

ISBN 970-27-1045-6

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD NUTRICIONAL Y CONTAMINACIÓN POR HONGOS Y MICOTOXINAS EN EL ENSILADO DESTINADO AL CONSUMO ANIMAL

¹Reyes Velázquez Waldina, ²Jiménez Plascencia Cecilia, ¹Rojo Federico, ¹Figuroa Gómez Marina, ²Hernández Góborra Jorge, ¹Landeros Ramírez Patricia, ¹López Ilean Yolanda, ¹Isaías Espinosa Victor, ¹Palacios De Lucas Ernesto, ²Carlos Juárez Woo.

¹ Departamento de Salud Pública, ² Departamento de Producción animal, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.
Correo electrónico: waldinar@cucba.udg.mx

Introducción

La producción de ensilaje de maíz constituye un método de conservación con pérdidas mínimas en la calidad nutricional de este cereal (Oudeelferink et al., 2001). Bajo condiciones anaeróbicas, las bacterias nativas fermentan los carbohidratos solubles con producción de ácido láctico y disminución del pH. Como resultado, estas condiciones (bajo pH, anaerobiosis) inhiben el desarrollo de los principales microorganismos causantes del deterioro de los alimentos.

La obtención de ensilaje de elevada calidad y valor nutricional requiere optimizar, entre otros aspectos, la densidad, humedad y el contenido de azúcares solubles en agua. La reducción o pérdida del valor nutricional del material ensilado durante su almacenamiento ocurre debido al desarrollo de hongos. Según Garon et al. (2006), los principales factores asociados con este desarrollo son: temperatura, humedad e infestación por insectos.

Los hongos, como parte de su nutrición y desarrollo, secretan numerosas enzimas que desdoblan las macromoléculas en compuestos de bajo peso molecular. Por otra parte, existe el potencial riesgo de la producción de micotoxinas (Vining, 1992). Las micotoxinas son compuestos orgánicos, biológicamente activos causantes de intoxicaciones agudas y crónicas, con efectos mutagénicos, teratogénicos y carcinogénicos. La presencia de estas sustancias y esporas alergénicas constituyen un factor de riesgo para la salud animal. Los síndromes tóxicos causados por la ingestión de micotoxinas se denominan *micotoxicosis*. En diversos estudios, las principales especies toxicogénicas asociadas con el ensilaje son: *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum*. Por otra parte, otras especies aisladas frecuentemente como contaminantes naturales corresponden a *Byssosclamyces nivea*, *Penicillium roqueforti*, *Monascus* spp. y *Trichoderma* spp. (Garon et al. 2006).

En las explotaciones pecuarias, importantes pérdidas económicas se asocian al efecto subclínico de las micotoxinas. Su presencia ocasiona alteraciones en diversos parámetros productivos, entre ellos, consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia. Las principales micotoxinas involucradas en procesos toxicológicos en animales a través de la alimentación son aflatoxinas (AFs), ocratoxinas (OT), deoxinivalenol (DON), toxina T-2, zearalenona (ZEA) y fumonisinas (FBs).

Los objetivos del estudio fueron: determinar la calidad nutricional, flora fúngica e incidencia de aflatoxinas, fumonisinas y ocratoxinas durante el almacenamiento y conservación del ensilado destinado al ganado bovino.

Metodología

Este trabajo presenta el estado de avance de un proyecto de investigación conjunto entre el Laboratorio de Residuos Tóxicos II (Departamento de Salud Pública) y el Laboratorio de Nutrición Animal (Departamento de Producción Animal), dependencias del CUCBA, UdeG.

Muestreo

Durante el año 2006, un total de 6 muestras de ensilaje correspondientes a los meses de enero, febrero, marzo, agosto, septiembre y octubre fueron obtenidas de un silo ubicado en la localidad La Resolana del municipio de Acatic, Jalisco. Cada muestra (5 Kg), se confeccionó a partir de 6 puntos del corte transversal del silo. Posteriormente, se redujo el tamaño de muestra a 1 kg de manera representativa (método por cuarteo). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Análisis químico-proximal

Se realizaron las siguientes determinaciones: proteína cruda (PC), grasa cruda (GC), fibra cruda (FC), extracto libre de nitrógeno (ELN), cenizas (CN), fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y ácido láctico (AL) según los protocolos AOAC (1998).

Determinación de la micoflora en el ensilado

El recuento de hongos se realizó por el método de dilución y siembra superficial con espátula de Drigalsky en el medio de aislamiento general Rosa de Bengala Cloranfenicol (RBC) y en el medio Nash Snyder, selectivo para especies de *Fusarium*.

Cinco (5 g) de cada muestra de ensilaje se homogeneizaron en licuadora (495 mL de agua peptonada al 0.1 %), realizando una serie de diluciones seriadas en el mismo diluyente. Las placas de RBC se incubaron a 25° C durante 7 días, y las de Nash – Snyder durante 7 días a

24° C, bajo fotoperíodo de 12/12 hs de luz blanca y luz negra. Los resultados se expresaron como UFC g⁻¹ de ensilado. Se determinó la frecuencia de distribución de cada género fúngico.

Determinación de los niveles de Aflatoxinas (AFs), Fumonisin (FBs) y Ocratoxinas (OT) en ensilado de maíz

Todas las determinaciones se realizaron mediante el uso de pruebas rápidas para la detección y cuantificación de micotoxinas provistas por Romers Lab[®] (AgraQuant). Las mismas se basan en pruebas inmunoenzimáticas competitivas y de tipo directas. El protocolo de extracción, detección y cuantificación de las diferentes micotoxinas se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Para determinar la densidad óptica se empleó un lector BioTek ELX-800 y filtro de 450nm. El coeficiente de correlación de las curvas de calibración para AFs, FBs y OT fue de 0.991, 0.998 y 0.999, respectivamente. El análisis de los datos fue realizado mediante el uso del programa estadístico SigmaStat v3.1 para Windows.

Resultados y Discusión

La tabla 1 presenta el contenido químico proximal obtenido en base seca del ensilado durante los meses enero, febrero, marzo, agosto, septiembre y octubre. El pH del ensilado durante el período en estudio alcanzó un valor promedio de 3.7 (rango de 3.48-3.97), siendo estos valores similares a los considerados adecuados para inhibir los principales grupos de microorganismos descomponedores de la materia. Según Chase y Stone (2000), la inhibición de los microorganismos y la conservación del ensilaje se presenta a valores de pH entre 3.7 - 4.2. Durante la apertura de los silos, el ingreso de aire favorece el desarrollo de bacterias y hongos indeseables, los cuales pueden ocasionar la disminución del valor nutricional y la producción de sustancias potencialmente tóxicas. Sin embargo, durante esta fase aeróbica no parece existir una correlación entre valores bajos de pH y estabilidad o conservación del ensilaje. La producción de ácido acético por bacterias ácido lácticas heterofermentativas contenidas en inoculantes aumenta la estabilidad aeróbica del silo frente al deterioro causado por microorganismos indeseables (Danner et al., 2003).

La humedad promedio del material ensilado fue de 76%. Hunt et al. (1989) establece que durante los diferentes estadios de maduración del ensilaje de maíz la humedad oscila entre 54.6-68.34%.

Los niveles de PC se mantuvieron en un intervalo de 8.98 y 12.93% siendo las principales variaciones ocurridas en los meses de agosto y septiembre. Las FDN y FDA mostraron niveles entre 61.16 y 68.95% y 42.91 y 47.78% respectivamente, sin presentarse diferencia estadística entre los meses estudiados. Respecto a los otros nutrientes las variaciones mensuales fueron mínimas.

Tabla 1. Composición química proximal del ensilado de maíz (%)

	Enero	Febrero	Marzo	Agosto	Septiembre	Octubre
pH	3.88	3.91	3.97	3.48	3.54	3.50
H %	77.94	79.35	79.88	75.7	71.25	74.80
MS %	22.05	20.65	20.12	24.3	28.75	25.20
PC %	8.98	9.42	9.17	12.14	12.93	9.43
FC %	30.94	33.14	33.61	41.25	37.53	29.93
GC %	1.81	1.85	1.73	0.85	1.03	1.54
ELN %	48.01	46.42	47.67	36.24	38.39	51.56
CN %	6.92	7.57	7.04	9.52	10.12	7.44
FDN %	62.81	61.16	66.34	66.5	62.97	68.95
FDA %	42.91	44.02	47.78	45.61	45.66	44.61

Referencias. H= Humedad, MS= Materia Seca, PC= Proteína Cruda, FC= Fibra Cruda, GC= grasa cruda, ELN= extracto libre de nitrógeno, CN= Cenizas, FDN= Fibra Detergente Neutra, FDA= Fibra Detergente Acida.

Durante los meses en estudio, el recuento fúngico general en medio RBC fue en promedio de $6.5 \cdot 10^4$ UFC g^{-1} . Se determinó la frecuencia porcentual de aislamiento de los principales géneros asociados al deterioro del ensilaje siendo su prevalencia el siguiente orden: *Mucor* spp. (29,2%), *Penicillium* spp. (17.5%) y *Aspergillus* spp. (8.3%). Otros géneros en menor incidencia (55%) correspondieron a *Alternaria* spp., *Geotrichium* spp. y aislamientos considerados como micelio estéril. Por otra parte, en el medio de cultivo Nash Snyder, el recuento de especies de *Fusarium* spp. fue $3.5 \cdot 10^6$ UFC g^{-1} . Así mismo, se destaca que durante los meses de agosto y septiembre, el ensilaje presentó una visible contaminación fúngica. Bajo las condiciones de almacenamiento, la disponibilidad de oxígeno en las porciones superficiales del ensilaje favorece la presencia y desarrollo de hongos. Las porciones internas del silo (1.5 m de profundidad) ejercen un efecto fungistático a raíz de la liberación de ácidos orgánicos por bacterias fermentativas (Krustev E. y Khristov B., 1981).

La tabla 2 presenta los niveles de contaminación en el ensilado de maíz por aflatoxinas, fumonisinas y ocratoxinas. Los niveles de aflatoxinas totales durante los meses en estudio oscilaron entre 12.25 - 15.71 ppb. En relación a fumonisinas totales, la concentración de estas sustancias fue inferior a 0.706 ppm. Por otra parte, los resultados de ocratoxina determinaron que esta micotoxina estuvo presente, al igual que aflatoxinas y fumonisinas, durante todo el estudio. Los niveles encontrados oscilaron entre 4.36 - 5.76 ppb. Según lo establecido por la FDA, los alimentos destinados para consumo bovino no deben contener niveles mayores a 100 ppb de AFs totales, de 60 ppm de FBs totales y 100 ppb de OT.

Según lo determinado en este trabajo, las concentraciones en el ensilaje de estas micotoxinas no se consideran de riesgo para la salud del ganado bovino.

En general, los ruminantes son más resistentes a las micotoxinas que los animales monogástricos. Posiblemente, la presencia microbiana y las condiciones físico-químicas del rumen sean responsables de los procesos de destoxificación observados (Yiannikouris y Jouany, 2002). Sin bien el ensilaje presentó contaminación con las micotoxinas objeto de este estudio, los niveles reportados establecieron la aptitud para consumo de dicho alimento. A la presentación de este estado de avance, se encuentran realizando las determinaciones de deoxynivalenol (DON) y zearalenona (ZEA), como así también de los correspondientes análisis estadísticos.

Tabla 2. Niveles de Aflatoxinas (AFs), Fumonisina (FBs) y Ocratoxinas (OT) en el ensilado

	Aflatoxinas totales (ppb)		Fumonisinas Totales (ppm)		Ocratoxinas (ppb)	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS
Enero	15.19	2.03	0.706	0.259	5.31	0.42
Febrero	15.71	0.96	0.138	0.132	5.45	0.51
Marzo	14.79	0.68	0.408	0.004	5.76	0.59
Agosto	12.25	1.52	0.376	--	5.23	0.73
Septiembre	12.99	1.19	0.362	0.106	4.65	0.56
Octubre	14.17	0.42	0.607	0.283	4.36	0.12

Límite detección (LD) AFs=3 ppb; LD FBs=0,2 ppm; LD OT=2ppb;
DS= desviación estándar; ppb= partes por billón; ppm= partes por millón;

Conclusiones

Las condiciones de almacenamiento y conservación del ensilaje mantuvieron la calidad nutricional de este alimento destinado a ganado bovino. Así mismo, fue posible realizar el aislamiento de los principales géneros fúngicos causantes del deterioro de los alimentos (*Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*) y potencialmente productores de micotoxinas. No obstante, los niveles de aflatoxinas, fumonisinas y ocratoxinas en el ensilado son inferiores a los límites máximos establecidos por la FDA. Finalmente, la cantidad de estas micotoxinas en el ensilaje no representa riesgo para la salud de los animales.

Bibliografía

- Danner, H., Holzer, M., Mayhuber, E., Braun, R. 2003. Acetic Acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1):562-567.
- El-Shanawany, A. A., Eman Mostafa, M., Barakat, A. 2005. Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Soh governorates in Egypt, with a special reference to characteristic Aspergilli toxin. *Mycopathologia* 159:281-289.
- Garon, D., Richards, E., Sage, L., Bouchart, V., Pottier, D., Lebailly, P. 2006. Mycoflora and Multimycotoxin Detection in Corn Silage: Experimental Study *J. Agric. Food Chem.* 54:3479-3484
- Hunt, C.W., Kezar, W., Vinande, R. 1989. Yield, chemical composition and ruminal fermentability of corn whole plant, ear, and stover as affected by maturity. *J. Prod. Agri.* 2:357-361
- Krustev, E., Khristov, B. 1981. Microflora in corn silage. *Vet Med Nauki.* 18(7):88-91.
- Oudeelinkerink, S., Driehuis, F., Gottschal, J., Spoelstra, S. 2001. Silage fermentation processes and their manipulation. *FAO Electronic conference on Tropical silage.*
- Vining L. C. 1992. Role of secondary metabolites from microbes. En: *Secondary Metabolites: their Function and Evolution.* Editores: Chadwick, D. J., Whelan, J. John Wiley: Chichester; pp 184-194.
- Yiannikouris, A., Jouany, J. P. 2002. Mycotoxins in feeds for ruminants; fate and effects on animals. *INRA Prod. Anim.*, 15(1):3-16.