

EFFECTO DE LAS MICOTOXINAS EN LA PRODUCCION PECUARIA Y ALTERNATIVAS DE SOLUCION CON PRODUCTOS DERIVADOS DE LAS LEVADURAS.

René Neftalí Márquez Márquez y Dante González Salazar.

Cenid-Microbiología-INIFAP.

Carretera México-Toluca, Km. 15.5, Palo Alto, Cuajimalpa D.F. C.P. 05110

marquez@micro.inifap.conacyt.mx

**Presentado en el V Seminario Internacional de Microbiología Aplicada a la
Nutrición Animal, Guadalajara, 2002**

INTRODUCCION:

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos producidos por diversas especies de hongos, tales como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Claviceps*, entre otros. Algunos de ellos pueden infestar a los cultivos en el campo y producir grandes cantidades de micotoxinas como Fumonisinias y Aflatoxinas, las condiciones de estrés climático y la presencia de plagas en los cultivos favorece la producción de dichas micotoxinas. Por otro lado, las malas prácticas de cosecha, secado y transportación del grano que conllevan al deterioro físico del grano debido a la fragmentación, sobrecalentamiento, así como las condiciones altas de humedad dentro de los silos, el maltrato de los granos durante el transporte y almacenaje y la presencia de plagas de insectos y roedores, son solo algunos de los numerosos factores que favorecen el crecimiento de hongos toxigénicos.

Entre los cientos de micotoxinas identificadas y caracterizadas químicas y toxicológicamente se encuentran: Las Aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2), Acido Fusárico, Toxina T-2, Fumonisinias (A1 y B1), Ocratoxinas (AyB), Deoxinivanelol, Diacetoxiscirpenol, HT-2, Nivanelol, Fusarenona X, Fusarocromanona, Citrinina, Oosporeina, Acido Ciclópiazonico, Ergotoxina, Zearalenona, etc.

La contaminación con alguna o con la combinación de varias micotoxinas (generalmente con un efecto sinérgico), de los granos y alimentos destinados a la alimentación pecuaria, pueden ocasionar intoxicaciones agudas y principalmente de tipo crónico en los animales consumidores, provocando efectos negativos en los parámetros productivos y reproductivos, causando anualmente pérdidas por cientos de millones de dólares en todo el mundo debido a los efectos detrimentales que tienen sobre la producción pecuaria. Uno de los problemas más graves de las micotoxicosis es la presentación subclínica, es decir la ingestión de alimentos contaminados con bajas dosis de toxinas que se van acumulando en los órganos y

tejidos del animal y que pueden pasar desapercibidos por la ausencia de signos o lesiones evidentes. Sin embargo esta intoxicación crónica tiene graves efectos sobre el estado de salud de los animales, disminuyendo su capacidad inmunológica, y mermando el potencial reproductivo, también puede ocasionar pérdidas por el castigo de precio o incluso decomiso de canales e aves por la presencia de hemorragias subcutáneas en piernas, alas, pechuga, etc. debido a la fragilidad capilar y por lo tanto la susceptibilidad a las mallugaduras por el efecto crónico y acumulativo de las aflatoxinas.

Niyo y col. (1989) y Waller y William (1996) describieron que el 25% de las cosechas de alimento del mundo están contaminadas con micotoxinas. Sin embargo, la ocurrencia y la concentración de la contaminación de las micotoxinas, tienen variaciones anuales, estacionales, varían de ingrediente a ingrediente y de región a región.

En algunas regiones de los Estados Unidos de América y en el Norte de México (Tamaulipas) han ocurrido en las dos últimas décadas varios casos de contaminación generalizada de cosechas de maíz y sorgo con aflatoxinas. Las pérdidas económicas causadas por la contaminación de aflatoxina son difíciles de calcular debido a la naturaleza ocasional de las ocurrencias. Sin embargo, en 1983, Nichols estudió las contaminaciones de 1977 y 1980, para ocho estados de la región sudeste, estimando las pérdidas de cerca de \$260 millones en 1977 y cerca de \$317 millones, combinando en 1980 para productores de maíz, granjeros de cerdo y de aves en esa región. En 1989, Niyo estimó también que los Estados Unidos de América rechazan anualmente cantidades significativas de granos por la contaminación con hongos y micotoxinas. En la cosecha 1979-80 en los Estados Unidos de América rechazaron \$206 millones en el grano contaminado y en la del año 1980-81 rechazaron \$254 millones de grano contaminado.

En 1988, Phillips y otros investigadores, publicaron lo que muchos consideran el trabajo pionero de adsorbentes de toxinas, al usar minerales de alta afinidad adsorbente para inmovilización *in vivo* e *in vitro* de aflatoxinas. Después de esta publicación ha habido informes en el uso de estos minerales adsorbentes relacionados para adsorber las aflatoxinas y disminuir sus efectos negativos en varias especies animales. En 1988, Phillips et al., en 1990 Kubena et al., en 1992 Araba et al y Wayatt et al en 1992, estudiaron la adsorción de aflatoxinas en dietas para aves. En 1989, Harvey et. Aly en 1990 Lindemann et al., estudiaron la aflatoxicosis en cerdos. En 1990, Harvey y Davee estudiaron la aflatoxicosis en vacas lecheras. En 1991 Harvey y colegas estudiaron el efecto tóxico de las aflatoxinas en ovejas. Todos estos estudios se enfocaron en la eficacia de varios minerales inorgánicos de sílice contra un desafío de aflatoxina, solo fue en 1990 y 1990 que Kubena et al. enfocaron sus trabajos hacia otras micotoxinas.

EVALUACION DE LA EFICIENCIA DE ADSORCIÓN *in vitro* DE LA AFLATOXINA B1, TOXINA T-2, OCRATOXINA A, DEOXINIVALENOL, FUMONISINA B1 Y ZEARALENONA, DE PRODUCTOS FORMULADOS A BASE DE GLUCANMANANOS DE LA PARED CELULAR DE UNA CEPA DE *Saccharomyces cerevisiae*. Y CON LA COMBINACIÓN INNOVACIONES TECNOLOGICAS.

OBJETIVO:

Evaluar la eficiencia del Safmannan en la adsorción de las micotoxinas: Aflatoxina B1, Toxina T-2, Ocratoxina A, Deoxinivalenol, Fumonisina B1 y Zearalenona, de 2 productos elaborados con Glucanmananos de *S. cerevisiae*, a través de un modelo de Adsorción y Desorción *in vitro*, simulando las condiciones del jugo gástrico de pollo.

MATERIAL Y METODOS:

Se sembraron individualmente las cepas micotoxigénicas de *Aspergillus parasiticus*, *A. ochraceus*, *Fusarium tricinctum*, *F. moniliforme* y *F. roseum*, *F. graminearum* por el método de puntos separados en cajas petri con medio de cultivo Czapek-Dox, se incubaron durante 15 días a 28°C para la obtención de esporas. Las esporas se cosecharon con la adición a la caja petri de 10ml de Solución Salina con 1% de Tween 80, para lograr una buena dispersión. Se utilizaron 6 lotes de 5Kg de maíz proveniente de una cosecha única en cuya producción no se utilizaron pesticidas. Se lavaron con agua corriente para eliminar el polvo y otros contaminantes agrícolas, así como los granos defectuosos o fragmentados. Se realizó un lavado final con agua destilada. Cada lote se colocó en frascos Pyrex con tapones de gasa y algodón y se esterilizaron en autoclave a una presión de 1.3Kg/cm² durante 1h. Posteriormente se inoculó el maíz de cada lote con 10.4 X 10⁸ esporas /Kg de cada cepa, agregando a c/ frasco 100ml de solución salina al 0.85%. Se incubaron a temperatura ambiente durante 6 semanas, rodando diariamente los frascos para favorecer las condiciones aeróbicas de cultivo y un crecimiento homogéneo del hongo sobre el sustrato. Finalmente se esterilizó el maíz contaminado bajo las condiciones anteriormente descritas para destruir las esporas de los hongos y se cuantificó el contenido de micotoxinas.

PROCEDIMIENTO:

Cada lote de maíz contaminado con las micotoxinas correspondiente, se colocaron sobre charolas individuales para su secado en una estufa de aire forzado a 50°C durante 72 horas, posteriormente se molieron en un molino Willey, se ajustaron las concentraciones de las micotoxinas preestablecidas con maíz sin contaminar a los niveles de: Aflatoxina B1 200 g/Kg Toxina T-2 300 g/Kg, Ocratoxina A 400 g/Kg, Deoxinivalenol 800 g/Kg., Fumonisina B1 2,000 g/Kg y Zearalenona 1,200 g/Kg. Se evaluó el Safmannan a la dosis recomendada de 1Kg/ton. Se realizaron extractos metanólicos del maíz contaminado con cada micotoxina y se colocaron

por triplicado, en matraces Erlenmeyer con una capacidad de 250ml, y se les adicionaron 50ml de una solución (1,250 UI de pepsina + 150 mEq de HCl). Se incubaron en un baño María con una temperatura de 37°C y con agitación constante durante 3 horas. Posteriormente se centrifugó el contenido de cada matraz, y se cuantificó el contenido de cada micotoxina en el sobrenadante. Para el ensayo de desorción, se utilizaron las mismas condiciones anteriormente descritas, utilizando un tiempo adicional de 3 horas más de incubación, para cuantificar los niveles de micotoxinas desadsorbidas. Para realizar la cuantificación de las micotoxinas se ajustó el pH.

RESULTADOS:

Tabla # 1 (%) de Adsorción:

MUESTRA	AFB1 200ppb	T-2 300ppb	OA 400ppb	ZEAR. 1200ppb	DON 800ppb	FB1 2ppm
SafmannanMR	96.22	33.51	25.17	43.75	78.43	89.33

Tabla # 2 (%) de Desorción:

MUESTRA	AFB1 200ppb	T-2 300ppb	OA 400ppb	ZEAR. 1200ppb	DON 800ppb	FB1 2ppm
SafmannanMR	3.45	6.00	4.04	8.45	5.83	3.05

Tabla # 3 (%) de Eficiencia de Adsorción:

MUESTRA	AFB1 200ppb	T-2 300ppb	OA 400ppb	ZEAR. 1200ppb	DON 800ppb	FB1 2ppm
SafmannanMR	92.77	27.51	21.13	35.30	72.60	86.28

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DETOXIFICADORA In situ DE ZEARALENONA POR LA ADICIÓN DE SAFMANNAN.

OBJETIVO:

Evaluar la capacidad de acción detoxificadora in situ de la zearalenona contenida en un sorgo contaminado naturalmente con altos niveles de zearalenona (4,375 ppb) por la adición de Safmannan.

MATERIAL Y METODOS:

Se molió una muestra de 10Kg de sorgo contaminado de manera natural con zearalenona en un molino Wiley, utilizando una criba de 2mm para homogeneizar la muestra y el contenido de la micotoxina, así como para incrementar el área de contacto con el producto Safmannan que se adicionó a una dosis de 1g/Kg. Cada

tratamiento se colocó en bolsas de polietileno y se mezclaron durante 15 minutos y se dejaron a temperatura ambiente y se enviaron las muestras codificadas a un laboratorio comercial con amplia experiencia en el análisis cromatográfico de micotoxinas. El testigo fue el alimento contaminado sin ningún tratamiento secuestrante.

RESULTADOS:

TRATAMIENTOS	Zearalenona (ppb)		(%) DE REDUCCIÓN
	X	± D.E.	
Testigo	4375.0	277.0	--
Safmannan	2085.0	261.77	52.34

Evaluación *in vivo* de la capacidad inhibitoria de las micotoxicosis en aves alimentadas con dietas contaminadas con Aflatoxinas, Ocratoxina A y Toxina T-2 con la adición de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y con MOS.

RESUMEN

Se utilizaron 60 pollos de un día en un diseño 4X5X3: Control Negativo, Testigo Positivo dieta con 282µg/Kg Aflatoxinas, 290 µg/Kg Ocratoxina-A y 6,300 µg/Kg de T-2, 2g/Kg de levaduras + micotoxinas, 1g /Kg glucomananos (MOS) + micotoxinas, 5 aves por tratamiento y 3 repeticiones, durante 1 mes. Las ganancias de peso fueron: 592g Control Negativo (100%), Testigo Positivo 314g (57%), con levaduras 533g (90%) y con MOS 599g (101%). Hubo severas lesiones en hígado, intestinos, proventrículo, timo, bursa, lengua y mucosa oral en los testigos positivos, mientras que con la adición de levaduras o MOS el grado de lesiones disminuyó. Los órganos linfoides presentaron una severa depleción celular en las aves del tratamiento testigo positivo, además de los títulos más bajos de anticuerpos contra Newcastle. Este efecto fue menor en las aves de los tratamientos tanto con levaduras como con MOS.

OBJETIVO:

Determinar la capacidad de inhibición de la toxicidad producida por la acción sinérgica de la micotoxinas Aflatoxinas, Ocratoxina A y Toxina T-2 en un modelo *in vivo* con pollos de engorda alimentados con dietas contaminadas y adicionadas con secuestrantes comerciales de micotoxinas formulados a base de Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) de paredes celulares de levaduras (MOS – MOS), o una mezcla de MOS y Polímeros de Carbohidratos”.

MATERIAL Y METODOS:

1).- Se realizaron cultivos de cepas micotoxigénicas (*Aspergillus parasiticus*, *A. ochraceus* y *Fusarium tricinctum*) en un sustrato de maíz estéril, durante 8

semanas para la producción de las micotoxinas: Aflatoxinas Ocratoxina A, y Toxina T-2.

2).- Se elaboraron dietas equiproteicas y equienergéticas con el maíz contaminado para los tratamientos y el testigo positivo y con maíz sin contaminar para el control negativo.

3).- Se realizó un diseño factorial 5 X 5 X 3 donde los factores fueron: 5 Tratamientos, 5 aves por tratamiento y 3 repeticiones. Se utilizaron pollos de la estirpe Ross de un día de edad, se alojaron en una criadora Petersime con control eléctrico de temperatura y se alimentaron con una dieta comercial de iniciación y agua potable a libre acceso, durante una semana y se realizó un esquema de vacunación de la siguiente forma:

VACUNA	PERIODO Y VIA DE APLICACIÓN
Influenza Aviar	Vacuna Virus-Inactivado al día 1° de edad
Enfermedad de Newcastle	Vacuna Emulsionada SC al día 7° de edad
Enfermedad de Newcastle	Virus vivo gota ocular al día 7° de edad

DISTRIBUCION DE TRATAMIENTOS:

TRATAMIENTO	MICOTOXINAS (mg/Kg)						SECUESTRANTE (Kg/Ton.)
	AB1	AB2	AG1	AG2	OA	T-2	
1).- CONTROL (-)	0	0	0	0	0	0	0
2).- TESTIGO (+)	55	205	10	12	290	6,300	0
3).- LEVADURAS	55	205	10	12	290	6,300	2 Kg (<i>S. cerevisiae</i>)
4).-MANANOS	55	205	10	12	290	6,300	1Kg Mananoligosacáridos

Los animales se alimentaron con las dietas experimentales durante 4 semanas y se cuantificaron los siguientes parámetros: ganancia de peso semanal, mortalidad, calidad del emplume, lesiones orales y malformaciones de patas, presentación de heces acuosas o sanguinolentas, títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle. Se colectaron muestras de tejido de hígado, riñón, corazón, proventrículo, bolsa de Fabricio, timo, asa duodenal y medula ósea para llevar a cabo los análisis histopatológicos correspondientes.

RESULTADOS:**A).- Ganancia de peso semanal (g)**

Tratamientos	Semana 0 X ± D.E.	Semana 1 X ± D.E.	Semana 2 X ± D.E.	Semana 3 X ± D.E.	Ganancia Total
Control (-)	139.28 ^a 10.81	322.66 ^a 29.8	499.2 ^a 52.70	731.06 ^a 65.03	591.78 ^a
Testigo (+)	151.70 ^a 13.15	315.03 ^a 38.82	385.17 ^b 63.86	492.29 ^b 97.06	340.59 ^b
S. cerevisiae	149.50 ^a 16.24	311.57 ^a 36.42	446.80 a,b 61.24	683.25 ^a 95.75	533.75 ^a
Mananos	145.42 ^a 14.87	300.23 ^a 47.94	509.00 ^a 76.61	745.00 ^a 100.70	599.58 ^a

Literales diferentes en las columnas indican significancia estadística entre los Tratamientos (p<0.05) ANDEVA.

Tratamientos **% De Ganancia de Peso
en relación al control (-)**

1 Control (-)	100.00
2 Testigo (+)	57.55
3 S. cerevisiae	90.19
4 Mananos	101.32

B).- Mortalidad.

TRATAMIENTO	Semana 1	Semana 2	Semana 3
1 TESTIGO (-)	0	0	0
2 CONTROL (+)	0	2	3
3 S. cerevisiae	0	0	0
4 MOS	0	0	0

C).- Hallazgos a la Necropsia (5 aves/tratamiento).

TRATAMIENTO	Descripción de Lesiones Macroscópicas
1 TESTIGO (-)	Hígado graso 1/5.
2 CONTROL (+)	Hígado graso 5/5, riñones hiperémicos, múltiples úlceras en

	el paladar y base de la lengua, bursa de Fabricio y timo hipoplásicos, intestinos hiperémicos y con las paredes engrosadas, úlceras en proventriculo, hemorragias musculares en pechuga, piernas y rabadilla 4/5
3 <i>S. cerevisiae</i>	Hígado graso 2/5, leves hemorragias musculares y úlceras pequeñas en el paladar y base de la lengua 2/5.
4 MOS	Hígado graso 1/5, leves hemorragias musculares 1/5, úlceras en paladar y base de la lengua 2/5.

Estudios

histopatológicos:

En los tejidos provenientes de las aves alimentadas con las dietas contaminadas con y sin la adición de levaduras o MOS se observaron diferentes grados de lesiones, por lo cual fue necesario establecer un sistema para cuantificar la severidad del daño histopatológico.

DESCRIPCION DE LAS LESIONES:

HIGADO: Hepatocitos hinchados, pérdida de la estructura de los cordones hepáticos, vacuolización del citoplasma (cambio graso), proliferación de conductos biliares, en algunas zonas se observa muerte celular.

BAZO: Depleción linfoide periarteriolar.

BOLSA DE FABRICIO: Depleción linfoide en la zona medular y cortical.

PROVENTRICULO: En una zona de la mucosa y submucosa se observa un moderado infiltrado de células inflamatorias constituidas por heterófilos y linfocitos, así como zonas de necrosis.

INTESTINO DELGADO: Aparente proliferación de las células de las vellosidades intestinales.

RIÑÓN: En los túbulos se observan células epiteliales hinchadas y el citoplasma moderadamente vacuolado, algunas zonas presentan necrosis de células epiteliales, así como una moderada cantidad de material proteínico en la luz de algunos túbulos.

TRATAMIENTO	GRADO DE LESION
1 TESTIGO (-)	(-) NORMAL
2 CONTROL (+)	(++++) SEVERO
3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(+++) MODERADO
4 MOS	(++) LEVE

D).- Títulos de anticuerpos contra la Enfermedad del Newcastle por Inhibición de la Hemoaglutinación en placa.

TESTIGO NEGATIVO	CONTROL POSITIVO	T-16 <i>S. cerevisiae</i>	T-17 MANANOS
2560	1280	1280	2560
2560	640	1280	1280
1280	640	640	1280
2560	640	1280	1280
2560	640	1280	2560
2304a ± 512	768d ± 256	1152c ± 256	1792b ± 627

Literales diferentes en las columnas indican significancia estadística entre los Tratamientos (p<0.05) ANDEVA.

DISCUSION Y CONCLUSIONES:

Los efectos de la toxicidad acumulativa de las micotoxinas, se observaron a partir de la segunda semana de alimentación de las aves con las dietas experimentales contaminadas y sin la adición de levaduras o MOS, ya que a partir de ese período presentaron una ganancia de peso significativamente menor al resto de los tratamientos y también aparecieron las primeras lesiones ulcerativas en paladar y la necrosis en la base de la lengua en la mayoría de las aves de dicho grupo.

Los resultados de la ganancia de peso, indican que los niveles de contaminación de micotoxinas utilizados en diseño experimental ocasionaron una pérdida de peso de más del 40% en los animales del tratamiento denominado testigo positivo, mientras que al adicionar a las dietas contaminadas una dosis de 2g/Kg. de Levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) las aves obtuvieron una ganancia de peso final del 90.2% respecto la ganancia del control negativo, lo que representa un efecto importante de protección a la micotoxicosis. De manera similar el resto de los grupos presentaron ganancias de peso estadísticamente similares a las del grupo de animales alimentados con dietas sin contaminar.

La necropsia de las aves reveló que a pesar de que el peso corporal de los animales con dietas conteniendo levaduras o MOS era similar al grupo control negativo, se presentaron algunas lesiones ulcerativas en el paladar, zonas de necrosis en la lengua, úlceras en proventrículo, riñones congestionados e hígados grasos, lesiones que variaban ampliamente entre los grupos e incluso entre las aves del mismo grupo. El análisis microscópico de los tejidos confirmó que las lesiones más severas se obtuvieron en las aves que consumieron la dieta contaminada y sin secuestrante de micotoxinas, mientras que en el grupo control negativo prácticamente no se observaron alteraciones histopatológicas, y en las

aves del tratamiento con levaduras se observaron lesiones en diversos tejidos que se clasificaron como moderadas, es importante señalar que la magnitud de las lesiones disminuyó considerablemente con la adición de MOS a las dietas contaminadas.

Los órganos linfoides que se analizaron microscópicamente (timo y bursa de Fabricio) presentaron una severa depleción en las aves del tratamiento testigo positivo, aunado a que presentaron los títulos más bajos de anticuerpos contra la Enfermedad del Newcastle, lo que significa una inmunodepresión tanto celular como humoral. Este efecto se vio significativamente disminuido en las aves de los tratamientos adicionados con levaduras y MOS, presentando el mejor efecto inhibitorio de la inmunosupresión por micotoxicosis en las aves que se les adicionó a la dieta 1.0 g/Kg. de MOS.

REFERENCIAS

- 1).-Brake J., P.B. Hamilton, and R.S. Kittrell. Effects of the Trichothecene Mycotoxin Diacetoxyscirpenol on Feed Consumption, Body Weight, and Oral Lesions of Broiler Breeders. . Poultry Science 79:856-863. 2000
- 2).-Chorvatoricová D., Machova E., Sandula J., Kogan G. Protective effect of the Yeast glucomannan against cyclophosphamide-induced mutagenicity. Mut. Res. 444:117-122. 1999.
- 3).-Ma. Y., Vemura K., Oka S., Kezutsumi Y., Kawasaki T. . Antitumor activity of mannan-binding protein *in vivo* as related by a virus expression system: mannan-binding protein dependent cell-mediated cytotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 371-375. 1999
- 4).-Osborne D., Huff W., Hamilton P., Burtmeister H. Comparison of ochratoxin aflatoxin and T-2 toxin for their effects on selected parameters related to digestion and evidence for specific metabolism of carotenoides in chickens.Poult. Sci. 61:1646-1652. 1982
- 5).-Stanley V., Ojo R., Woldesenbet S., Huitchinson D. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. Poult. Sci. 72:1867-1872.1993
- 6).-Wagnerova J., Liskova A., Navarova J., Kristofova A., Trnovec T., Ferencik M. The effect of two glucan carboxymethyl derivates with various substitution degrees on cyclophosphamide immunosuppression in mice. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 15:227-242. 1993