, lo que representa un riesgo tóxico para el consumo de maíz en humanos y animales.

INTRODUCCION.

El hongo *Fusarium moniliforme* es de presentación mundial en una gran variedad de plantas y es considerada la especie de mayor prevalencia en el maíz. La contaminación de los productos agrícolas por el hongo es ocasionada principalmente por un grupo de micotoxinas denominadas fumonisinas, estos componentes son carcinógenos hepáticos y han demostrado ser responsables de la leucoencefalomalacia equina y el edema pulmonar porcino. (37)

Las fumonisinas fueron caracterizadas en 1988 por Bezuidenhout y colaboradores como diésteres de ácido tricarbóxico y amino-alcoholes de 22 carbonos (peso molecular = 721). De las 7 fumonisinas caracterizadas químicamente (FB₁, FB₂, FB₃, FB₄, FA₁, FA₂ y FC₁), la FB₁ es considerada la más tóxica . (4)

El mecanismo de acción de las fumonisinas no es claro sin embargo, estudios recientes indican que existe interferencia con la biosíntesis de esfingolípidos al inhibir a la enzima esfingonina N-aciltransferasa causando acumulación de esfingosina y esfingonina a nivel intracelular. (24)

Las fumonisinas B₁; B₂ y el hidrolizado de FB₁ han demostrado ser los primeros inhidores específicos de presentación natural de la biosíntesis de novo de esfingolípidos. En hepatocitos de rata a consecuencia de la inhibición de la esfingonina N-aciltransferasa se disminuyó la biosíntesis de ceramida y por lo tanto, la biosíntesis de novo de esfingosina, además de la rápida acumulación de esfingonina (precursor inmediato en la vía biosintética de la dihidroceramida), ocasionando alteración en la relación esfingosina : esfingonina y depleción del complejo esfingolípido. (29)

En cultivo de neuronas cerebrales, la FB₁ inhibió la biosíntesis de novo de esfingomielina más que la de glicolípidos. El hecho de que la acumulación de la esfingonina es mayor que la de esfingosina sugiere que la vía de novo es el blanco primario de inhibición. Si bien existe la hipótesis de que la alteración en el metabolismo de esfingolípidos es el evento molecular primario en la presentación y progresión del daño celular y de la asociación con las enfermedades causadas por las fumonisinas, el mecanismo

responsable exacto, no será fácilmente revelado debido a que el papel de los esfingolípidos en la regulación celular es bastante complejo y no se comprende en su totalidad. (24,29)

A pesar que la FB₁ no es genotóxica, se considera como un agente carcinogénico completo en ratas. Los estudios revelan que las fumonisinas inhiben la proliferación de hepatocitos en el hígado de ratas, por lo que se ha hipotetizado que la hepatotoxicidad y los efectos de proliferación en los hepatocitos son determinantes críticos para la iniciación y promoción de cáncer. (15,25,39)

Efectos en animales.

La FB₁ ha demostrado ser responsable de la mayoría de las afecciones toxicológicas, entre éstas el edema pulmonar porcino, hepatotoxicidad en diversas especies, cáncer en hígado y la leucoencefalomalacia equina, síndrome que se ha caracterizado por la presencia de necrosis licuefactiva en la materia blanca del cerebro. Algunos investigadores sugieren que altas dosis de fumonisina inducen hepatotoxicidad aguda con lesiones leves en el cerebro, mientras que dosis menores causan lesiones severas en el cerebro y hepatotoxicidad leve. Se han establecido niveles de tolerancia o permisibles para fumonisinas, recomendándose no incorporar en el alimento niveles de 5, 10, 50 y 50 ppm para equinos, cerdos, aves y bovinos respectivamente. (30)

Investigaciones realizadas en México reportan principalmente estudios anatomopatológicos de los brotes que se han presentado en los estados de México y Oaxaca, encontrándose lesiones en SNC similares a los reportado previamente, el cuadro clínico observado en caballos se caracterizó por anorexia, adipsia, ceguera, parálisis glosofaríngea, incoordinación marcada, postración y muerte entre 24 a 48 hrs. Las concentraciones de fumonisinas que se encontraron en los análisis realizados en Oaxaca fueron de 1-10 µg de FB₁/g de muestra, considerándose los niveles presentes responsables de la muerte de los animales. (23,27,38)

En otros estudios, la FB₁ purificada demostró producir edema pulmonar cuando se administró por vía intravenosa 175 ppm durante 14 días, mientras que el consumo de dietas contaminadas por fumonisinas en forma natural ocasionó hepatotoxicidad (dosis < 23 ppm). En 1989-1990 se reportó

un brote de PPE en diversas regiones de Estados Unidos, encontrándose contaminación en el alimento predominantemente con *F. moniliforme*.

Se ha encontrado inmunosupresión en pollos alimentados con dietas contaminadas por *F. moniliforme*, además de existir la confirmación del efecto tóxico de la FB₁ en aves de engorda y embriones de pollo cuando los niveles fueron relativamente altos (75-644 ppm). (17,40)

La siguiente tabla muestra los niveles de fumonisinas asociados con enfermedades de animales y en productos de maíz.

Enfermedad/Producto	Niveles de Fumonisinas µg/g
ELEM	< 1 - 126
PPE	< 1 - 330
Maíz dañado	553
Mazorca	138
Tallo	54
Maíz molido	125
Maíz entero sin daño	1 - 4

Fuente : Bullerman L.I.B. 1994. 5

Fumonisinas en Alimentos.

Se han realizado en algunos países estudios que han permitido detectar niveles de fumonisinas en alimentos, tal es el caso de Estados Unidos (1988 - 1991) donde se reportaron rangos de 0 a 37.9 µg/g de FB₁, 0-12.3 µg/g de FB₂, y de 0 - 4.0 µg/g de FB₃ durante la cosecha de maíz. (18)

Los productos derivados del maíz que han sido analizados incluyen a la harina de maíz, cereal, salvados, tortillas, totopos, palomitas y pan de maíz, encontrándose una concentración de fumonisinas menor de 1.0 µg/g en el 70.8% de las muestras y en 5.7% con 2.5 µg/g. (33)

Aunque se han realizado algunos estudios del efecto del procesamiento al que se someten los granos y sus productos sobre la estabilidad de las fumonisinas, existe poca información disponible. Los estudios sobre la estabilidad de las fumonisinas son complicados debido a la escasez de métodos analíticos apropiados. Se ha determinado que los niveles de fumonisinas pueden reducirse en un 50% o más cuando se someten a calentamiento (190°C) durante 60 minutos, sin embargo, se ha encontrado que el sustrato permanece tóxico, debido probablemente a que la toxina permanece atada a la matriz del alimento y no llega a ser recuperada mediante los métodos de extracción química usuales, por lo que es importante distinguir entre la descomposición química y la asociación de la toxina a la matriz del alimento en los estudios de estabilidad y procesamientos. (2,14)

Estudios epidemiológicos en Transkei, Sudáfrica han correlacionado la alta incidencia de cáncer esofágico (CE) de humanos (50-200 casos por cada 100,000 habitantes) con niveles de fumonisinas de 10.2 µg/g en maíz sano y 140 µg/g en maíz mohoso. También existen reportes de alta incidencia de CE en regiones de China, Irán y Charleston, área sur de Carolina en Estados Unidos. (11,41)

Aunque se han conducido estudios con animales de laboratorio en los cuales se utilizó alimento contaminado con *F. moniliforme* o fumonisinas, no se han encontrado lesiones precancerosas o cancerosas en esófago, no existiendo hasta el momento un modelo animal que apoye la teoría de la relación del hongo con el CE. Además de la diversidad toxicológica por especies de las fumonisinas, como lo es la ELEM que se presenta en equinos, el PPE en cerdos, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y cáncer hepático en ratas, es importante considerar la influencia de otros factores, como las nitrosaminas u otros agentes carcinogénicos, como responsables del incremento de la incidencia del CE aunado a la potente actividad promotora de cáncer por las fumonisinas. (22)

Por otra parte, el estudio de la alimentación de monos Vervet con material cultivado con *F. moniliforme*, permitió mostrar que pueden estar involucradas otras enfermedades humanas, tales como efecto aterogénico y daño hepático. (22,34)

Presentación de *F. moniliforme* en el Maíz.

La asociación del hongo en la planta de maíz es endofítica y en el grano es externa y sistémica, siendo ésta última responsable de la reducción del vigor y crecimiento de la planta. La extensión y naturaleza de la enfermedad en el maíz depende de la vía de infección. Cuando la enfermedad en la planta de maíz es asintomática, originada en la semilla, puede causar declinación de la planta o muerte antes de que el estado reproductivo se presente. (31)

La infección de la mazorca en una planta no infectada puede darse por hifas endofíticas o mediante otras partes no vegetativas ; en estos casos los insectos y el viento son importantes como acarreadores del hongo, lo que ocurre usualmente por los orificios de los gusanos. El resultado visual de esta infección es variable, algunas veces es asintomática y otras notoriamente dañado e infectado. Como resultado de la infección *F. moniliforme* llega al grano localizándose en su base como escasas hifas, pero en los casos donde el maíz es asociado a efectos tóxicos en animales es usual encontrar una masa abundante de hifas esporuladas, las cuales colonizan la sección interna del grano incluyendo al embrión. (3,19)

El hongo frecuentemente infecta la planta a partir del germen en un período de dos semanas y ya sea, la infección no muestra síntomas o bien ocasiona la muerte de la planta. (36)

Producción de fumonisinas en el Maíz.

Las fumonisinas han sido aisladas en maíz y en alimentos derivados en Estados Unidos, Canadá, China, Egipto, Nepal, Argentina, Brasil y Perú, lo cual sugiere que la producción de fumonisinas en maíz está distribuida mundialmente.(18,32,33)

En la actualidad se desconoce el período y el patrón de acumulación de la producción de fumonisinas, una vez infectada la planta por el hongo. *F. moniliforme* y *F. proliferatum* son patógenos biotróficos, aunque esta relación no es obligatoria, ambos hongos son considerados de campo e implica que producen sus toxinas bajo condiciones de campo, sin embargo puesto que su relación con el maíz y otras plantas no es obligatoria, es posible encontrarlos en fragmentos de maíz contaminado y en restos de plantas muertas,

sirviéndoles de sustrato para la producción de sus toxinas, especialmente durante el almacenamiento. (35)

Los estudios de laboratorio han establecido que la temperatura óptima de crecimiento de las cepas de *F. moniliforme* es entre 22.5 °C y 27.5°C, con una máxima de 32 - 37°C y mínima de 2.5 - 5°C. Estudios adicionales indican que la humedad mínima para el crecimiento vegetativo es a -180 bars (potencial de agua), mientras que la germinación de conidias ocurre a -140 bars, siendo el potencial osmótico óptimo de -10 bars y no ocurre crecimiento a -150 bars. (36)

Las investigaciones realizadas respecto al crecimiento del hongo bajo condiciones de almacenamiento son limitadas y éstas no fueron diseñadas para determinar la producción de toxinas en el almacén. Se ha determinado que el maíz infectado con un contenido de humedad de 18.4 a 23%, fue óptima para el crecimiento de *F. moniliforme*, mientras que se inhibió su crecimiento a 28% de humedad. El crecimiento del hongo en almacenamiento fue complejo debido a que existió interacción de la humedad con los niveles de O₂ y CO₂. En dicho estudio se observó crecimiento en condiciones de almacenamiento de 0% de O₂ y 60% de CO₂ a 26°C, sin embargo se redujo su crecimiento en niveles similares de CO₂ cuando la temperatura fue de 12°C, lo que sugiere el crecimiento del hongo en condiciones anaeróbicas. (20,21)

Además, se encontró que el porcentaje de infección con *F. moniliforme* se incrementó significativamente ($p < 0.05$) en varios grados cuando el maíz se cosechó con humedad de 12.4% y se almacenó durante 8 meses, encontrándose una humedad al término del estudio de 13.7%. (35)

Los resultados indican que existe alto potencial para la producción de micotoxinas en un amplio rango de condiciones de almacenamiento, concluyéndose que las fumonisinas pueden surgir en campo debido al parasitismo del hongo e incrementarse bajo condiciones inapropiadas de almacenamiento. (21,35,36)

La evaluación de *F. moniliforme* y *F. proliferatum* para la producción de fumonisinas se basa en el cultivo en laboratorio sobre maíz estéril y el análisis de la cantidad producida de fumonisinas. La producción en el laboratorio incluye el ajuste del contenido de humedad de maíz entero o

parcialmente molido a 43% y esterilizado durante 30 minutos. El agua puede ser adicionada antes de esterilizar o asépticamente después de la esterilización; en el primer caso debe dejarse de 1 a 4 horas con el maíz, antes de ser esterilizado. La relación de agua en el maíz es crítica, ya que el exceso reduce el rendimiento de fumonisinas. (3,9)

Otro aspecto importante es la aeración que recibe el cultivo del hongo, la cual es controlada mediante el uso de recipientes con tapón ligeramente ajustado. Para este propósito se recomienda que para el cultivo en 50 g de maíz se utilicen matraces Erlenmeyer de 300 ml de capacidad, para 100 g matraces de 500 ml y para 500 g en matraces Fernbach de 2.8 l. En pruebas tamiz se utilizan cultivos de 50 gr, mientras que para la producción de fumonisinas a gran escala en investigaciones toxicológicas se utilizan los matraces Fernbach.. (3)

Para la preparación del inóculo de conideas se recomienda el uso de agua estéril o medios enriquecidos a partir del crecimiento del hongo durante 1-2 semanas en medio tradicional o mediante conideas liofilizadas. Una vez realizada la inoculación al maíz los cultivos son incubados en la obscuridad a 25°C de 21 a 30 días, aunque períodos mayores pueden dar lugar a una mayor producción. El tiempo depende del método usado y de la cantidad total de maíz en el fermentador; durante los tres primeros días los cultivos deben ser agitados 1 o 2 veces por día. (9,20)

Existen procedimientos de incubación alternativos, en los cuales se procede a incubar 2 semanas a 27°C seguido de 2 semanas a 15°C. Otro procedimiento utilizado para evaluar la producción de fumonisinas es a través de cultivos líquidos, en los cuales se puede manejar cultivos estacionarios por 28 días o bien mediante cultivos en agitación durante 14 días. (3)

El rendimiento de producción de fumonisinas es variable, según el método que se utilice y depende de la cepa del hongo, los resultados indican que la mayoría de las cepas de *F. moniliforme* y *F. proliferatum* aisladas en diferentes áreas geográficas y hospederos son altas productoras de fumonisinas. (20)

El siguiente cuadro muestra la producción de fumonisina B₁ de diferentes cepas de *F. moniliforme* * aisladas de fuentes diversas.

Alimento de animales con maíz contaminado (USA)	Sorgo y Milo (Nigeria y Zimbabwe)	Maíz mohoso (Nepal)	Alimento de animales con maíz de buena calidad (USA)	Queratitis micótica y cáncer (Canadá y USA)
M-2546 (2,589)	M-5054 (2,448)	M-5496 (nd)	M-211 (1927)	M-722 (1,914)
M-2552 (6421)	M-5067 (733)	M-5500(traza)	M-2232 (3,091)	M-773 (2,500)
M-2547 (144)	M-5068 (539)	M-5507(traza)	M-2270 (459)	M-1102 (nd)
M-2650 (traza)	M-5081 (traza)	M-5519 (60)	M-2285 (2,716)	M-1810 (130)
M-3031 (1,391)	M-5193 (traza)			M-2768 (nd)
M-3034 (6,090)	M-5243 (104)			M-5114 (2,900)
M-3041 (323)	M-5234 (95)			M-2978 (1,700)

* Número de acceso de las cepas de *F. moniliforme* en el Centro de Investigaciones de Fusarium con concentraciones de FB₁ en ppm dentro del paréntesis. Fuente : Bacon Ch.W. 1994. (3)

El comportamiento de las contaminaciones por *F. moniliforme* es variable debido a que existe heterocigocidad dentro de los cultivares de maíz, además de la variación genética dentro de las especies del hongo, así como por las condiciones ambientales; por lo que para el control del hongo es necesario el conocimiento detallado de la asociación de *F. moniliforme* y el cultivo de maíz. (6,12)

El manejo del cultivo antes y después de la cosecha influye en gran medida en los niveles de contaminación del tóxico, sin embargo no existen datos suficientes en nuestro país sobre factores climáticos y de manejo agrícola que influyan en la presencia de las micotoxinas en el campo, lo cual debe ser evaluado y validado para cada región agroecológica. (26)

Dentro de los pocos estudios realizados en México con respecto a *Fusarium moniliforme* y fumonisinas, cabe mencionar lo reportado por Desjardins A.E. en 1994, donde se encontró predominio de cepas de la

población A de *F. moniliforme* (*Giberella fujikoroï*, estado perfecto del hongo) de localización y genética diversa como en los casos reportados en Estados Unidos ; a pesar de que el tamaño de muestra fue pequeño en el estudio realizado en 4 ejidos del estado de Nuevo León, las cepas aisladas tuvieron alto potencial de producción de fumonisinas, siendo el 97% de las muestras productoras, con un rango de producción de 10 a 9,000 ppm. Encontrándose niveles mayores de 1,000 ppm en 31 de los 34 extractos. Los resultados reportados en el noreste del país sugieren que existe alto riesgo de contaminación en el maíz mexicano así como en productos del maíz para consumo humano y animal. (12)

Estudios previos realizados en el área de Micotoxicología del Departamento de Salud Pública, de la División de Ciencias Veterinarias (C.U.C.B.A, Universidad de Guadalajara), permitieron el aislamiento de cepas de *F. moniliforme* en el 80% de las muestras de maíz recolectadas en Huejotitán , Mpio. de Jocotepec, Jalisco, con lo que se inició el estudio del hongo y la producción de fumonisinas en el maíz cosechado en la región de Jalisco, siendo necesaria la evaluación de las cepas respecto a su capacidad productiva, objetivo central del presente estudio.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presentación de *Fusarium moniliforme* en el maíz es considerada casi universal, y como fitopatógeno es una de las principales causas de la pudrición de la mazorca y de la germinación prematura del maíz, el grado de infección en la planta y en la mazorca depende de la heterocigocidad del hongo, del cultivar de maíz así como de las condiciones ambientales.

Las especies de *F. moniliforme* y *F. proliferatum* son las principales productoras de las fumonisinas, micotoxinas de reciente caracterización, las cuales son responsables de la leucoencefalomalacia equina, del edema pulmonar porcino, además consideradas potencialmente carcinogénicas en ratas y con efectos aterogénicos y de daño hepático en primates no humanos. En algunos países han sido correlacionados altos niveles de fumonisinas con la alta incidencia de cáncer esofágico humano.

Pocos estudios se han realizado en México respecto a la incidencia del hongo en el maíz y sus productos, sin embargo los reportes de investigaciones realizadas al noreste de la república mexicana indican alto nivel de contaminación con cepas de *F. moniliforme*, de alto potencial productivo de fumonisinas, las cuales pueden estar presentes en el maíz que se destina tanto a consumo humano como animal o bien en productos del maíz que han sido sometidos a procesamientos físicos o químicos, los cuales pueden dar por resultado modificación a la estructura de la micotoxina, la cual permanece en la mayoría de los casos atada a la matriz del alimento conservando el efecto tóxico de las fumonisinas.

Debido a que el estado de Jalisco ocupa el primer lugar de producción de maíz a nivel nacional, es importante evaluar el grado de contaminación por el hongo y las fumonisinas en las zonas consideradas de alto potencial agrícola como es el municipio de Jocotepec , Jalisco.

JUSTIFICACION

Dentro de las principales medidas de control higiénico en el manejo de los alimentos se incluyen los análisis rutinarios de algunas micotoxinas, como lo son las Aflatoxinas (B₁ y G₁), Zearalenonas y las toxinas producidas por *F. moniliforme* (fumonisinas y fusarinas), por ser consideradas los tres grupos potencialmente carcinogénicas por la Agencia Internacional de Investigaciones en Cáncer, sin embargo en la actualidad en México poco se llevan a cabo, además de carecer de los niveles de recomendación para la mayoría de las micotoxinas en los granos y en sus productos que son destinados a consumo humano.

El poder evaluar la capacidad de producción de fumonisinas por cepas nativas de *F. moniliforme* aisladas en una zona agrícola del estado de Jalisco permitirá valorar el riesgo tóxico del maíz que se cosecha y que puede destinarse al consumo de la población o bien a la alimentación en las explotaciones pecuarias.

Por otra parte, el presente estudio contribuirá al desarrollo de investigaciones posteriores, respecto a la presencia de fumonisinas en el maíz y sus productos, especialmente aquellos sometidos a nixtamalización, y a la valoración del efecto tóxico de los hidrolizados de FB₁ en animales de laboratorio.

HIPOTESIS

Si la presentación de *Fusarium moniliforme* en el maíz es casi universal y dada la alta incidencia de cepas productoras de fumonisinas, entonces es posible encontrar alto porcentaje de cepas productoras de fumonisinas en el maíz cosechado en Huejotitán, municipio de Jocotepec Jalisco.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL :

Evaluar el potencial productivo de fumonisinas por cepas de *Fusarium moniliforme* aisladas en una zona altamente agrícola del estado de Jalisco.

OBJETIVOS PARTICULARES :

1. Determinar el porcentaje de las cepas de *Fusarium moniliforme* que presenten la capacidad de producción de fumonisinas.
2. Valorar la capacidad de producción de fumonisinas por las cepas aisladas en el maíz blanco cosechado en Huejotitán, municipio de Jocotepec, Jalisco.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL



MATERIAL Y METODO

El presente estudio se realizó en el área de micotoxicología del Depto. de Salud Pública, División de Ciencias Veterinarias, del C.U.C.B.A. y con el apoyo del Instituto de Madera Celulosa y Papel, C.U.C.E.I. de la Universidad de Guadalajara.

PREPARACIÓN DEL INOCULO:

Una vez identificadas las cepas de *F. moniliforme* se procedió a la recuperación de conideas en medio de cultivo agar extracto de malta y se dejó incubar 10 días a 25 °C, obteniendo el micelio aéreo mediante agua destilada estéril.

El micelio recuperado se agregó a 40 ml de medio líquido pre-enriquecido de agar extracto de malta e incubó en agitación orbital (100 rpm) durante 24 horas a 25 °C, posteriormente se preparó el inóculo (10^{17} conideas) previa cuantificación de conideas y se agregó al fermentador.

En un matraz erlenmeyer de 300 ml de capacidad con tapón de gasa (fermentador) se colocaron 40 g de maíz parcialmente molido y se agregó 1 l ml de agua destilada, dejando 1-4 horas para después esterilizar en autoclave a 15 lb de presión durante 30 min. Una vez realizada la inoculación de las cepas de *F. moniliforme* se dejaron incubar en la obscuridad durante 30 días a 25 °C.

CUANTIFICACIÓN DE FUMONISINAS :

Extracción y Limpieza:

1. 15 g de muestra se colocaron en una botella de boca ancha con 100 ml de acetoniitrilo: agua (50 :50) y se agitaron durante 30 min.
2. Se tomó una alícuota de 10-25 ml de extracto, se decantó y filtró (papel filtro Whatman No. 4).
3. Se condicionó una columna C-18 con 5 ml de metanol, seguido por 5 ml de cloruro de potasio al 1% acuoso; 2 ml del extracto filtrado se combinó con 5 ml de cloruro de potasio al 1% y se aplicaron a la columna,

posteriormente se lavó con 5 ml de cloruro de potasio al 1% seguido por 2 ml de acetonitrilo: cloruro de potasio al 1% (10 :90).

4. Las fumonisinas se eludieron con 4 ml de acetonitrilo :agua (70 :30) y la columna se evaporó y secó con aire caliente.

Detección mediante Cromatografía de capa fina:

1. El residuo de la muestra fue disuelto en 100 μ l de acetonitrilo :agua (50 :50) y 10 μ l se aplicaron a la placa de cromatografía C-18, así como 10 μ l del estándar de FB1 (5,10,100 ppm) disuelto en acetonitrilo :agua (50 :50).
2. La placa se desarrolló en metanol:cloruro de potasio al 1% (60 :40), se secó al aire y aplicó buffer de borato de sodio al 0.1 M (pH 8-9) seguido de fluorescamina (0.4 mg/ml de acetonitrilo); 1 min después se aplicó acetonitrilo:ácido bórico (60 :40) y secó a temperatura ambiente. Se examinó bajo luz ultravioleta con longitud de onda de 254 y 366 nm y se consideró la detección de forma cualitativa.

Cuantificación mediante Fumonitest (Vicam):

Sistema de Cromatografía de Afinidad Inmunológica con detección Fluorométrica, el cual permite la cuantificación confiable de fumonisinas equivalente al procedimiento de Cromatografía líquida de alta resolución, actualmente utilizado en forma oficial por los organismos de supervisión de granos en Estados Unidos.

TECNICA : (42)

1. Se colocaron 50 g de muestra con 5 g de cloruro de sodio en una jarra para licuadora.
2. Se agregaron 100 ml de metanol al 80% y licuaron a alta velocidad durante 1 min.
3. Se filtró y colectó el filtrado en un vaso limpio.
4. Se agregó 1 ml del extracto filtrado en un vaso limpio y diluyó con 49 ml de solución de lavado de micotoxinas (Vicam) y mezcló bien.
5. Se filtró el extracto diluido a través de filtro microfibras.
6. Pasar 1 ml del extracto filtrado a través de la columna de Fumonitest (1ml =0.01 g de muestra).

7. Se lavó la columna con 5 ml de solución buffer de lavado de micotoxinas, repitiendo la operación; posteriormente se lavó con 5 ml de agua destilada.
8. Se eludieron las fumonisinas con 1 ml de metanol grado HPLC y colectaron en una cubeta especial de vidrio para fluorómetro.
9. Se agregaron 0.5 ml de reactivo A y 0.5 ml del reactivo B (reveladores) La lectura de la concentración de fumonisinas se realizó a los 300 seg y el resultado se multiplicó por 100.

Análisis de Resultados.

Los niveles de fumonisinas que se cuantificaron mediante Fluorometría y confirmaron mediante cromatografía de capa fina de cada cepa de *F. moniliforme* (dos repeticiones por cepa) fue la variable descriptiva expresada en cuadros de frecuencias, para lo cual se obtuvieron las clases de acuerdo al rango máximo y mínimo de fumonisinas en ppm.

RESULTADOS

Los resultados de la producción de Fumonisinias por las cepas aisladas del maíz se presentan en el cuadro 1 y gráfica 1, siendo el 93.8% de las cepas (15/16) productoras de fumonisinias, con mínimo de 700 ppm y máximo de 2280 ppm, encontrándose que el 80% de las cepas tuvieron una producción mayor de 1000 ppm, desarrollada en todos los casos la confirmación de la toxina mediante la cromatografía de capa fina, para lo cual fue necesario la dilución previa a su aplicación a la placa C₁₈ y posterior comparación con el estándar de fumonisina (100 µg/g).

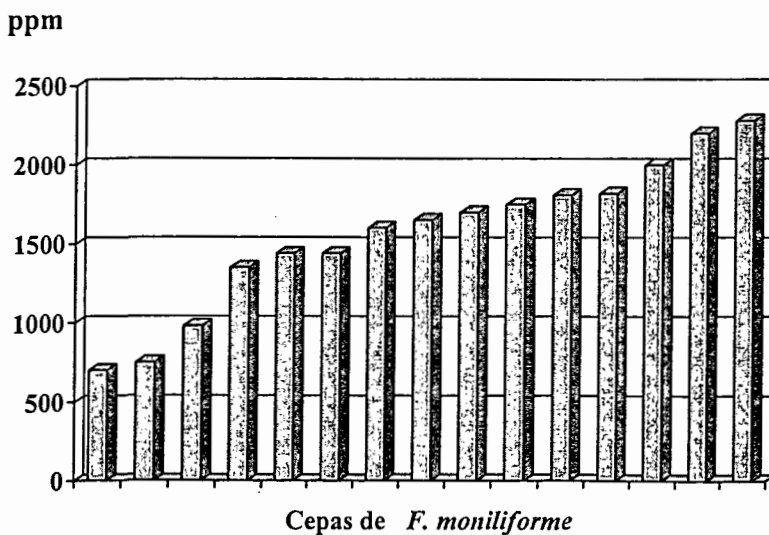
Los resultados reportados por Castro S.X. en 1997, permitieron establecer que el daño visual de la mazorca no tiene influencia significativa sobre el desarrollo de UFC/g de muestra ya que pudo observarse que el mayor porcentaje de la muestras (70%) fue calificado de 0-2% de daño, sin que existiera diferencia estadística entre este grupo con los de mayor daño visual. La presentación de *F. moniliforme* en el maíz fue en el 80% de las muestras analizadas sin ser determinante el daño del grano y el número de UFC., lo cual es atribuible a la naturaleza de infección del hongo, la cual puede ser asintomática. (8)

Cuadro 1

**CAPACIDAD PRODUCTIVA DE FUMONISINAS POR CEPAS DE
Fusarium moniliforme AISLADAS DEL MAIZ.**

Rango (ppm)	Cepas (positivas)	Porcentaje	Frecuencia Acumulada
700-1000	3/15	20	20
1001-1500	3/15	20	40
1501-2000	7/15	46.7	86.7
2001-2500	2/15	13.3	100

Gráfica 1 PRODUCCION DE FUMONISINAS



DISCUSION

La calificación en el daño visual de la mazorca no puede considerarse un método de medición de alta precisión y confiabilidad por la subjetividad de la técnica, sin embargo, puede orientar sobre el grado de contaminación en el maíz por microorganismos, entre ellos los hongos, los cuales deterioran la calidad nutricional y sanitaria de los granos, ocasionando grandes pérdidas económicas a la agricultura al reducir el rendimiento de la cosecha, por lo que detectar el nivel de contaminación de los granos contribuirá a tomar medidas de control durante la cosecha y el almacenamiento. (8,26)

Si bien no fue el propósito del presente estudio, es importante entender que para determinar el riesgo que pueda existir en el maíz por *F. moniliforme* y sus toxinas, es necesario detectar su presencia en el grano, establecer el desarrollo de UFC/g de muestra en medio selectivo para especies de *Fusarium* y determinar si las cepas presentes poseen la capacidad productora de fumonisinas, ya que existen diversas poblaciones (A-F) dentro de la misma especie, de las cuales solo las poblaciones A y F presentan capacidad productiva, la primera de mayor frecuencia en el maíz y la segunda en el sorgo,(20) por lo que de estar presentes en el grano representarían un riesgo tóxico en los consumidores.

Para la valoración de la capacidad productiva de fumonisinas por cepas de *F. moniliforme*, debe descartarse la existencia de otra especie en el cultivo, por lo que la identificación debe ser con la mayor precisión, basada en las características típicas, que son la identificación de microconideas formadas en cadenas a partir de monofialides y la ausencia de clamidosporas, ya que de las especies de *Fusarium* productoras de fumonisinas (*F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. nygamai*, *F. dlamini* y *F. napiforme*), solo *F. proliferatum*, perteneciente a la sección Liseola, pudiera ser confundido por las características morfológicas similares, a excepción de las microconideas, que se presentan en cadenas cortas sobre polifialides, además de que esta especie es de mayor frecuencia en el sorgo. (19,21)

Otro aspecto importante a considerar, es la mutación que se presenta con frecuencia en las cepas de *F. moniliforme*, lo que influirá sobre la producción de fumonisinas, la cual puede ser de tipo pionatal a micelial; en la primera el micelio aéreo es suprimido y reemplazado por capas de macroconideas, proporcionando al cultivo una apariencia húmeda y amarillenta, mientras que en la forma micelial la esporodocia y el color de la colonia son suprimidos o eliminados. Ambas formas se presentan con frecuencia por la mutación que ocurre a la especie, lo que es determinante para la producción de toxinas y su virulencia. (13)

En el presente estudio, se observó posible mutación de tipo pionatal en una cepa aislada durante la resiembra, la cual se realizó a los 4 meses de aisladas del maíz, presentándose un cambio de coloración en el medio de cultivo de agar papa dextrosa, cepa que modificó su morfología en el microcultivo, siendo la única cepa que no produjo fumonisinas.

Los niveles de fumonisinas producidos por el 93.8% de las cepas se consideran altos, ya que las investigaciones previas consideran de baja producción el rango de 1-10 ppm, intermedias de 11-100 y 101-1000 ppm y alta producción niveles mayores de 1000 ppm. (3)

Estudios sobre la producción de fumonisinas por diversas especies de *Fusarium* han encontrado que a excepción de *F. nygamai*, la producción se restringe a la sección *Liseola*. Thiel y colaboradores reportaron durante el análisis de diferentes especies de *Fusarium*, la producción de FB₁ y FB₂ en todas las cepas de *F. moniliforme* y *F. proliferatum*. (36)

La producción de fumonisinas en cultivos en el laboratorio por cepas de *F. moniliforme* es variable aun dentro de un mismo sustrato, el Centro de Investigaciones de *Fusarium* en Estados Unidos reporta niveles de FB₁ en alimentos a base de maíz contaminado entre 144 a 6,090 ppm, y en el de buena calidad de 459 a 3,091 ppm. (3)

Con relación al estudio de cepas de *F. moniliforme* aisladas del maíz en zonas con alta incidencia de cáncer esofágico humano, se encontró que la cepa MRC826, a partir de la cual se caracterizaron a las fumonisinas, produjo 7,100 ppm de FB₁ y 3,000 ppm de FB₂. Los cultivos de la cepa MRC 826 también han sido considerados de potente actividad promotora de cáncer, lo cual fue comparable con otras cepas de alta producción de fumonisinas (MRC4317 y MRC4321), mientras que cepas de baja producción no exhibieron actividad promotora de cáncer. (1)

Debido a que las cepas de *F. moniliforme* aisladas en el maíz de Huejotitán, mpio. de Jocotepec, Jalisco son consideradas de alta producción, deben realizarse nuevas investigaciones, tanto de índole toxicológico como epidemiológico en las regiones donde el maíz presente mayor contaminación por *F. moniliforme* y las cepas pertenezcan a poblaciones de alto potencial productivo de fumonisinas.

CONCLUSIONES

1. Del total de cepas de *F. moniliforme* aisladas del maíz, el 93.8% (15/16) fueron productoras de fumonisinas.
2. La producción de fumonisinas por las cepas de *F. moniliforme* se presentó en un rango de 700 – 2280 ppm.
3. El 80% de las cepas de *F. moniliforme* se consideran de alto potencial productivo de fumonisinas (> de 1000 ppm).
4. Por los resultados del aislamiento e identificación de *F. moniliforme*, estudio preliminar, se concluye que existe alto grado de contaminación por *F. moniliforme* en el maíz en Huejotitán, municipio de Jocotepec, Jalisco, sin que exista relación significativa entre el daño visual de la mazorca, el desarrollo de U.F.C. y la presencia del hongo, siendo este último de gran capacidad productiva de fumonisinas.

BIBLIOGRAFIA

1. **Alberts J.F**, Gelderblom W.C.A., Vlegaar R., Marasas W.F.O. y Rheeder J.P. 1993. Production of (¹⁴C) fumonisin B1 by *F. moniliforme* MRC 826 in corn cultures. *Appl. Environ Microbiol.* 59(8):2673-2677.
2. **Alberts J.F**, Gelderblom W.C.A., Thiel P.G., Marasas W.F. O., Schalwyk D.J.V. y Behrend Y. 1990. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (6) : 1729-1733.
3. **Bacon CH. W.** y Nelson P.E. 1994, Fumonisin Production in corn by toxigenic Stains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium Proliferatum*. *J. Food Prot.* 6 :514-521.
4. **Bezuidenhout S.C.** y Gelderblom W.C.A. 1988. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Commun.* 4 :743-745.
5. **Bullerman LL.B.** y Draughon F.A. 1994. *Fusarium moniliforme* and Fumonisin Symposium. *J.Food Prot.* 57 (6): 513.
6. **Bullerman LL.B.** y Northolt M.D. 1982. Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *J. Food Prot.* 45(6): 519-526.
7. **Bullerman LL.B.** y Tsai Wei-Yun J. 1994 Incidence and levels of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based Foods and Feeds. *J. Food Prot.* 57 (6) : 541- 546.
8. **Castro S.M.X.** 1997. Valoración del nivel de contaminación del maíz por *Fusarium moniliforme* en Huejotitán, mpio. de Jocotepec, Jalisco. Tesis de Licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia. U. de G. pp:14-20.
9. **Cawood M.E.**, Gelderblom W.C.A., Vieggar R.B, Thiel P.G. y Marasas W.F.O. 1991 . Isolation of Fumonisin Mycotoxins : A quantitative Approach. *J. Agric. Food Chem.* 39 :1958-1962.

10. **Colvin B.M.**, Cooley A.J. y Beaver R.W. 1993. Fumonisin toxicosis in swine : Clinical and Patologic findings. J. Vet. Diagn. Invest. 5 :232-241.
11. **Chu F.S.** y Li G.Y. 1994. Simultaneous occurrence of Fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidens of esophageal cancer. Appl. Environ. Microbiol. 60(3) :847-857.
12. **Desjardins A.E.**, Plattner R.D. y Nelson P.E. 1994. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in Northeast Mexico. Appl. Environ. Microbiol. 60(5) :1695-1697.
13. **Desjardins A.E.**, Plattner R.D., Shackelford D.D., Leslie J.F. y Nelson P.E. 1992. Heritability of fumonisin B1 production in *Gibberella fujikoro* mating population A. Appl. Environ. Microbiol. 58(9): 2799-2805.
14. **Dupuy J.**, Bars P.L., Boundra H. y Bars J.L. 1993. Thermostability of Fumonisin B1, a mycotoxin from *Fusarium moniliforme* in corn. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 2864-2867.
15. **Gelderblom W.C.A.**, Jaskiewicz K., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Horak R.M., Viegar R. y Kriek N.P.J. 1988. Fumonisin- novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Appl. Environ. Microbiol. 54 :1806-1811.
16. **Harrison L.R.**, Colvin B.M., Greene J.T., Newman L.E. y Cole J.R. 1990. Pulmonary edema and hidrotorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J. Vet. Diagn. Invest. 2 :217-221.
17. **Marijanovic D.R.**, Holt P., Norred W.P., Bacon C.W., Voss K.A., Stancel P.C. y Ragland P. 1991. Immunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. Poultry Sci. 70 :1895-1901.
18. **Murphy P.A.**, Rice L.G. y Ross F. 1993. Fumonisin B1, B2 y B3 content of Iowa, Wisconsin and Illinois corn and corn screenings. J. Agric. Food Chem. 41 :263-266.

19. Nelson P.E., Dignani M.C. y Anaissie E.J. 1994. Taxonomy, Biology and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. Clin. Microbiol. Rev. 7(4) :479-504.
20. Nelson P.E., Juba J.H., Ross P.F. y Rice L.G. 1994. Fumonisin production by *Fusarium* species on solid substrates. J. AOAC International 77(2) :522-524.
21. Nelson P.E., Plattner R.D., Shackelford D.D. y Desjardins A.E. 1992. Fumonisin B1 production by *Fusarium* species other than *Fusarium moniliforme* in section *Liseola* and by some related species. Appl. Environ. Microbiol. 58(3) :984-989.
22. Norred W.P. y Voss K.A. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. J. Food Prot. 57(6) :522-527.
23. Osweiler G.D., Ross P.F., Wilson T.M., Nelson P.E., Witte S.T., Carson T.L., Rice L.G. y Nelson H.A. 1992. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with Fumonisin in corn screening. J. Vet. Diagn. Invest. 4 :53-59.
24. Riley R.T., Hinton D.M., Chamberlain W.J., Bacon C.W., Wang E., Merrill A.H. y Voss K.A. 1994. Dietary Fumonisin B1 induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague Dawley rats: A new mechanism of nephrotoxicity. J. Nutr. 124 :594-603.
25. Riley R.T., Voss K.A. Soo Yool H., Gelderblom W.C.A. y Merrill A.H. 1994. Mechanism of Fumonisin toxicity and carcinogenesis. J. Food Prot. 57(6) :528-535.
26. Rodriguez S.R.S. 1994. Estudio preliminar de correlaciones entre el desarrollo de colonias de *Fusarium moniliforme* in vitro, escala visual del daño en mazorca y contenido de fumonisinas en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) Tesis de Licenciatura Ing. Agrícola de U.A.G. pp:7-21.
27. Ross P.F., Nelson P.E., Richard J.L., Osweiler G.D., Rice L.G., Plattner R.D. y Wilson T.M. 1990. Production of Fumonisins by *Fusarium moniliforme* isolates associated with equine leucoencephalomalacia and

pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 :3225-3226.

28. Sala N., Sanchis V., Vilaro P., Viladricha R., Torres Ma. Viñas I. y Canela R. 1994. Fumonisin producing capacity of *Fusarium* Strains isolated from cereals in Spain. *J. Food Prot.* 10 :915-917.

29. Schroeder J.J., Crane H.M., Xia J., Liotta D.C. y Merrill A.M. 1994. Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B1. *J. Biol. Chem.* 269(5) :3475-3481.

30. Scott P.M. 1993. Fumonisin Mini-review International. *J. Food Microbiol.* 18 :257-270.

31. Sydenham E.W., Gelderblom W.C.A., Thiel P.G. y Marasas W.F.O. 1990. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. *J. Agric. Food Chem.* 38(1) :285-290.

32. Sydenham E.W., Marasas W.F.O., Shephard G.S., Thiel P.G. y Hirooka E.Y. 1992. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. *J. Agric. Food Chem.* 40 :994-997.

33. Sydenham E.W., Shephard G.S., Thiel P.G., Marasas W. F.O. y Stockenström S. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 39 :2014-2018.

34. Sydenham E.W., Shephard G.S., Thiel P.G., Marasas W. F.O. y Koch K.R. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei Southern Africa. *J. Agric. Food Chem.* 38 :1900-1903.

35. Visconti A. y Doke B. 1994. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *J. AOAC International.* 77(2) :546-550.

36. Thiel P.G., Marasas W.F.O., Sydenham E.W., Shephard G.S., Gelderblom W.C.A. y Niewwenhuis J.J. 1991. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. Appl. Environ. Microbiol. 57(4) :1089-1093.
37. Thiel P.G., Marasas W.F.O., Sydenham E.W. 1992. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. Mycopathologia. 117 :3-9.
38. Thiel P.G., Sydenham E.W., Shephard G.S., Marasas W.F.O., Nelson P.E. y Wilson T.M. 1991. Levels of fumonisins B1 and B2 in feeds associated with confirmed cases of equine leucoencephalomalacia. J. Agric Food Chem. 39 :109-111.
39. Wang E., Ross P.F., Wilson T.M., Riley R.T. y Merrill A.H. 1992. Increases in serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. J. Nutr. 122 :1706-1716.
40. Weibking T.S., Ledoux D.R., Bermudez A.J., Turk J.R. y Rottinghaw G.E. 1993. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisins B1 on the young broiler chick. Poultry Sci. 72 :456-466.
41. Yoshizawa T., Yamashita A. y Luo Y. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high and low risk areas for human esophageal cancer in China. Appl. Environ. Microbiol. 60(5) :1626-162.
42. Ware, G.M., Umrigar, P.P., Carman Jr., (1994) A.S. Analytical Letters, Evaluation of Fumonitest immunoaffinity columns, 27(4): 693-715.

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL