

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**

DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS



**DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE CEPAS FUNGICAS Y
AFLATOXINA B1, B2, G1 Y G2 EN ALIMENTO CONCENTRADO PARA EL
CONSUMO DE BOVINOS EN LA REGION DE OCOTLAN, JALISCO.**

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

P. MVZ JUAN RAMON BELTRAN MARTINEZ

**DIRECTOR DE TESIS
M.C. MARGARITA HERNANDEZ GALLARDO**

**ASESOR DE TESIS
DR. AGUSTIN RAMIREZ ALVAREZ**

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jalisco. Diciembre del 2000.

A MI ESPOSA:
Y MIS HIJOS:

LOURDES
OSCAR GERMAN, LOURDES SOFIA Y
SAMANTA ISELA

Con todo mi cariño que para ellos valga
lo que es un fruto de sacrificios y desvelos
firme y bien ganado, y largamente anhelado.

A MIS PADRES:

RAMON BELTRAN PEREZ +
MARIA DE LA LUZ MARTINEZ RAMOS

Que con orgullo me dieron testimonio fiel de vida,
con la cual pude lograr lo que ahora es una grata
realidad.

A MIS QUERIDISIMOS MALOGRADOS HERMANOS:

MANUEL

Que con tu mano guiaste gran parte de mi vida
pudiendo realizar varias etapas importantes y
trascendentales, valga este pequeño tributo a
tu labor y sacrificio desinteresados, donde
quiera que estés.

OSCAR GERMAN

Que con tu destino cruelmente marcado a tan
temprana edad, me mostraste con tu mudo
ejemplo, cómo se deben andar los caminos por
muy difíciles que parezcan.

A MIGUEL ANGEL CARDENAS:

Amigo y gran compañero de estudios y otros andares, que con tu entusiasmo característico y motivación, has sido el pilar básico de esta lograda alegría.

A MARGARITA HERNÁNDEZ GALLARDO.

Un especial y profundo agradecimiento que
Aunque insignificante, quisiera engrandecerte
Lo grande que ya eres, por tu valiosísima guía
Y participación con tan noble empeño en el
Desarrollo de este trabajo que es tan tuyo.

CONTENIDO.

PAGINAS

RESUMEN.....	X
INTRODUCCIÓN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
JUSTIFICACIÓN.....	7
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVOS.....	10
MATERIAL Y METODOS.....	11
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	23
CONCLUSIONES.....	25
BIBLIOGRAFIA.....	26

RESUMEN

La contaminación de alimento y materias primas con hongos productores de sustancias tóxicas (micotoxinas), es un problema mundial que puede ocasionar daños en la salud del hombre y de los animales. El presente trabajo se llevó a cabo en el área de Micotoxicología del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Con el objetivo de determinar el grado de contaminación con hongos productores de micotoxinas y con aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂ en alimento concentrado para bovino, se recolectaron 60 muestras, a las cuales se les determinó el porcentaje de humedad y se aplicó la técnica de vaciado en placa para la determinación de unidades formadoras de colonias por gramo de alimento así mismo la técnica de cromatografía en capa fina para la determinación de aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂. Los resultados obtenidos fueron los siguientes; Para la humedad se encontró un rango de humedad del 10.23 a 13.18%. En las unidades formadoras de colonias se determinaron, recuentos altos en un 2.0%, moderados 72.3% y bajos 25.6% . En la determinación de cepas fúngicas se encontraron los siguientes géneros; *Aspergillus spp.* 40.6 %, *Penicillium spp.* 34.0 %, *Mucor spp.* 9.7 %, *Fusarium spp.* 8 %, *Rhizopus spp.* 3.4 % y *Absidia spp.* 3.4 % . En la determinación de aflatoxinas se presentaron la B₁ 45 %, B₂ 27.27, G₁ 18.18 % y G₂ 9.09 %, en una concentración que varió de 16 ppb a 116 ppb. Se concluye que estos alimentos son de alto riesgo para el consumo de animales por los niveles de contaminación con aflatoxinas.

INTRODUCCIÓN

Una de las necesidades fundamentales del hombre a través de su desarrollo evolutivo ha sido la alimentación. En los países en vías de desarrollo alrededor del 85% de los alimentos depende de los productos agrícolas. En términos generales se considera que la dieta del hombre a nivel mundial, esta constituida en un 70% de productos vegetales, principalmente granos y un 30% de productos de origen animal (10,12)

Estos granos y sus derivados pueden ser invadidos por microorganismos que producen compuestos tóxicos, reduciendo así la productividad y a la vez su calidad nutricional. Dentro de estos se encuentran las micotoxinas que han sido objeto de amplias investigaciones en los últimos 10 años especialmente en relación con sus efectos. Una micotoxina se define como un metabolito tóxico secundario producido por un hongo (14, 16).

Las aflatoxicosis en animales son conocidas y diagnosticadas en México por Ernesto Dante de la Vega desde 1932, quien describe algunos casos de intoxicación en equinos por el consumo de alimento contaminado con *Aspergillus glaucus*, sin embargo no fue sino hasta 1960 cuando se consideró a las aflatoxinas producidas por hongos del género *Aspergillus* como causa de procesos de intoxicación conocidos en Inglaterra como "Enfermedad X de los pavos" (1,7).

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 hongos los que pueden producir estos metabolitos. En el cuadro N° 1 se presenta algunas especies de hongos productores de micotoxinas en diversos productos agrícolas (5,19,20).

CUADRO N° 1**HONGOS TÍPICOS Y MICOTOXINAS ASOCIADAS CON DIVERSOS PRODUCTOS AGRÍCOLAS.**

HONGOS	MICOTOXINAS	LOCALIZACIÓN
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i> <i>Fusarium spp</i>	Aflatoxina	Cacahuete, harina, nuez del brasil, arroz, trigo, avena y cebada
<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium cytopium</i>	Ochratoxina	Nuez del brasil, frutas de cítrico, café y tabaco
<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium roseum</i> <i>Fusarium moniliforme</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Fusarium tricinctum</i>	Zearalenona	Varios granos
<i>Fusarium avenaceum</i> <i>Fusarium culmorum</i> <i>Fusarium equisiti</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium poae</i> <i>Fusarium moniliforme</i>	Tricotecenos	Varios granos

Fuente: Organización Panamericana de la salud 1983; microbiología de los alimentos Frazier. D.C. Westhoff, 1993.

Entre los principales factores que regulan el crecimiento de hongos se encuentra la humedad y la temperatura del substrato, determinadas ambas por el medio ambiente. La humedad del substrato es el principal factor que regula el crecimiento del hongo y la ulterior formación de micotoxinas. Los hongos generalmente, tienen una actividad hídrica mínima, mucho menor que la de las bacterias. Esto explica por qué muchos productos libres de putrefacción debida a bacterias pueden ser descompuestos por hongos (9,10).

Los ingredientes para la elaboración de alimentos tales como el maíz, trigo, centeno, cebada y sorgo entre otros, constituyen excelentes medios de cultivo para el desarrollo de hongos. Por ejemplo el *Aspergillus fumigatus*, spp., entre otros, producen micotoxinas en los ingredientes alimenticios, en el cuadro N° 2 se observa el contenido de humedad

relativa en equilibrio de algunos ingredientes y hongos, que comúnmente se encuentran creciendo bajo estas condiciones.

CUADRO N° 2

CONTENIDO DE HUMEDAD DE ALGUNOS GRANOS EN EQUILIBRIO CON HUMEDAD RELATIVA Y HONGOS QUE COMÚNMENTE SE ENCUENTRAN CRECIENDO BAJO ESTAS CONDICIONES.

HUMEDAD RELATIVA %	AVENA ARROZ CEBADA MAIZ SORGO Y TRIGO	SOYA	CARTAMO CACAHUATE Y GIRASOL	HONGOS.
65 - 70	13.0 - 14.0	12.0 - 13.0	5.0 - 6.0	<i>Aspergillus</i>
70 - 75	14.0 - 15.0	13.0 - 14.0	6.0 - 7.0	<i>A. restrictus</i> <i>A. glaucus</i>
75 - 80	14.5 - 16.0	14.0 - 15.0	7.0 - 8.0	<i>A. candidus</i> <i>A. ochraceus</i>
80 - 85	16.0 - 18.0	15.0 - 17.0	8.0 - 10.0	<i>A. favus</i> <i>A. penicillium</i>

Fuente: CHISTENSEN Y SABER 1982

La temperatura es otro factor de suma importancia para el desarrollo de las micotoxinas; ésta es específica para cada uno de los diferentes géneros de hongos. La temperatura mínima, óptima y máxima, difieren considerablemente de una a otra especie. Algunas pueden desarrollarse por debajo de 0°C, otras, tienen un mínimo de 10°C. La mayoría de los *Penicillium* tienen un rango de temperatura mínima menor que los *Aspergillus*. La temperatura óptima es de 25 - 30°C para la mayor de los *Penicillium* y de 30 - 40°C para la mayoría de los *Aspergillus* (temperaturas que a menudo se alcanzan en los países tropicales). Varias especies del género *Fusarium* tienen rangos de temperaturas óptimas que van de 8 a 15°C y existen en áreas de clima templado, influyendo, el tiempo de almacenamiento y el tipo de alimento. En el cuadro N° 3 se presentan los rangos de temperatura mínima, óptima y máxima para el desarrollo de hongos productores de micotoxinas (9,10).

Cuadro N° 3

**RANGO DE TEMPERATURA MÍNIMA, ÓPTIMA Y MÁXIMA PARA EL
DESARROLLO DE HONGOS PRODUCTORES DE MICOTOXINAS.**

Hongos	Mínima	Óptima	Máxima
<i>Aspergillus restrictus</i>	5 - 10	10-35	40-45
<i>Aspergillus glaucus</i>	0-5	30-35	40-45
<i>Aspergillus flavus</i>	10-15	40-45	45-55
<i>Penicillium</i>	(-5) - (+5)	20-25	35-40
<i>Fusarium</i>	-3	20-25	31
<i>Fusarium culmorum</i>	0	25	31
<i>Fusarium oxysporum</i>	5	25-30	5
<i>Epicoccum nigrum</i>	(-3) - 4	23-28	45
<i>Alternaria alternata</i>	2.5-6.5	25-28	31

Fuente: Christensen y Saver 1982.

Una vez que se establecen los factores ambientales adecuados para la reproducción de hongos, estos producirán sustancias tóxicas en el alimento, alterando sus propiedades nutricionales con las consecuentes pérdidas económicas; cuando los animales ingieren las aflatoxinas estas siguen una ruta de distribución dentro de su organismo. Figura N° 1 (12, 14).

A estas se les caracterizó en 4 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 separarse al adicionar un radical alcohol, hidroxilo, oxidrilo o una doble ligadura, lo que da diferentes propiedades a cada uno de estos. La aflatoxina M₁ es un metabolito de la B₁ que se biotransforma en el hígado de un animal o persona que ha consumido alimento contaminado. La aflatoxina M₁ es muy importante por que se excreta en leche y huevo aproximadamente después de 24 horas de que el alimento contaminado ha sido ingerido (4,2,6).

Las aflatoxinas pueden formarse en productos alimenticios antes y después de la cosecha. Se han encontrado con mayor frecuencia en alimentos que se guardan en condiciones de humedad y temperatura favorables para el desarrollo del hongo (8).

FIGURA N° 1

ruta que pueden seguir las aflatoxinas al ser ingeridas por hembras gestantes.



Fuente: Christensen y Saber 1982

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las cepas de *Aspergillus flavus* y *Penicillium parasiticus* producen aproximadamente el 30% de aflatoxinas en los piensos y alimentos.

Cuando el alimento se almacena bajo condiciones inadecuadas de humedad y temperatura, estos favorecen el crecimiento de hongos productores de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂. Al existir estas aflatoxinas en el alimento, revisten un serio problema de Salud Pública puesto que estos metabolitos se encuentran en leche y tejidos. El hombre se encuentra expuesto directa o indirectamente al consumo de la aflatoxina M₁ a través de alimentos de origen animal como en leche, queso, yogur entre otros.

En la región de Ocotlán, Jalisco no existen estudios que nos indiquen el grado de contaminación con aflatoxinas en alimento destinados para bovinos, de aquí la importancia de determinar estos contaminantes para poder establecer un sistema de vigilancia.

JUSTIFICACIÓN

Cuando las aflatoxinas son consumidas por los animales en los granos o alimentos, el compuesto o sus metabolitos, se difunden por todos los tejidos indicando una rápida absorción. Aparece en la orina, heces fecales y principalmente en leche constituyendo así un contaminante de los alimentos que son destinados al consumo humano, lo que tiene gran importancia en la Salud Pública (20, 21, 34).

Los efectos que producen las aflatoxinas en los animales son diversos y van a depender de factores como la edad, sexo, especie, raza, estado de salud, grado de exposición y el tipo de alimento. Pueden ser del tipo de inducción de tumores, para ciertas especies animales; mutagénicos y teratogénicos, además de una reducción de nutrientes que va afectar a la reproducción, pues también disminuye el consumo de alimento y deprime su sistema inmunocompetente, dando como resultado una alta mortalidad (8, 21, 34).

En ganado productor de leche al ingerir dosis diarias de 2,300 a 4,200 ppb de aflatoxina B1 por un periodo de 3 semanas a un mes, producen un deterioro marcado en la salud y a la vez una disminución en el consumo de alimento, por lo que la producción de leche disminuye.

La importancia estriba en que la aflatoxina M₁ que es un metabolito de la B₁, se elimina en leche en una proporción de un mcg por litro de leche. Sus efectos son mutagénicos, hepatotóxicos, inmunosupresores y carcinogénicos, similares a los de la B₁ aunque menos potentes.

Desafortunadamente, el grupo mayor de consumidores de leche son los infantes y ancianos, los que a su vez son más sensibles a los efectos de la aflatoxina M₁ (1, 11, 26).

Además, se ha reportado que cuando la aflatoxina B₁ es ingerida por bovinos, esta inhibe las bacterias ruminales bajando la concentración de ácidos grasos volátiles (acético y propiónico principalmente) y reduciendo la digestibilidad de la celulosa (3, 27).

La presencia de las micotoxinas en los alimentos para consumo humano y animal significa un gran riesgo para el hombre, puesto que lo pueden afectar directa o indirectamente una vez que entran a su cadena alimenticia. Por ese motivo varios países han impuesto guías o normas a la presencia de micotoxinas en el alimento.

En México es necesario profundizar más en el conocimiento de las micotoxinas, con el principal objetivo de establecer normas que regulen la calidad de los alimentos que se producen o importan a nuestro país.

HIPÓTESIS

TESIS/CI/CBA

Si los alimentos concentrados para bovinos se almacenan bajo condiciones de humedad y temperatura adecuadas para el desarrollo de hongos productores de micotoxinas, entonces estos alimentos se encontrarán contaminados con aflatoxina B₁, B₂, G₁ y G₂ en niveles no permitidos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

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

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Determinar el porcentaje de humedad en el alimento concentrado.
2. Identificar las cepas fúngicas potencialmente productoras de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ que se presentan en concentrado para bovinos.
3. Determinar la carga fúngica del alimento para bovino mediante recuentos de unidades formadoras de colonias (U.F.C./g).
4. Cuantificar aflatoxinas producidas en el alimento para bovinos por el método analítico de cromatografía en capa fina.

MATERIAL Y METODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en el área de Micotoxicología del Departamento de Salud Pública de la División de Ciencias Veterinarias del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Se obtuvieron 60 muestras de alimento concentrados para bovinos, recolectadas en bolsas de papel de las bodegas de granjas de Ocotlán Jalisco. El tiempo transcurrido desde el monitoreo hasta el análisis para cuantificar e identificar las cepas fúngicas no fue mayor de 48 horas.

Al alimento para bovino se le determinó el porcentaje de humedad mediante una balanza.

La cuantificación e identificación de hongos se obtuvo por la técnica de vaciado en placa de la siguiente manera;

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIO DE CULTIVO.

Solución de rosa de bengala; Seis gramos de rosa de bengala se disolvieron en 100 ml de agua destilada estéril.

Solución de ampicilina; Se disolvió 200 mg de ampicilina en 10 ml de agua destilada estéril, conservándola en refrigeración. Por cada 100 ml de medio de cultivo se le adiciono 0.5 ml de esta solución.

Diluyente de peptona; Un gr. de peptona de caseína se disolvió en 1000 ml de agua destilada, ajustando el pH a 7 ± 0.2 , depositando 9 ml. En tubos y en frascos botella 90 ml. Se esterilizó a 15 lb durante 15 minutos dejando enfriar a temperatura ambiente.

Agar papa dextrosa; 39 gr. de agar papa dextrosa se disolvió en 1000 ml de agua destilada, se homogenizó y se ajustó el pH a 7 ± 0.2 se llenaron frascos botella con 100 ml. y se esterilizó a 15 lb durante 15 minutos, conservándolo a 45°C . en baño María.

CUANTIFICACION DE CEPAS FUNGICAS;

Se depositaron 10 gr de muestra en un frascos con 90 ml de agua peptonada se homogenizó, se deposito 1 ml en tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua peptonada, un ml en una caja de petri estéril. Se repite la acción en el siguiente tubo y se obtiene una dilución de 1:100, así hasta la dilución 10:1,000. A las cajas de petri con la muestra se les incorporo el medio de cultivo de agar papa dextrosa adicionado de rosa de bengala y ampicilina, finalmente, se dejo incubar a temperatura ambiente (20 a 27°C) durante 3 a 5 días (13).

Sin destapar las cajas se efectuó el recuento de unidades formadoras de colonias mediante un contador de colonias, con el cual nos permitió conocer el grado de contaminación con hongos. Son considerados recuentos bajos de colonias de hongos aquellos que oscilan entre 1,000 y 10,000 U.F.C./ gr, recuentos moderados de 100,000 a 1'000,000 U.F.C./ gr y recuentos altos de 10'000,000 en adelante U.F.C./gr.

AISLAMIENTO;

Se prepararon cajas petri con 100 ml de agar papa dextrosa, para el aislamiento de las cepas fúngicas. Tomando con una asa de platino, una pequeña porción de esporas se inoculó en las cajas petri y se dejaron incubar de 3 a 5 días a una temperatura ambiente.

 IDENTIFICACIÓN;

Se realizó mediante microcultivos, los criterios que se utilizaron para identificar los géneros de hongos productores de micotoxinas se basan en la observación macroscópica de las colonias y la preparación de frotis a partir de microcultivos con el fin de determinar las características microscópica; crecimiento, apariencia y color.

Se preparo el microcultivo colocando en una caja de pretri de 100 x 20 mm. Un cuadro de gasa doble una varilla de vidrio en forma de "V" un portaobjeto desengrasado, un cubre objeto y se esterilizó a 15 libras durante 15 minutos.

Una vez esterilizado se colocó un cuadro de agar papa dextrosa sobre el portaobjeto, se inoculó con la cepa aislada en los cuatro extremos libres del cuadro de agar y se colocó el cubre objeto, se adicionó 10 ml. de agua destilada estéril y se dejó incubar durante 3 a 5 días a una temperatura ambiente.

 TINCION;

Se retiró el cubreobjeto y se colocó una gota de azul de lactofenol sobreponiéndole un portaobjeto limpio y se observó al microscopio para identificar las estructura del hongo.

Se retira el portaobjeto de la caja petri y se desecha el cuadro de agar, se coloca una gota de azul de lactofenol sobreponiéndole un cubreobjeto limpio y se observa al microscopio para identificar las estructuras del hongo (11,18,24).

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA.

EXTRACCIÓN;

La muestra molida se pasó por un tamiz N° 20, se tomaron 50 gr y se depositó en un matraz Erlenmeyer de 500 ml se le adicionó 25 ml de agua destilada y 250 ml de cloroformo, y se colocó en un agitador de muñeca, durante 30 minutos. Se filtró al vacío a través de papel Whatman N° 4, se pasó a un embudo de separación y se obtuvieron 100 ml de cloroformo que se evaporaron en un rotavapor, hasta un volumen de 5 ml, estos se pasaron a purificación en columna.

PURIFICACIÓN;

Empaquetamiento de la columna, en una jeringa de 5 ml de plástico se le introdujo un poco de algodón, seguido de 0.5 gr de sulfato de sodio y 1 gr de silica gel (70 - 230 mallas para cromatografía en columna) y 1.5 gr de sulfato de sodio anhidro, posteriormente se le adicionó el extracto (5 ml). Enseguida se aplicaron los siguientes reactivos 5 ml de éter y 5 ml de una mezcla de cloroformo más metanol (97 + 3 ml) en la cual fueron diluidas las aflatoxinas probablemente presentes. Estos últimos 5 ml se recuperaron y se evaporaron a sequedad.

DETERMINACIÓN;

Para preparar la placa de gel de sílice, se pesaron 30 gr de sílica (sílica gel 60 mallas para cromatografía en capa fina), en vaso de precipitado, se le adicionó, 65 ml de agua destilada, se mezcló y se aplicó, (Equipo de aplicación para cromatografía en capa fina SM) en placas de vidrio de 20 X 20 cm con un grosor de 0.25 mm . Se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 minutos, posteriormente se activaron en un horno a 118°C durante 60 minutos.

PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR;

Los estándares se obtuvieron a una concentración de 10 mcg/ml. Se preparó una solución de transferencia, tomando 50 mcl de aflatoxina B₁, 10 mcl de B₂, 50 mcl de G₁ y 10 mcl de G₂. Se depositaron en un vial y se aforaron a 1000 mcl se llevó un control de peso tanto en el matraz y vial para conservar la misma concentración, se mantuvieron a temperatura de 0°C.

APLICACIÓN DEL EXTRACTO;

La muestra evaporada a sequedad se resuspende con 500 mcl de cloroformo. En una cromatoplaqueta se marcó una longitud entre el punto de aplicación y el frente de solvente de 15 cm. La muestra y el estándar se aplicaron con una jeringa (Hamilton de 10 mcl), colocando sobre la cromatoplaqueta en las siguientes cantidades de 3.5, 5, 6.5 y 6.5 mcl de muestra y 6.5, 3.5, 5, 6.5 y 1 mcl del estándar.

La cromatoplaqueta con la muestra y el estándar, se desarrolló en una cámara con los siguientes solventes; acetona, cloroformo y agua

(30:170:3). La cámara se saturó con papel filtro, se selló la tapa con lubricantes de silicona y se dejó reposar 15 minutos, enseguida se introdujo la cromatoplaca para su desarrollo, hasta que los solventes alcanzaron una altura de 15 cm. Se retiró y se dejó secar a temperatura ambiente. En seguida se observó en un cuarto oscuro a la luz de una lámpara ultravioleta de onda corta.

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA;

Se aplicó la siguiente fórmula substituyendo los valores;

$$\text{Mg/kg} = \frac{(S)(Y)(V)}{(X)(W)}$$

En donde:

S = Microlito de la solución estándar de aflatoxinas, igual a la muestra problema.

Y = concentración del estándar de aflatoxinas (mcg/ml).

V = Microlitos de la dilución final del extracto de la muestra.

X = Microlitos del extracto de la muestra comparada con la intensidad de fluorescencia del estándar de aflatoxinas (**S**).

W = gramos de la muestra aplicadas a la columna.

(19,13,23).

RESULTADOS

La humedad se encontró en un rango de 10.23 a 13.18 % en el alimento concentrado para bovinos (tabla N° 1).

De las 60 muestras obtenidas de alimento para bovino se determinó el recuento de unidades formadoras de colonias en donde se presentaron recuentos altos 2.0 %, moderados 72.3 % y bajos 25.6 %.(Grafica N°1).

Se aislaron e identificaron seis géneros de hongos correspondientes a los siguientes géneros; *Aspergillus spp.* 40.6 %, *Penicillium spp.* 34.0%, , *Mucor spp.* 9.7 %, *Fusarium spp.* 8 %, *Rhizopus spp.* 3.4 % y *Absidia spp.* 3.4 % (Grafica N° 2).

De las 60 muestras el 13.2 % fueron positivas a las cuatro aflatoxinas con los siguientes porcentajes; de B₁, en 45 %, B₂, en 27.27 %, G₁, en 18.18% y de G₂, en 9.09 % .

(Grafica N° 3).

La concentración a la que se encontraron las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ Y G₂ variaron de 16 ppb a 116 ppb (Grafica N° 4).

TABLA N° 1

PORCENTAJE DE HUMEDAD PRESENTES EN ALIMENTO CONCENTRADO PARA BOVINOS.

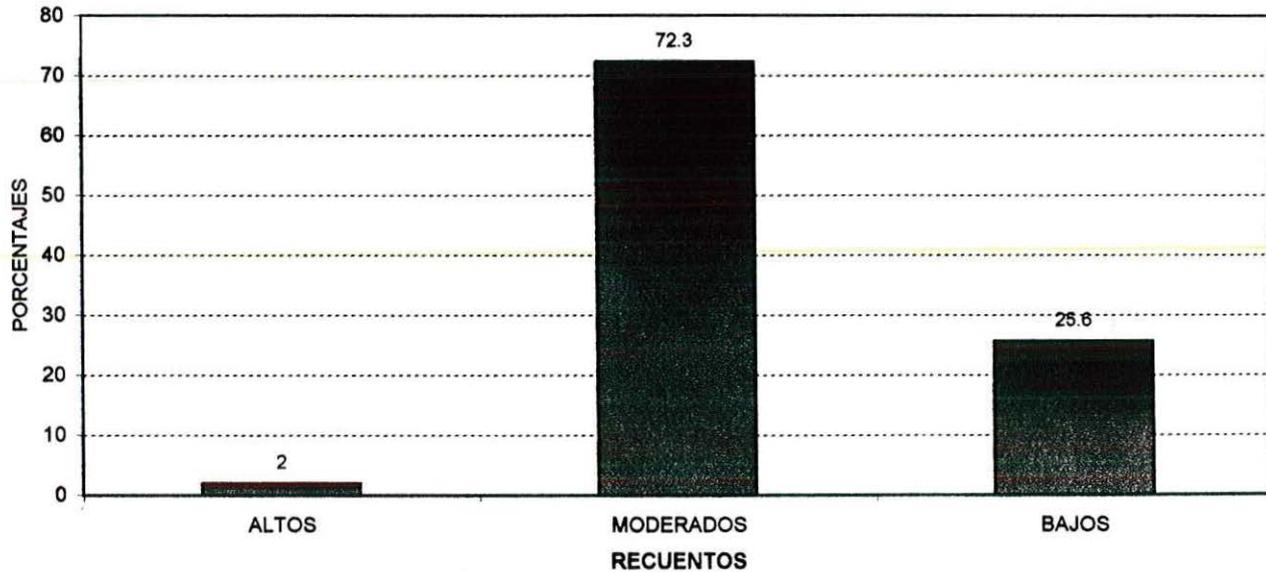
GENEROS
DE HONGOS

PORCENTAJES DE HUMEDAD

%	10.23	10.48	10.76	10.86	10.96	11.2	11.69	11.9	11.92	11.99	12	12.1	12.13	12.85	13.18
<i>Aspergillus</i>	10			3	2	8	6	4	10	2	10	5	6	8	7
<i>Penicillium</i>	4	5	8	8	10	6	6	10	8	3	11	7	5	4	2
<i>Fusarium</i>		6	2				4			1	2	4			
<i>Mucor</i>	2				4						4	1	7	1	4
<i>Rizhopus</i>				2						2	2	2	2		
<i>Absidia</i>		1					2	1			4				

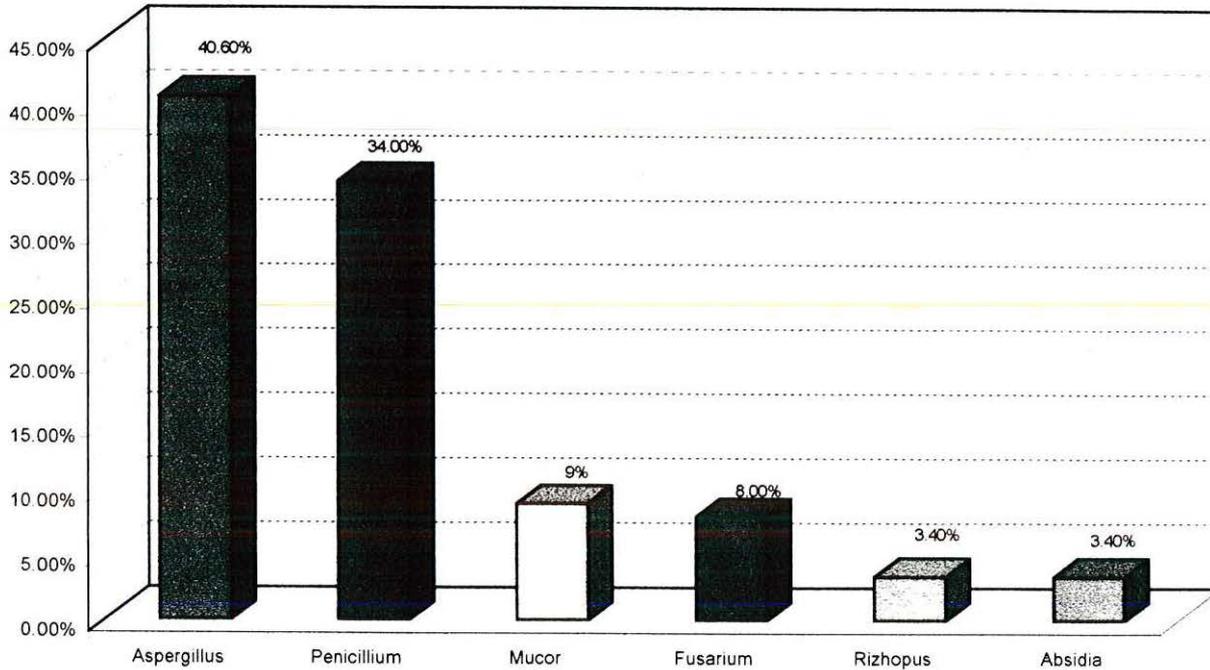
GRAFICA No. 1

**RECUEENTOS DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS EN ALIMENTO
CONCENTRADO PARA BOVINO**



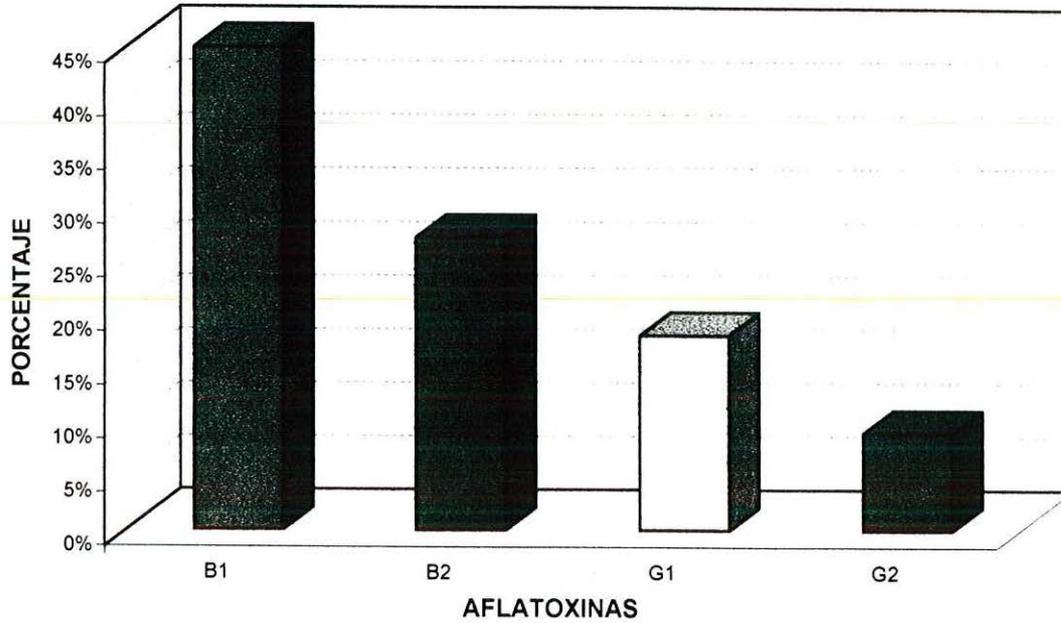
GRAFICA No. 2

FRECUENCIA RELATIVA DE LOS DIFERENTES GENEROS ENCONTRADOS EN EL ALIMENTO CONCENTRADO PARA BOVINO



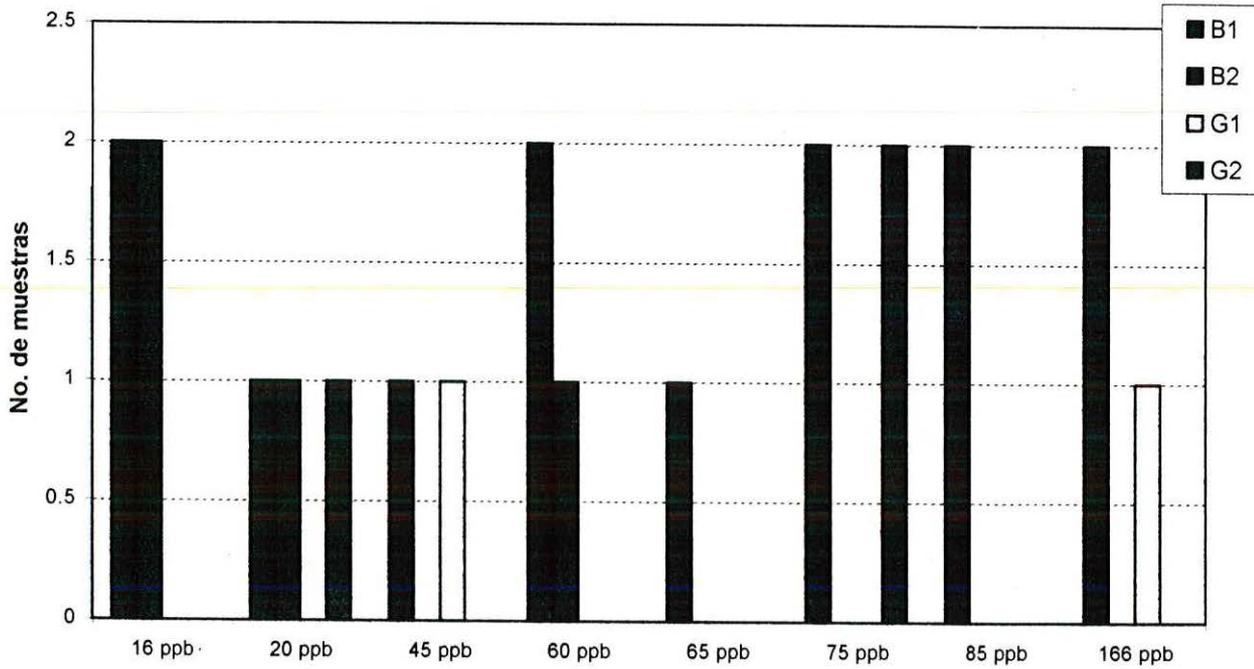
GRAFICA No. 3

PRESENCIA DE AFLATOXINAS EN ALIMENTO CONCENTRADO PARA BOVINOS



GRAFICA No. 4

CONCENTRACION DE AFLATOXINA EN ALIMENTO CONCENTRADO PARA BOVINO



DISCUSIÓN.

La contaminación de alimentos y materias primas con hongos productores de sustancias tóxicas (micotoxinas), es un problema mundial que ocasionan daños en la salud del hombre y los animales.

Se considera a la humedad un factor importante para el crecimiento y desarrollo de hongos. En investigaciones anteriores se ha determinado que la humedad inferior al 13 % presenta un mínimo de desarrollo fungal. Sin embargo se menciona que el *Aspergillus flavus*, se desarrolla a una humedad del 10 al 14 % y que los hongos de campo pueden sobrevivir por años en granos secos, esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo al encontrar muestras de alimento que contenían una humedad de 10.23% al 13.18% (3, 19, 14).

El 100% de las muestras de alimento se presentaron unidades formadoras de colonias, en un 2.0 % de recuentos altos, 72.3 % de recuentos moderados y el 25.6% de recuentos bajos. Los conteos de esporas en alimentos o materias primas pueden servir como un indicador del grado de contaminación con hongos.

En virtud de que algunas especies de hongos tienden a esporular más que otras, es imposible determinar con precisión el nivel de contaminación con hongos basado exclusivamente en el uso de los conteos de esporas. Sin embargo, bajo ciertas condiciones han demostrado ser de utilidad práctica. En estudios anteriores se demuestra que en granos y alimentos presentan casi siempre recuentos altos y moderados comparados con otros. Por lo consiguiente, es importante observar la tendencia que sigue una muestra determinada con respecto a la fuente o con respecto al tiempo (15,16).

Entre las cepas aisladas con potencial de producción de micotoxinas se encontraron; *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* y *Fusarium*, en frecuencias elevadas. La presencia del género *Aspergillus* y *Penicillium* en el alimento para bovinos es considerable. Estos géneros sintetizan las aflatoxinas.

Actualmente, la evidencia que se tiene sobre los diferentes hongos toxigénicos que invaden a los granos indican que los géneros más importantes son; *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* lo cual corresponde a los resultados obtenidos en este estudio, ya que estos tres géneros se presentaron con mayor porcentaje que el resto (14,15).

Se detectaron las 4 aflatoxinas en concentraciones consideradas fuera de norma. Esto concuerda con otros estudios valorados por Rosiles en 1989, en donde determino la presencia de estas micotoxinas en alimentos para bovinos.

Montemayor A., 1993, considera las repercusiones de las aflatoxinas en la salud humana y en la producción animal, puesto que al ser ingerida la aflatoxina B₁ por mamíferos es biotransformada y excretada como aflatoxina M₁ en leche. Asimismo la aflatoxina B₁, también representa un riesgo potencial para la Salud Pública. Como puede observarse es la que se presenta con mayor frecuencia en relación a las tres restantes. Esto concuerda con investigaciones que se llevaron a cabo en ensilado de maíz destinado para el consumo de bovinos (15).

Existen referencias de diversos países sobre la incidencia de aflatoxinas en leche, queso y yogurt, por otro lado en México se desconoce la magnitud del problema (10).

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un rango de humedad de 10.23 % a 13.18 % las cuales favorecen el crecimiento y desarrollo de hongos productores de micotoxinas.
2. Los factores de propagación de unidades formadoras de colonias, se presentaron en su mayor porcentaje como recuentos moderados en un 72.3 % en el alimento concentrado.
3. Las concentraciones de aflatoxinas encontradas son elevadas y se consideran de alto riesgo, lo cual revela el inadecuado manejo de las materia primas o alimentos.

BIBLIOGRAFIA

1. Abramson R.N., Sinha., Mills J.T., 1982., "Mycotoxin formation in moist wheat under controlled temperature", Mycopathology N° 79 Vol 2 Pág. 88-90.
2. Avicultura profesional 1988., "Evaluación cuantitativa del desarrollo de hongos en el alimento y en los granos", El laboratorio Avícola Vol. 6 N° 2, Pág. 40-42.
3. Avila G.E., Shimada A., Lamas G., 1990., "Anabólicos y aditivos en la producción pecuaria"., Sistema de evaluación continua en producción animal en México A.C. Pág. 13-20.
4. Buck William B., 1981., "Toxicología veterinaria clínica y diagnóstico" Ed. Acribia Pág. 222-223.
5. Burroughs M.J., 1986., "Aflatoxina y aflatoxicosis y grandes precauciones para los fabricantes de alimento" ASA/México, Departamento de Ciencias e Industria de los granos de Kansas N° 30 Pág. 1-2.
6. Brinton M.M., 1987., "Some views on the law and the aflatoxins" Technical report N° 13 in a Series Pág. 7-9
7. Campos N. G. E., 1978., "Aflatoxicosis en los animales domésticos"., 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. 7, No. Pág. 29.
8. Castillo T.J., 1989 "Micología general"., Ed. Limusa México., Pág. 38-39.
 9. Cieglera A., Kadis S., 1971., "Microbial toxins"., Vol. 6 Academic 3 New York and London Pág. 17 - 20.
 10. Duarte E.D., Winston M.H., 2000., " Micotoxicosis en Bovinos"., Memorias del XXIV Congreso Nacional de Buiatría. Pág. 51-52.
 11. Fernández Escartin 1981., "Microbiología Sanitaria Agua y Alimentos"., Vol. 1 Universidad de Guadalajara Pág. 109 - 140.
 12. Fraizer W.C., Westhoff D.C., 1993., "Microbiología de los Alimentos"., Ed. Acribia S.A. Zaragoza España Pág. 15-21.
 13. García Aguirre G., 1989., "Manual de métodos para el análisis de micotoxinas en granos"., Universidad Nacional Autónoma de México Pág. 143-64.
 14. Hernández 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 Maestría Universidad de Guadalajara., Pág. 13 -15.
 15. Hernández G. M., Ramírez A. A., Pérez T. E. 2000., " Evaluación del grado de contaminación con aflatoxinas B₁, B₂, G₁ Y G₂ en ensilado

de maíz en la región de Cucula Jalisco., Memorias del XXIV Congreso Nacional de Buiatría., Pág. 353-355.

16. Cervantes Gallardo G. A., Cuevas Licea F.J., 1996., "Identificación y cuantificación de hongos productores de micotoxinas en maíz destinado al consumo animal en la región de Tecalitlan Jal". Tesis de Licenciatura del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Pág. 21 - 26
17. Linder E., 1989., "Toxicología de los alimentos"., Ed. Acribia Zaragoza España Pág. 83-85.
18. Montemayor A., 1993., "Micotoxinas su importancia en salud humana y producción animal"., Agricultura N° 20 Pág. 20-21.
19. Montemayor M.D., 1994., "El muestreo y el análisis en la correcta determinación en su concentraciones en los granos y alimentos"., Agricultura N° 7 Pág. 40-41.
20. Osuna S.O., 1990., "Problemas encontrados en él diagnóstico de micotoxicosis muestreo, métodos analíticos y referencias científicas"., Universidad de Colombia Pág. 18-21.
21. Peña D.S. Duran de Bazua M. C., 1990., "Efecto toxico de las aflatoxinas en la dieta"., Ciencia y Desarrollo Vol. 16, N° 94, Pág. 61-64.
22. Romo D.T., 1992., "Resultados de investigación sobre ingredientes, micotoxinas, equipos y enfermedades"., Veterinaria Avipecuaria, Año 5, N° 59, Pág. 41 - 42.

23. Rosiles M.R., 1991., " Consideraciones generales sobre algunas micotoxinas"., Memorias del primer curso de actualización sobre micotoxicología Pág. 37-40.
24. Williams Sydney., 1984., "Official methods of analysis of association of official analytical chemist"., Chapter 26.
25. Wyatt R.D., 1990., "Importancia de los hongos en la salud aviar"., Avicultura profesional Vol. 8 N° 2 Pág. 45-50.

TESIS/CUCBA