

INFLUENCIA DE CONDICIONES AMBIENTALES EN LA CONTAMINACION DE PIENSOS CON *ASPERGILLUS FLAVUS*.

(INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON THE CONTAMINATION OF FODDER WITH *ASPERGILLUS FLAVUS*).

por

MANUELA JODRAL VILLAREJO*

Las aflatoxinas representan un problema a nivel internacional; concretamente, la FAO (1976) recomienda e incluye en sus programas de investigación (Programa de las Naciones Unidas para el medio ambiente) el estudio de las condiciones ambientales que determinan la producción de aflatoxinas y la contribución a resolver los problemas analíticos de identificación y estimación cuantitativa de las aflatoxinas. Respuesta, en parte, a este interés, es el tema de nuestro trabajo, en el cual estudiamos las condiciones ambientales de temperatura y humedad relativa de Córdoba.

Hemos estudiado algunos trabajos realizados hasta el momento sobre el tema de las condiciones ambientales (temperatura y humedad relativa) que nos han servido de base a nuestro trabajo. Galloway (1935) clasificó *A. flavus* como un hongo mesófilo y que requiere para crecer entre 80 y 90 p. 100 de humedad relativa. Para Diener y col. (1966, 1967) la formación de aflatoxinas se produce cuando la temperatura se encuentra entre 35° C y un mínimo de $13 \pm 1^\circ$ C, y la humedad relativa, entre 85-90 p. 100. Schindler (1977) concluye que cuando la temperatura ambiental está entre 41° C y $46 \pm 1^\circ$ C la producción de aflatoxinas es totalmente nula.

I) *Material y métodos para la contaminación experimental de piensos por A. flavus.*

Material problema: alfalfa recién cortada, algarroba (vainas sin semilla de *Ceratonia siliqua* L.), maíz, cebada, orujo de aceituna (deshuesado y extractado), harina de alfalfa, colza (torta de semilla), girasol (torta de semilla decorticada) y torta de cacahuete).

* Departamento de higiene, inspección y microbiología de los alimentos. Facultad de veterinaria. Sección de bromatología del Instituto de zootecnia del Consejo superior de investigaciones científicas. Universidad de Córdoba (España).

Recibido para publicación el 20-10-79.

JODRAL VILLAREJO, M.: CONDICIONES AMBIENTALES *ASPERGILLUS FLAVUS*

Patrones de aflatoxinas B₁, B₂, G₁, y G₂ (Makor Chemicals Ltd. Jerusalén, Israel).

Cepas: *Aspergillus flavus*, raza número Pep-70-1h (A.T.C.C. 24104).

Aspergillus flavus, A.T.C.C. 15517.

Los piensos eran sometidos a la prueba orientativa propuesta por Whitten (1969) para determinar la presencia o ausencia de aflatoxinas; los libres de aflatoxinas eran utilizados para la investigación.

De cada pienso, dos muestras fueron esterilizadas a 120° C durante 15 minutos y las otras no, con el fin de poder estudiar otro factor importante: la influencia de la competencia bacteriana en la formación de aflatoxinas. Las pruebas se realizaron por duplicado y se contaminaron los piensos con esporas de *A. flavus* 15517 y de *A. flavus* Pep-70-1h, siguiendo la metodología del cuadro 1.

II) *Determinación de aflatoxinas en los piensos contaminados.*

II.1) Prueba orientativa. Hemos utilizado la propuesta por Whitten (1969). En caso de sospechar la presencia de aflatoxinas se realiza la prueba presuntiva.

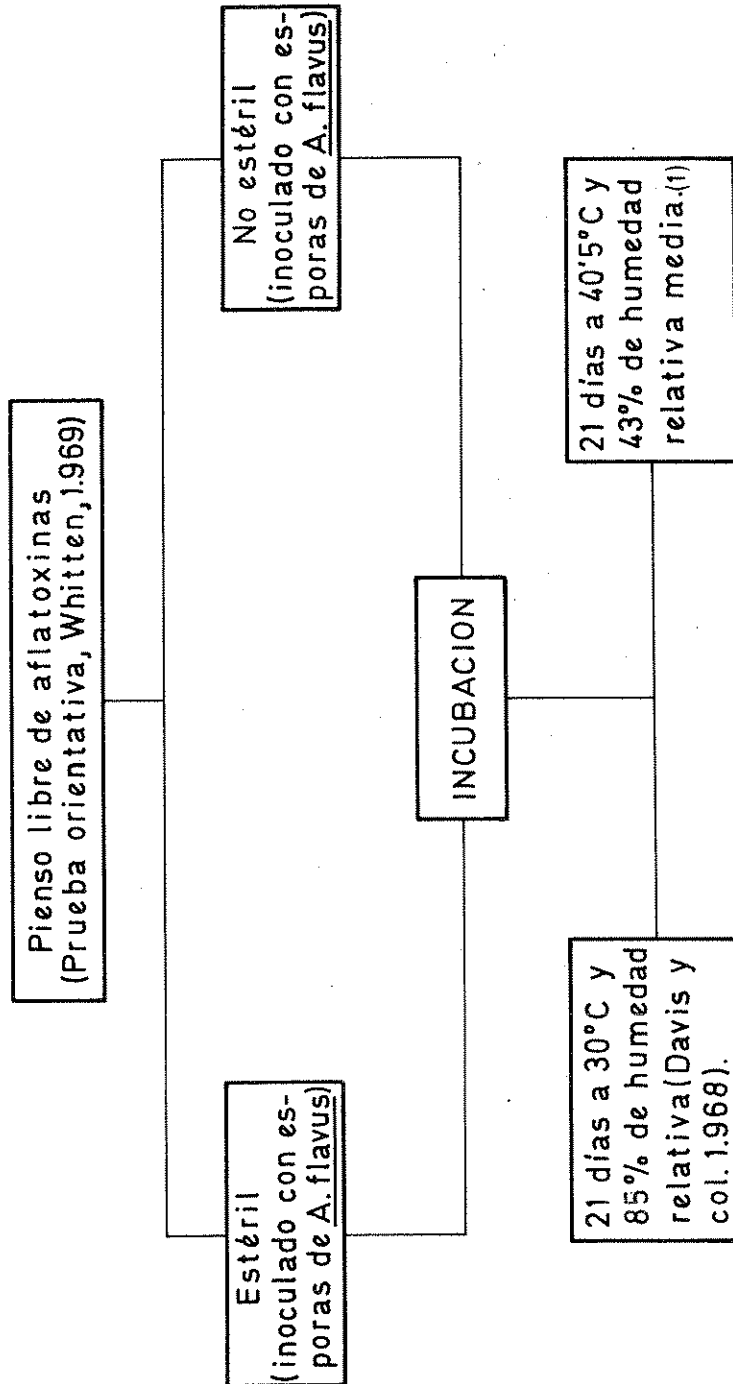
II.2) Prueba presuntiva. Seguimos el método propuesto por el Aflatoxin Methodology Working Group (1965), modificado por Marth (1967), siguiendo los pasos propuestos por Pons y col. (1975), con modificaciones propuestas por Gimeno (1977) e introducidas por nosotros, que consisten en realizar una cromatografía previa con éter de petróleo haciendo correr el frente hasta 13 cm de altura, desde donde se puso la muestra, y después de secar la placa se realiza la cromatografía con una mezcla de metanol en cloroformo al 7 p. 100 hasta que el solvente alcance una altura de 10 cm desde el lugar donde se colocó la muestra. La cuantificación objetiva de las aflatoxinas en las placas de cromatografía se realizó mediante la utilización de las ecuaciones de las líneas de regresión de las aflatoxinas del grupo B y G (Jodral y Herrera, 1979). Para confirmar la presencia de aflatoxinas en las placas de cromatografía se recurre a las pruebas confirmativas.

II.3) Pruebas confirmativas. Hemos utilizado dos pruebas confirmativas de tipo químico. La primera, propuesta por Smith y col. (1962) para la identificación de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂ cuadro 2 y la propuesta por Pohland y col. (1970), para la identificación de aflatoxina B₁.

Resultados y discusión.

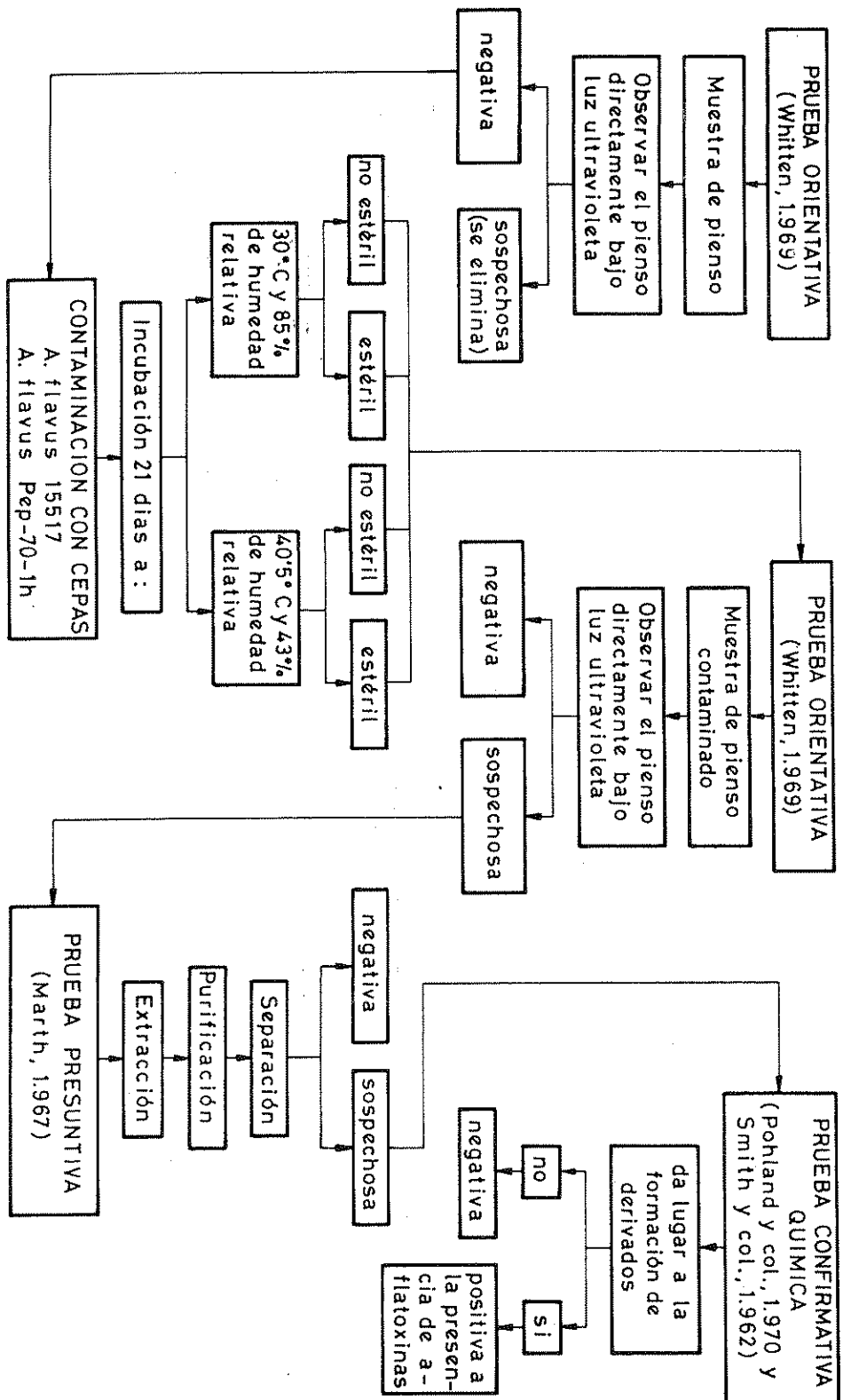
Los resultados obtenidos aparecen en las tablas I, II, III y IV.

En nuestras experiencias de contaminación artificial hemos podido comprobar que cuando los cultivos están esterilizados la producción de aflatoxinas es mayor; en lo que coincidimos con Davis y col. (1968), aunque existen discrepancias a este



Cuadro I. Metodología de la contaminación experimental de piensos por *A. flavus* 15517 y *A. flavus* Pep- 70-1h.

(1) NOTA La temperatura máxima media y y humedad relativa media correspondiente a los 21 que duró la investigación en Córdoba.



Cuadro 2. Metodología de la investigación de aflatoxinas del grupo B y G en piensos.

respecto (Lucisano y col., 1972). Para Schroeder y col. (1965) el rendimiento más bajo en los medios no esterilizados se debe sin duda a la competencia que tienen por el substrato las bacterias y hongos con el *A. flavus*.

La cepa *A. flavus* Pep-70-1h, según Schroeder y col. (1973), es esencialmente productora de aflatoxina B₂, aunque puede en algunos casos producir las aflatoxinas B₁, G₁ y G₂; en la harina de alfalfa hemos podido comprobar la producción de las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

El cacahuete y sus derivados, en este caso la torta de cacahuete, son sin duda el medio más idóneo para la producción de aflatoxinas, sin embargo apreciamos con gran sorpresa que en algunos la producción era extremadamente baja e incluso negativa. Repetimos nuestras investigaciones y se confirmaron los resultados anteriores. Waltking (1970) lo explica por la descomposición de las aflatoxinas en la torta de cacahuete y por la acción de la luz durante el análisis de este alimento, como sucede también en otros alimentos.

En las diversas condiciones experimentales la formación de aflatoxina es nula en la algarroba (valvas sin semilla) y alfalfa recién cortada; no conocemos citas bibliográficas sobre estos alimentos, pero Widman y col. (1967) consideran que la ausencia y bajo rendimiento en aflatoxinas se puede deber a la falta de proteínas y de nitrógeno en el substrato; en la algarroba y alfalfa tanto la proteína como el nitrógeno no proteico están en poca cantidad.

Como se puede apreciar, el rendimiento es bajo en aflatoxinas en todos los alimentos a la temperatura media ambiente en que realizamos nuestra experiencia: 40'5° C y 43 p. 100 de humedad relativa media. Diener y col. (1966) fijan la temperatura óptima para la producción de aflatoxinas entre 25 y 30° C; y entre 85 y 90 p. 100, de humedad relativa. Nuestras condiciones experimentales medias han estado en los límites y las individuales han sobrepasado a éstas, haciendo casi nula la producción de aflatoxinas; lo que coincide con Schindler (1977), en su trabajo, en el cual, cuando la temperatura está entre 41 y 46 ± 1° C, la producción de aflatoxinas es nula.

La humedad relativa baja y la temperatura alta de los meses en los cuales se conservan los piensos para las épocas en las cuales faltan, hacen que la producción de aflatoxinas en nuestra zona sea muy baja o nula.

Resumen.

Se ha realizado una contaminación experimental de piensos utilizando las cepas *A. flavus* 15517 y *A. flavus* Pep-70-1h, productoras de aflatoxinas del grupo B y G, con la finalidad de conocer la posible influencia de la temperatura y humedad rela-

tiva de la zona de Córdoba en la producción de aflatoxinas. Los piensos que se han contaminado han sido: alfalfa recién cortada, algarroba (valvas sin semilla), maíz, cebada, orujo de aceituna (deshuesado y extractado), harina de alfalfa, colza (torta de semilla), girasol (torta de semilla decorticada) y torta de cacahuete. Se comparó la cantidad de aflatoxinas producidas a 30° C y 85 p. 100 de humedad relativa que son las condiciones óptimas para la producción de aflatoxinas, y a una temperatura máxima media de 40'5° C, con una máxima de 46° C y una humedad relativa media de 43 p. 100, en los 21 días que duró la incubación. Se ha observado que en estas últimas condiciones ambientales la producción de aflatoxinas en los piensos investigados es prácticamente nula.

Summary.

An experimental contamination of fodder by means of *A. flavus* 15517 strain and *A. flavus* Pep-70-1h, producers of aflatoxins, groups B and G, has been carried out in order to know the possible influence of temperature and relative humidity on the contamination of aflatoxins in the area of Córdoba. The kind of fodder contaminated is: newly cut alfalfa, carob (pods without seeds), maize, barley; refuse of olives (stoned and extracted), alfalfa flower, colza (seed cake), sunflower (seed cake), and peanut cake. The quantities of aflatoxins, produced under the following conditions, were compared: aflatoxins produced at 30° C and a relative humidity of 85 p. 100. These conditions being the best for the production of aflatoxins; aflatoxins produced at an average temperature of 40'5° C with a maximum temperature of 46° C, and a relative humidity of 43 p. 100, through the 21 days taken by the incubation. It was observed that under the latter environmental conditions, the production of aflatoxins in the kind of fodder under investigations is practically none.

Bibliografía.

- Anonimous, 1965.--Aflatoxin chemical assay procedure of the aflatoxin methodology working group. National Peanut Council, Washington, D. C.
- Davis, N. D. and U. L. Diener, 1968.--Applied Microbiology, 16: 158-160.
- Diener, U. L. and N. D. Davis, 1966.--Phytopathology, 56: 1390-1393.
- Diener, U. L. and N. D. Davis, 1967.--J.A.O.C. Soc. 44: 259-263.
- Galloway, L. D. 1935.--J. Textile Inst. Trans. 26: 123-129.
- Gimeno Ciriano, A. 1977.--Técnica analítica para la determinación de micotoxinas. Coloquio nacional de micotoxinas, Zaragoza, enero de 1977.

JODRAL VILLAREJO, M.: CONDICIONES AMBIENTALES *ASPERGILLUS FLAVUS*.

- Herz, K. O., 1976.--Alimentación y nutrición, 2: 17-19.
- Jodral, M. and A. Herrera, 1979. Anal. Bromatol. 31: 7-10.
- Lucisiano, A.; N. Campanini and A. Casolari, 1972.--Industria Conserve, 1: 27-31.
- Marth, E. H., 1967.--J. Milk Food Technol., 30: 192-198.
- Pohland, A. E., L. Yin and J. G. Dantzman, 1970.--J.A.O.A.C., 53: 101-102.
- Pons, W. A. y Goldblatt, L. A., 1965.--J.A.O.C.S., 42: 471-475.
- Schindler, A. F., 1977.--J. Food Protection, 40: 39-40.
- Schroeder, H. W. and W. W. Carlton. 1973.--Applied Microbiology, enero: 146-148.
- Schroeder, H. W.; C. R. J. Gribbsby and H. Hein, 1974.--Applied Microbiology, Feb.: 394-399.
- Smith, R. H. and W. McKernam, 1962.--Nature, 195: 1301.
- Waltking, A. E., G. Bleffert and M. Kiernan, 1968.--J.A.O.A.C., 47: 1003.
- Whitten, M. E. 1969.--J.A.O.C.S., 46: 39.
- Wildman, J. D.; L. Stoloff and R. Jacobs, 1967.--Biotechnol. Biol. 9: 429-437.

CUADRO I. Aflatoxinas producidas, μ g/kg, por la cepa *A. flavus* ATCC 15517 a 30° C y 85 p. 100 de humedad relativa.

ALIMENTOS	ESTERILES				NO ESTERILES			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Alfalfa recién cortada.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Algarroba (valvas sin semillas)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Maíz	125	ND	ND	ND	80	ND	ND	ND
Cebada	18'5	8	18'75	12'5	11'0	4	10'0	10
Orujo de aceituna, deshusado y extractado.	125	10	ND	ND	80	7'5	ND	ND
Harina de alfalfa	50	10	ND	ND	19'5	9	ND	ND
Colza (torta de semilla)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Girasol (torta de semilla de corticada)	250	25	ND	ND	100	8	ND	ND
Torta de cacahuete	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = No detectada.

CUADRO II. Aflatoxinas producidas, μ g/kg, por la cepa *A. flavus* Pep-70-1h a 30° C y 85 p. 100 de humedad relativa.

ALIMENTOS	ESTERILES				NO ESTERILES			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Alfalfa recién cortada	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Algarroba (valvas sin semilla)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Maíz	ND	208'3	ND	ND	ND	100	ND	ND
Cebada	ND	625	ND	ND	ND	312'5	ND	ND
Orujo de aceituna, deshuesado y extractado	ND	50	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Harina de alfalfa	62'5	75'5	62'5	62'5	ND	ND	ND	ND
Colza (torta de semilla)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Girasol (torta de semilla descortada)	ND	12'5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Torta de cacahuate	ND	25	ND	ND	ND	12'5	ND	ND

ND = No detectada.

CUADRO III. Aflatoxinas producidas μ g/kg, por la cepa *A. Flavus* ATCC 15517 a 40°5'0 C y 43 p. 100 de humedad relativa.

ALIMENTOS	ESTERILES				NO ESTERILES			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Alfalfa recién cortada.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Algarroba (valvas sin semilla)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Maíz.	62'5	31'2	62'5	15'0	31'25	30'25	31'25	10'0
Cebada	62'5	37'5	62'5	15'62	62'5	31'25	46'5	2'5
Orujo de aceituna, deshuesado y extractado.	X	X	ND	ND	ND	X	ND	ND
Harina de alfalfa	37'5	25	X	X	10	4	X	X
Colza (torta de semilla).	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Girasol (torta de semilla descorticada)	100	20	ND	ND	50	6	ND	ND
Torta de cacahuete	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

X = Trazas

ND = No detectada

CUADRO IV. Aflatoxinas producidas, μ g/kg, por la cepa de *A. flavus* Pep-70-1h a 40'5° C y 43 p. 100 de humedad relativa.

ALIMENTOS	ESTERILES				NO ESTERILES			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Alfalfa recién cortada	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Algarroba (valvas sin semilla)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Maíz	62'5	15'62	ND	ND	18'75	14'8	ND	ND
Cebada	104'5	434'2	ND	ND	ND	25	ND	ND
Orujo de aceituna, deshuesado y extractado	ND	X	ND	ND	ND	X	ND	ND
Harina de alfalfa	ND	X	ND	ND	ND	X	ND	ND
Colza (torta de semilla)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Girasol (torta de semilla de corticada)	ND	X	ND	ND	ND	X	ND	ND
Torta de cacahuete	ND	10	ND	ND	ND	X	ND	ND

X = Trazas

ND = No detectada.